

Лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG и ее роль при первичных новообразованиях костей (анализ литературы и собственные результаты)

Е.С. Герштейн, Ю.С. Тимофеев, А.А. Зуев, Н.Е. Кушлинский

Лаборатория клинической биохимии ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Сергеевна Герштейн esgershtein@gmail.com

Лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG — ключевое звено гомеостаза костной ткани, непосредственно регулирующее дифференцировку остеокластов и остеолиз. Дисбаланс костного гомеостаза, связанный с нарушениями в системе RANK/RANKL/OPG, лежит в основе онкологических процессов, таких как разрушение костей, развитие метастазов, прогрессирование опухоли. Участие системы RANK/RANKL/OPG в формировании костных метастазов различных опухолей практически доказано, однако ее влияние на развитие первичных новообразований костей все еще недостаточно изучено.

В статье суммированы имеющиеся в литературе экспериментальные и клинико-лабораторные данные об участии системы RANK/RANKL/OPG в патогенезе первичных опухолей костей, в первую очередь — гигантоклеточной опухоли (ГКО), в лечении которой уже используется ингибитор RANK/RANKL-взаимодействия деносумаб. Приведены также результаты собственного исследования содержания растворимых форм компонентов системы RANK/RANKL/OPG в сыворотке крови 101 больного саркомой кости (остеосаркома — 37 пациентов, хондросаркома — 41, хордома — 12, саркома Юинга — 7, плеоморфная недифференцированная саркома — 2, фибросаркома — 2), 32 больных пограничной ГКО кости и 30 пациентов с доброкачественными поражениями костей. Продемонстрированы нарушения баланса активаторов и ингибиторов остеолиза при первичных опухолях костей, зависящие как от характера новообразования (злокачественное, пограничное или доброкачественное), так и от гистологического строения злокачественной опухоли. Наибольшие изменения в системе RANK/RANKL/OPG, выражающиеся в увеличении сывороточной концентрации всех 3 ее компонентов и усилении взаимосвязи между уровнями растворимого рецептора и его природного ингибитора OPG в сыворотке крови, отмечены у больных ГКО.

Изучение роли системы RANK/RANKL/OPG при первичных новообразованиях костей представляет актуальную задачу для исследования на клиническом материале, а также открывает перспективы для разработки новых методов диагностики и адресного назначения молекулярно-направленных препаратов, ингибирующих ее активность.

Ключевые слова: рецептор-активатор NF-κB (RANK), RANK-лиганд (RANKL), остеопротегерин, костный гомеостаз, остеокластогенез, саркомы костей, гигантоклеточная опухоль кости, таргетная терапия, деносумаб, сыворотка крови

DOI: 10.17650/2313-805X-2015-2-3-51-59

RANK/RANKL/OPG ligand-receptor system and its role in primary bone neoplasms (literature analysis and own data)

E.S. Gershtein, Yu.S. Timofeev, A.A. Zuev, N.E. Kushlinskii

Laboratory of Clinical Biochemistry, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

RANK/RANKL/OPG ligand-receptor system is a key player in bone homeostasis regulation directly regulating osteoclast differentiation and osteolysis. Disbalance of bone homeostasis associated with malfunctioning of RANK/RANKL/OPG system underlies such oncological processes as the destruction of bone, metastasis development, tumor progression. Involvement of RANK/RANKL/OPG system in the development of metastasis from various tumors is practically confirmed, but its influence on the development and progression of primary bone tumors still needs thorough evaluation. In this paper experimental and clinical-laboratory data on the role of RANK/RANKL/OPG system in primary bone tumors' pathogenesis available in modern literature are summarized with special attention paid to giant-cell bone tumor (GCBT) that is already treated with RANK/RANKL interaction inhibitor denosumab. Results of authors' study of the levels of RANK/RANKL/OPG system's components in blood serum of 101 malignant bone tumor (37 — osteosarcoma, 41 — chondrosarcoma, 12 — chordoma, 7 — Ewing sarcoma, 2 — pleomorphic undifferentiated sarcoma, 2 — fibrosarcoma), 32 borderline GCBT, and 30 benign bone tumor patients are also presented. The disturbances in the balance of osteolysis activators and inhibitors in patients with primary bone tumor depending both on the character of neoplasm (malignant, borderline or benign), and histological structure of malignant tumors were demonstrated. The most striking changes in RANK/RANKL/OPG system manifesting itself in an increase of serum concentrations of all its components and strengthening of association between the levels of soluble receptor and its natural inhibitor OPG were revealed in giant-cell bone tumor patients.

The study of the role of RANK/RANKL/OPG system in primary bone neoplasms is a topical goal for clinical investigations; it is also a promising tool for development of new diagnostic methods and for targeted application of specific drugs inhibiting its activity.

Key words: receptor activator of NF-κB (RANK), RANK ligand (RANKL), osteoprotegerin, bone sarcomas, giant-cell bone tumor, targeted therapy, denosumab, blood serum

Общие представления о системе RANK/RANKL/OPG

Костное ремоделирование — непрерывный и хорошо скоординированный процесс, который помогает устранять микроповреждения в костной матриксе, возникающие в течение жизни, сохранять костную архитектуру и поддерживать прочность костей. Изначально ремоделирование костной ткани является гомеостатическим, т. е. резорбция костей компенсируется образованием новой костной ткани. Оба процесса тесно взаимосвязаны и являются результатом клеточного взаимодействия остеобластов и остеокластов, берущих начало от предшественников различных клеточных линий: остеобласты — от мезенхимальных стволовых клеток, остеокласты — от макрофагально-моноцитарных клеток костного мозга.

Лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG (рис. 1) — ключевое звено гомеостаза костной ткани, непосредственно регулирующее дифференцировку остеокластов и остеолиз [1, 2]. Основой этой системы является рецептор-активатор ядерного транскрипционного фактора NF- κ B (receptor activator of NF- κ B, RANK) — трансмембранный белок I типа с молекулярной массой около 70 кДа, состоящий примерно из 620 аминокислотных остатков. Его внеклеточный N-концевой домен (остатки 30–194) состоит из 4 tandemных богатых цистеином псевдоповторов, характерных для суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (tumor necrosis factor receptor superfamily, TNFRSF),

а 383-аминокислотный C-концевой участок — один из крупнейших цитоплазматических доменов TNFRSF. Особенностью рецепторов TNFRSF является отсутствие ферментативной (тирозинкиназной) активности внутриклеточного домена. Единственный лиганд, связывающийся с внеклеточным доменом RANK (RANKL), принадлежит к семейству TNF и представляет собой трансмембранный белок II типа с молекулярной массой около 20 кДа (176 аминокислотных остатков). Он первично экспрессируется на поверхности активированных T-клеток, стромальных клеток костного мозга и остеобластов. Существуют также растворимые формы RANKL (sRANKL) образующиеся либо в результате протеолитического расщепления трансмембранного белка, либо путем альтернативного сплайсинга его мРНК. Связывание как трансмембранной, так и растворимой формы RANKL с RANK приводит к тримеризации рецептора, которая через сложную цепочку адаптерных молекул активирует различные сигнальные пути, выходящие на NF- κ B, что приводит, в частности, к инициации остеокластогенеза из клеток-предшественников и активации зрелых остеокластов.

Природный антагонист RANKL — остеопротегерин (OPG), так называемый рецептор-ловушка, растворимый гомолог RANK (401 аминокислотный остаток) с молекулярной массой 60 кДа в виде мономера и 120 кДа — в виде дисульфидного гомодимера, первично секретируемый стромальными клетками кост-

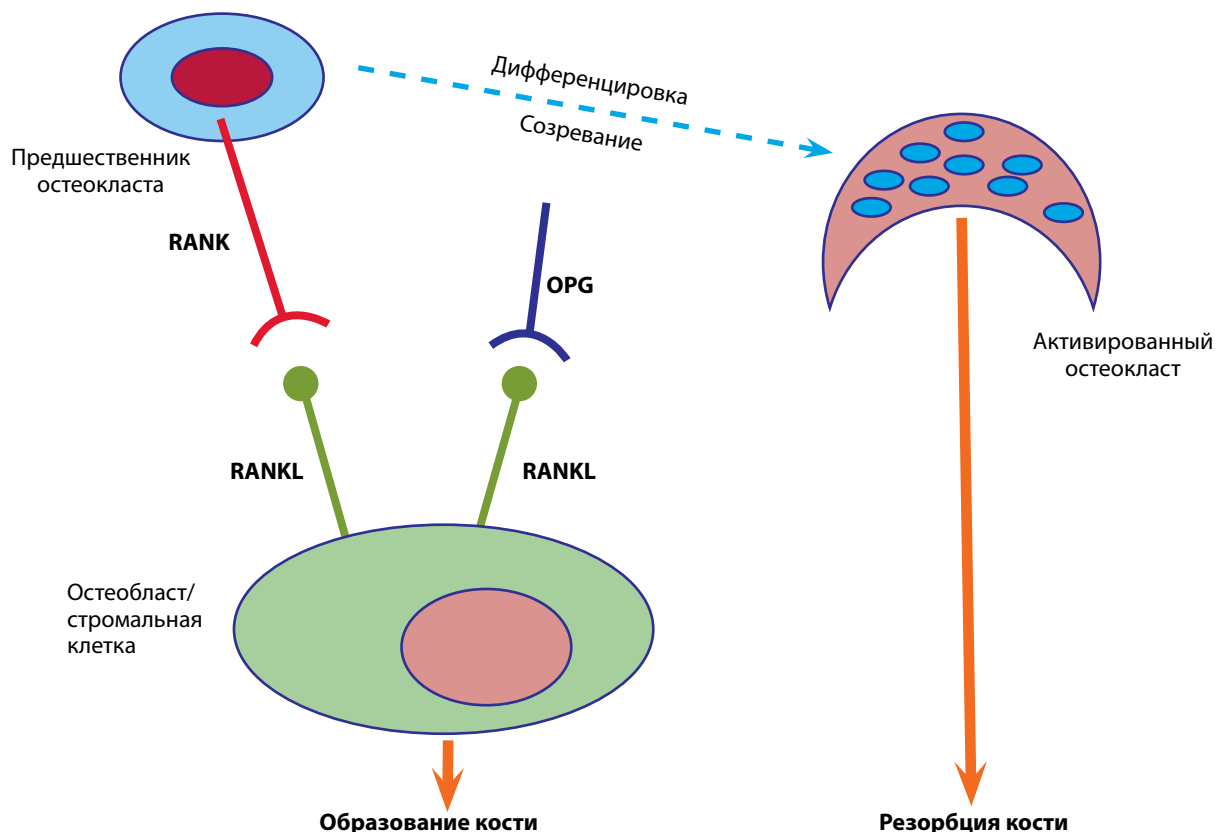


Рис. 1. Схема функционирования лиганд-рецепторной системы RANK/RANKL/OPG в регуляции гомеостаза костной ткани в норме

ного мозга и остеобластами и блокирующий взаимодействие RANK и RANKL, связывая последний. Соотношение RANKL/OPG по-разному регулируется в физиологических и патологических условиях, и с нарушениями баланса в системе RANK/RANKL/OPG связаны многие патологические процессы, характеризующиеся как нарушения ремоделирования костной ткани, такие как остеопороз, артрит и др. [3, 4].

Важную роль в функционировании системы RANK/RANKL/OPG играют генетические нарушения в участках ДНК, кодирующих белки данной системы [5–8]. Известно несколько мутаций гена *TNFRSF11B*, кодирующего OPG, которые могут приводить к аномалиям его связывания с RANKL, в результате чего развиваются заболевания с рядом специфических фенотипических проявлений. Например, ювенильная болезнь Педжета – редкое аутосомно-рецессивное заболевание, проявляющееся в раннем детстве деформациями костной ткани, нарушениями слуха, аномалиями развития зубов различной интенсивности. Данная патология может быть следствием инактивирующей мутации в гене *TNFRSF11B*, локализованном в локусе 8q24.2 [9]. Одним из предположительных механизмов действия мутации, которая наблюдается в наиболее тяжелых случаях, является взаимодействие аминокислотных остатков цистеина с лиганд-связывающим доменом OPG. При менее тяжелых формах ювенильной болезни Педжета могут присутствовать мутации, связанные с другими аминокислотными остатками, кроме цистеина. В свою очередь, делеции и инсерции 5-го экзона данного гена наблюдаются при менее выраженных формах патологии.

RANK кодируется геном *TNFRSF11A*, локализованным в хромосоме 18. Мутации этого гена могут поражать сигнальный пептидный участок RANK, нарушения в структуре которого приводят к усилению сигнальной функции рецептора. Такие активирующие мутации могут проявляться в следующих патологических состояниях:

1) ранняя костная болезнь Педжета – гетерогенное аутосомно-доминантное поражение скелета, которое характеризуется деформацией костей, нарушениями слуха, стоматологическими проблемами; генетическая природа этой патологии заключается в наличии тандемной дупликации 27-bp в гене *TNFRSF11A*, кодирующем RANK [6, 9];

2) экспансильная (расширяющаяся) скелетная гиперфосфатемия – аутосомно-доминантное нарушение, проявляющееся ранними дефектами развития зубов, болью в костях в результате ускоренного обновления костной ткани, а также эпизодической гиперкальциемией; генетическая причина данного состояния состоит в наличии тандемной дупликации 15-bp в гене *TNFRSF11A*;

3) семейный экспансильный остеолит – аутосомно-доминантное заболевание, проявляющееся с раннего детства до раннего зрелого возраста нарушениями

слуха; генетической причиной этой аномалии является тандемная дупликация 18-bp в гене *TNFRSF11A*.

Сигнальная система RANK/RANKL/OPG при онкологических заболеваниях

Изменения баланса костного ремоделирования и формирования остеокластов лежат и в основе некоторых патологических процессов, ассоциированных с опухолевым ростом, таких как разрушение костей, развитие метастазов, прогрессирование опухоли и т. д. Сигналы, нарушающие нормальный баланс RANKL/OPG, могут быть крайне разнообразными и зависят от типа опухоли, поражающей кость, а также от нозологических особенностей конкретной опухоли [10, 11]. При этом все многообразие сигналов приводит к усилению остеокластогенеза и разрушению костной ткани в результате активности сигнального пути RANK/RANKL. Различные цитокины и молекулярные факторы, такие как интерлейкины (IL) 1 β , 6, 8, 11, 17, макрофагальный воспалительный протеин 1 α , фактор некроза опухоли α , простагландин E и др., способны усиливать продукцию RANKL стромальными клетками костного микроокружения, включая остеобласты [12]. В свою очередь, продукция OPG, выполняющего функцию «ловушки» для RANKL, может быть снижена путем уменьшения синтеза данного рецептора или активации его деградации [13].

Повышенная экспрессия и/или сигнальная активность RANKL была выявлена при раке молочной железы (PMЖ) [14–16], простаты [15, 17], почки [18], множественной миеломе [6], немелкоклеточном раке легкого [19] и некоторых других солидных опухолях [11, 13]. Продуцируемый опухолевыми клетками RANKL способен усиливать процессы остеокластогенеза *in vitro* [20], что позволяет предположить возможность прямого влияния опухолевых клеток, локализованных в костной ткани, на этот процесс. 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 к уменьшению опухоль-ассоциированного воспаления, снижению пролиферации опухолевых клеток, усилению апоптоза, а также увеличению показателя выживаемости [21].

Воздействие RANKL на некоторые клеточные линии приводит к активации факторов, ответственных за миграцию, инвазию и метастазирование. Так, действие RANKL на вызванные PMЖ 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 сосудов – VEGF [22]. Участие системы RANK/RANKL/OPG в формировании костных метастазов различных опухолей практически доказано [23], одна-

ко ее влияние на развитие первичных новообразований костей все еще недостаточно изучено.

Система RANK/RANKL/OPG в первичных опухолях костей

Первичные опухоли костей — гетерогенная и весьма сложная в диагностике и лечении группа новообразований, патогенез которых тесно 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.

Одна из самых распространенных первичных злокачественных опухолей костей, поражающая преимущественно людей молодого возраста и обладающая крайне неблагоприятным прогнозом, — **остеосаркома**. Влияние клеток остеосаркомы на функцию остеокластов позволяет предположить тесную связь между агрессивностью остеосаркомы и активностью остеокластов. Так, в культуре клеток остеосаркомы MG63, способных индуцировать паракринно опосредованную остеокластогенную активность, продемонстрирована высокая экспрессия факторов, отвечающих за остеокластогенез, — M-CSF и RANKL [24]. При помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскриптазой, а также иммуногистохимического окрашивания показано наличие экспрессии RANK в линиях человеческой остеосаркомы MNNG/HOS, Saos-2 и MG-63, при этом в клетках остеосаркомы линии U-2 экспрессия RANK отсутствовала [25]. Экспрессия RANK также обнаружена при анализе биоптатов опухолей больных остеосаркомой, а проведенный затем иммуноблоттинг показал значительную функциональную активность RANK, выразившуюся в индукции в RANK-позитивных клетках остеосаркомы под действием RANKL фосфорилирования таких внутриклеточных сигнальных белков, как ERK1/2, p38, IκB [25]. Прямое влияние RANKL на экспрессию 69 генов, вовлеченных в метаболизм костной ткани, продемонстрировано на RANK-позитивных клетках остеосаркомы линии Saos-2 с использованием микрочипов комплементарной ДНК [26].

В клинических исследованиях продемонстрирована достоверная взаимосвязь между высокой экспрессией RANKL в опухоли и слабым ответом больных остеосаркомой на неoadъювантную химиотерапию: высокие уровни экспрессии RANKL были ассоциированы с низкими показателями 5-летней выживаемости [27].

Влияние OPG на развитие остеосаркомы исследовано на моделях млекопитающих [28]: его введение способствовало снижению роста опухоли и ассоциированного с опухолью воспаления, причем опухолевые клетки, использованные в этих экспериментах, экспрессировали RANKL. Возможности целенаправленного воздействия на данную систему изучали на моделях остеосаркомы, первичной иммунокомпетентным

и бестимусным мышам, используя в качестве ингибитора RANKL малые интерферирующие РНК (Rkl-siRNA) [29]. Внутриопухолевое введение siRNA в комбинации с катионной липосомой RPR209120/DOPE приводило к локальному и системному снижению продукции RANKL и защите костной ткани от ассоциированного с опухолью остеолита.

Значимая роль системы RANK/RANKL/OPG была продемонстрирована и для второй по распространенности первичной опухоли костей — **хондросаркомы**. Так, С. J. Hsu и соавт. показали на клиническом материале, что экспрессия RANKL и RANK в тканях хондросаркомы человека выше, чем в нормальной ткани, а затем в экспериментальной системе продемонстрировали увеличение экспрессии интегрин-β1 на культивируемых клетках хондросаркомы человека линии JJ012 и активацию миграции этих клеток под действием RANKL [30]. Стимуляция клеток JJ012 с помощью RANKL сопровождалась усилением фосфорилирования MEK и ERK, а предобработка клеток ингибиторами MEK (PD98059 или U0126), а также ингибиторами NF-κB (PDTC) или IKKα/β (TPCK) подавляла как RANKL-индуцированную миграцию, так и индукцию экспрессии интегрин-β1. Взаимосвязь активации сигнальных путей RANK/RANKL и ERK/MEK продемонстрирована и на другой культуре клеток хондросаркомы — SW1353, стимулированной IL-1β [31]. Авторы этой работы также показали возможность подавления экспрессии RANK и RANKL в клетках хондросаркомы растительным флавоноидом икарином, обладающим остеогенной активностью.

Имуногистохимически и методом ПЦР с обратной транскриптазой 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 остеокластов посредством активации системы RANKL [32].

Повышенную экспрессию RANKL, OPG и RANK отмечали и в некоторых доброкачественных поражениях костной ткани [33].

Особый интерес представляет **гигантоклеточная опухоль (ГКО)** — пограничное новообразование костей, характеризующееся интенсивным остеолитом и высокой остеокластной активностью. Гигантские клетки, представляющие собой реактивные макрофаги, приобретшие остеокластную активность в результате стимуляции стромальными клетками в костном микроокружении, экспрессируют RANK, который активируется RANKL, секретлируемым стромальными клетками (рис. 2) [34–36]. Данное свойство ГКО в последние годы достаточно успешно используется при лечении неоперабельных форм этой опухоли антагонистами RANKL [37].

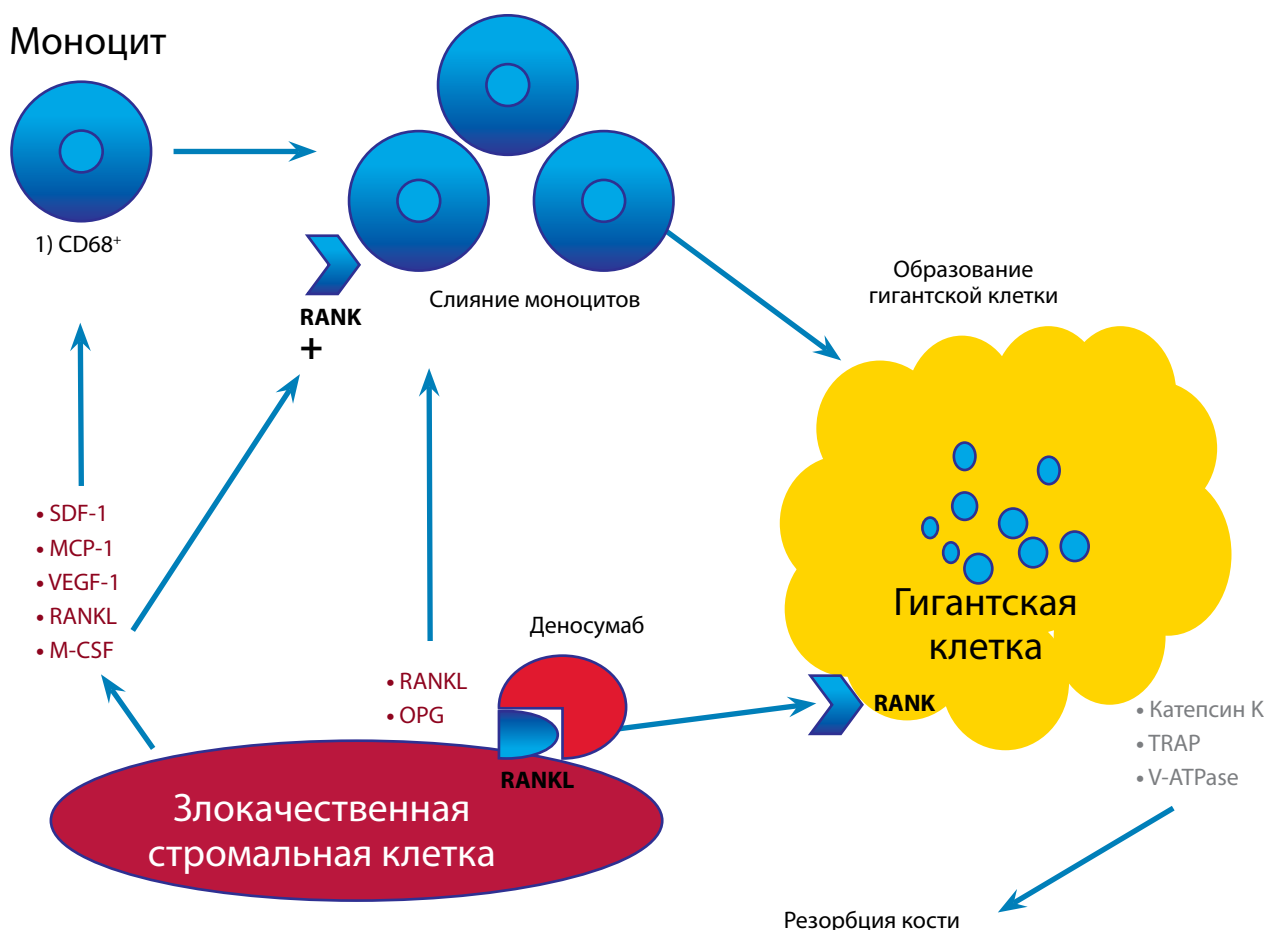


Рис. 2. Роль системы RANK/RANKL/OPG в патогенезе ГКО кости и механизм действия деносумаба на ее остеокластогенную активность

Система RANK/RANKL/OPG как мишень противоопухолевой терапии

Попытки использовать ингибиторы взаимодействия RANK/RANKL для подавления остеокластогенеза и остеолиза при различных патологиях, сопровождающихся деструкцией костной ткани, предпринимаются уже достаточно давно [38, 39]. Так, одним из первых использованных антагонистов RANKL был рекомбинантный OPG (Fc-OPG, Amgen). Впервые эффект этого ингибитора RANKL был продемонстрирован на пациентах с множественной миеломой и РМЖ, осложненными поражением костей [40]. 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. Был разработан другой препарат OPG – CEP-37251 (Cephalon), однако и его исследование I фазы (NCT01159873; прекращено в мае 2014 г.) так и не увенчалось успехом.

Значительно более успешным ингибитором активности сигнального пути RANK/RANKL оказался деносумаб – полностью гуманизированное моноклональное антитело к RANKL (IgG2), связывающее его

с высоким средством и специфичностью, предотвращая тем самым активацию RANK (см. рис. 2) [39]. Деносумаб, первоначально использовавшийся для лечения остеопороза, оказался высокоэффективным при ГКО и в настоящее время является единственным препаратом, рекомендованным FDA (2013 г.), а совсем недавно и Европейским медицинским агентством для лечения этой сложной костной патологии [34]. Показано, что наблюдаемый у значительной доли пациентов клинический эффект сопровождается уменьшением более чем на 90 % числа опухоль-ассоциированных гигантских клеток и снижением числа стромальных клеток [41].

Ингибиторы RANK/RANKL-взаимодействия рассматриваются и в качестве новых подходов к лечению хордом [42] и некоторых доброкачественных поражений костей [33]. Сообщалось также об эффекте деносумаба в комбинации с ингибитором протеинкиназы сорафенибом у пациента с нерезектабельной остеобластомоподобной остеосаркомой [43].

Компоненты системы RANK/RANKL/OPG в периферической крови больных первичными новообразованиями костей

Большинство из достаточно немногочисленных работ о роли системы RANK/RANKL/OPG при пер-

вичных опухолях костей посвящено либо оценке тканевой экспрессии ее компонентов, либо экспериментальным исследованиям на клеточных культурах. В то же время результатов определения концентраций компонентов системы RANK/RANKL/OPG в периферической крови при новообразованиях костей в литературе не представлено. Сложность анализа данных по сыворотке крови заключается в том, что уровни компонентов системы RANK/RANKL/OPG не всегда отражают уровни экспрессии этих белков в опухоли и зависят от целого ряда факторов, также существует ряд методологических сложностей [44, 45].

Так, OPG – это 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 неточно отражать его уровень в пораженной кости. Стандартные иммуноферментные тест-системы обнаруживают все формы циркулирующих фрагментов OPG и RANKL [46]. В свою очередь, методы, основанные на ПЦР, способны выявлять только гомодимерные формы OPG [47]. Сывороточный уровень OPG и RANKL зависит от ряда физиологических факторов, таких как время суток, возраст, пол, менопаузальный статус у женщин [48]. Известно также, что уровень OPG в сыворотке крови увеличивается с возрастом как у женщин, так и у мужчин, а его уровень у женщин с остеопорозом выше, чем в контрольной группе такого же возраста и пола. Он может быть значительно повышен также у пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе. В свою очередь, гормональные изменения в течение беременности и лактации приводят к снижению концентрации OPG в сыворотке крови и могут обуславливать ускоренное ремоделирование костной ткани в данных физиологических условиях. С другой стороны, соотношения уровней маркеров в сыворотке являются, по данным ряда авторов, относительно постоянными величинами [49]. Важно также, что, как бы ни варьировали уровни OPG и RANKL в сыворотке крови, их изменения носят, как правило, противоположный характер [8]. Изучение компонентов системы RANK/RANKL/OPG в периферической крови больных первичными новообразованиями костей, а также учет комплекса факторов, так или иначе связанных с данной сигнальной системой, способны улучшить наше понимание патогенеза этих заболеваний, позволят разработать лабораторные методы прогноза заболевания и выработать тактику лечения таргетными лекарственными препаратами.

Результаты собственных исследований

В лаборатории клинической биохимии РОНЦ им. Н.Н. Блохина проводится сравнительное изучение содержания компонентов системы RANK/RANKL/OPG и связанных с ней цитокинов в сыворотке крови

больных злокачественными, пограничными и доброкачественными новообразованиями костей и анализ взаимосвязи этих показателей с основными клинкоморфологическими характеристиками костных опухолей [50, 51]. В настоящее время обследовано 163 пациента (80 – женского пола в возрасте от 5 до 76 лет и 83 – мужского пола в возрасте от 5 до 70 лет): 101 больной саркомой кости (остеосаркома – 37, хондросаркома – 41, хордома – 12; саркома Юинга – 7, плеоморфная недифференцированная саркома – 2, фибросаркома – 2); 32 – пограничными новообразованиями костей (у всех – ГКО) и 30 пациентов с различными доброкачественными поражениями костей (фиброзная дисплазия, энхондрома, аневризальная костная киста, хондромиксоидная фиброма, остеобластома, костно-хрящевой экзостоз, доброкачественная фиброзная гистиоцитома). В контрольную группу вошли 27 практически здоровых женщин в возрасте от 5 до 75 лет и 44 мужчины в возрасте от 3 до 76 лет. Концентрацию RANK, sRANKL и OPG в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа “RANK ELISA” (USCN Life Science Inc, Китай), “ampli-sRANKL” и “Osteoprotegerin” (Biomedica Medizinprodukte, Австрия).

Измеримые количества RANK выявлены в сыворотке крови менее чем у половины больных злокачественными и доброкачественными новообразованиями костей и пациентов контрольной группы (35, 44 и 34 % соответственно; табл. 1). Несколько чаще этот белок обнаруживался у больных ГКО (52 %), медиана его концентрации в сыворотке крови этих пациентов составила 57 пг/мл. Достоверных различий сывороточных уровней RANK между обследованными группами не выявлено. В то же время уровни sRANKL и OPG в сыворотке крови больных ГКО достоверно повышены относительно контроля. Кроме того, уровень sRANKL у этих пациентов также достоверно выше, чем у больных злокачественными опухолями костей, сывороточный уровень sRANKL у которых наименьший (медиана в 2 раза меньше, чем в контроле, – 0,065 и 0,13 пмоль/л соответственно). Уровень OPG у больных злокачественными и доброкачественными новообразованиями также существенно увеличен по сравнению с контролем, а молярное отношение OPG/sRANKL в сыворотке крови больных всеми типами новообразований костей значительно выше, чем в контроле, причем наиболее высоким оно оказалось у пациентов с доброкачественными поражениями костей (см. табл. 1).

В общей группе больных новообразованиями костей выявлена высокодостоверная положительная корреляция между уровнями OPG и RANK ($r = 0,61$; $p < 0,0001$). При более детальном анализе оказалось, что положительная взаимосвязь между уровнями OPG и RANK наблюдается только у больных ГКО ($r = 0,68$) и злокачественными опухолями ($r = 0,64$), а у пациен-

Таблица 1. Содержание компонентов системы RANK/RANKL/OPG в сыворотке крови практически здоровых людей и больных первичными новообразованиями костей

Группа	Число пациентов	RANK, пг/мл	sRANKL, пмоль/л	OPG, пмоль/л	OPG/sRANKL
Злокачественные опухоли (группа 1)	101	0 (0–804)	0,065 (0–0,33)	3,01 (0,99–4,33)	9,9 (4,4–37,2)
Пограничные опухоли (группа 2)	32	57 (0–1390)	0,20 (0,05–0,49)	3,13 (1,62–4,74)	10,6 (4,9–28,6)
Доброкачественные новообразования (группа 3)	30	0 (0–930)	0,16 (0,02–0,33)	3,01 (1,58–4,29)	14,7 (5,9–46,6)
Практически здоровые люди (контроль)	71	0 (0–133)	0,13 (0–0,32)	1,86 (1,28–3,40)	6,6 (2,7–16,9)
<i>p</i> (критерий Манна–Уитни)		Группа 2 по сравнению с контролем: 0,058	Группа 2 по сравнению с контролем и группой 1: < 0,05	Группа 2 по сравнению с контролем: < 0,05	Группа 3 по сравнению с контролем: < 0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2: представлены медианы и 25–75-й квартили.

Таблица 2. Содержание компонентов системы RANK/RANKL/OPG в сыворотке крови практически здоровых людей и больных саркомами кости в зависимости от гистологического типа опухоли

Группа	Число пациентов	RANK, пг/мл	sRANKL, пмоль/л	OPG, пмоль/л	OPG/sRANKL
Остеосаркома	37	0 (0–61)	0,095 (0–0,32)	1,19 (0,85–3,78)	8,2 (4,4–34,2)
Хондросаркома	41	0 (0–1151)	0,01 (0–0,22)	3,32 (2,30–4,39)	12,7 (7,5–28,6)
Хордома	12	61 (0–816)	0,03 (0–0,22)	4,04 (2,57–4,69)	38,2 (6,8–135)
Саркома Юинга	7	0	0,21 (0,07–0,70)	2,99 (0,64–4,61)	3,7 (3,4–10,7)
Практически здоровые люди (контроль)	71	0 (0–133)	0,13 (0–0,32)	1,86 (1,28–3,40)	6,6 (2,7–16,9)
<i>p</i> (критерий Манна – Уитни)		Все > 0,05	Все > 0,05	Хондросаркома по сравнению с остеосаркомой и контролем: < 0,01; хордома по сравнению с остеосаркомой и контролем: < 0,05	Все > 0,05

тов с доброкачественными новообразованиями она отсутствует. В то же время у больных доброкачественными новообразованиями костей обнаружена отрицательная корреляция между уровнями sRANKL и OPG ($r = -0,50$; $p < 0,05$).

Можно предположить, что при первичных новообразованиях костей происходят существенные нарушения баланса компонентов регулирующей остеокластогенез сигнальной системы RANK/RANKL/OPG, направление и степень выраженности которых зависят от характера новообразования (злокачественное, пограничное или доброкачественное). Наибольшая активность данной системы, выражающаяся в увеличении сывороточной концентрации всех 3 ее компонентов и усилении взаимосвязи между уровнями растворимого рецептора и его природного ингибитора OPG в сыворотке крови, отмечена у больных ГКО.

При сравнении содержания исследованных маркеров в сыворотке крови пациентов с различными

гистологическими вариантами злокачественных опухолей костей достоверные различия были обнаружены только для OPG (табл. 2), уровень которого в сыворотке крови больных хондросаркомой и хордомой выше, чем у больных остеосаркомой и пациентов контрольной группы, и практически не отличается от показателей больных ГКО и доброкачественными новообразованиями костей. Уровень OPG в сыворотке крови пациентов с саркомой Юинга был значительно выше, чем у больных остеосаркомой и в контроле, но различия не достигали статистической значимости. При саркоме Юинга обнаружен также наиболее высокий уровень sRANKL в сыворотке крови (медиана 0,21 пмоль/л, что сравнимо с показателями больных ГКО). В то же время при хондросаркоме и хордоме содержание sRANKL в сыворотке крови пациентов было значительно ниже, чем при других злокачественных новообразованиях костей. Растворимый RANK обнаружен только у 26 % больных остеосаркомой и не выявлен у па-

циентов с саркомой Юинга. Однако он обнаружен в сыворотке крови 48 % больных хондросаркомой и 55 % больных хордомой, что сравнимо с показателями при ГКО. При хордome отмечено также наиболее высокое молярное отношение OPG/sRANKL (медиана – 38,2), в несколько раз превышающее показатели больных другими новообразованиями костей и пациентов контрольной группы.

Таким образом, степень и направление изменений в системе RANK/RANKL/OPG зависят не только от характера новообразований костей (доброкачественные, пограничные или злокачественные), но и от гистологического типа злокачественных опухолей. Интересно отметить, что нарушения баланса RANK/sRANKL/OPG в сыворотке крови наименее выражены у больных остеосаркомой. Можно предположить, что при формировании первичных новообразований в костной ткани в этой системе происходят существенные нарушения. Эти изменения, происходящие, по-видимому, непосредственно в костной ткани, отражаются и на содержании и соотношении концентраций растворимых форм ее основных компонентов

в сыворотке крови пациентов. В то же время нельзя не принимать во внимание тот факт, что сывороточный уровень компонентов системы RANK/RANKL/OPG, как и любых других маркеров, не может быть полностью обусловлен поступлением соответствующего белка из опухолевых клеток [45, 52].

Заключение

Лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG – важное звено ряда патологических процессов, в том числе и онкологических заболеваний, сопровождающихся поражением костной ткани. Изучение роли данной системы при первичных новообразованиях костей представляет актуальную задачу для исследования на клиническом материале, а также открывает перспективы для разработки новых методов диагностики и адресного назначения молекулярно-направленных препаратов, ингибирующих ее активность. Успехи, достигнутые к настоящему времени в лечении ГКО костей анти-RANKL-антителами, свидетельствуют о перспективности этого направления в исследовании первичных новообразований костей.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 15-03-00521).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Dougall W.C. RANKL signaling in bone physiology and cancer. *Curr Opin Support Palliat Care* 2007;1(4):317–22.
- Boyce B.F., Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473(2):139–46.
- Hofbauer L.C., Kuhne C.A., Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004;4(3):268–75.
- Delmas P.D. Clinical potential of RANKL inhibition for the management of postmenopausal osteoporosis and other metabolic bone diseases. *J Clin Densitom* 2008;11(2):325–38.
- Kobayashi Y., Takahashi N. Genomic approaches to bone and joint diseases. Mutations of RANK, OPG and RANKL genes found in humans. *Clin Calcium* 2008;18(2):202–9.
- Whyte M.P., Mumm S. Heritable disorders of the RANKL/OPG/RANK signaling pathway. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004;4(3):254–67.
- Crockett J.C., Mellis D.J., Scott D.I., Helfrich M.H. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int* 2010;22(1):1–20.
- 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;22(2):132–8.
- Whyte M.P. Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF-kappaB signaling. *Ann NY Acad Sci* 2006;1068:143–64.
- Choi H.K., Kang H.R., Jung E. et al. Early estrogen-induced gene 1, a novel RANK signaling component, is essential for osteoclastogenesis. *Cell Res* 2013;23(4):524–36.
- Santini D., Perrone G., Roato I. et al. Expression pattern of receptor activator of NFkappaB (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases. *J Cell Physiol* 2010;226(3):780–4.
- Kwan Tat S., Padrines M., Theoleyre S. et al. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(1):49–60.
- Jimi E., Shin M., Furuta H. et al. The RANKL/RANK system as a therapeutic target for bone invasion by oral squamous cell carcinoma (Review). *Int J Oncol* 2013;42(3):803–9.
- Blake M.L., Tometsko M., Miller R. et al. RANK expression on breast cancer cells promotes skeletal metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2013;31(2):233–45.
- Casimiro S., Mohammad K.S., Pires R. et al. RANKL/RANK/MMP-1 molecular triad contributes to the metastatic phenotype of breast and prostate cancer cells in vitro. *PLoS One* 2013;8(5):e63153.
- Schramek D., Sigl V., Penninger J.M. RANKL and RANK in sex hormone-induced breast cancer and breast cancer metastasis. *Trends Endocrinol Metab* 2011;22(5):188–94.
- Gomez-Veiga F., Ponce-Reixa J., Martinez-Breijo S. et al. Advances in prevention and treatment of bone metastases in prostate cancer. Role of RANK/RANKL inhibition. *Actas Urol Esp* 2012;37(5):292–304.
- Mikami S., Oya M., Mizuno R. et al. Invasion and metastasis of renal cell carcinoma. *Med Mol Morphol* 2013;47(2):63–7.
- Peng X., Guo W., Ren T. et al. Differential expression of the RANKL/RANK/OPG system is associated with bone metastasis in human non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2013;8(3):e58361.
- Brown J.M., Zhang J., Keller E.T. Opg, RANKL, and RANK in cancer metastasis: expression and regulation. *Cancer Treat Res* 2004;118:149–72.
- 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;40(2):471–8.
22. 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;70(15):6150–60.
23. Kukita A., Kukita T. Multifunctional properties of RANKL/RANK in cell differentiation, proliferation and metastasis. *Future Oncol* 2013;9(11):1609–22.
24. 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;28(6):505–14.
25. Mori K., Le Goff B., Berreur M. et al. Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa B. *J Pathol* 2007;211(5):555–62.
26. Mori K., Berreur M., Blanchard F. et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) directly modulates the gene expression profile of RANK-positive Saos-2 human osteosarcoma cells. *Oncol Rep* 2007;18(6):1365–71.
27. 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;56(5):738–43.
28. Mori K., Ando K., Heymann D., Redini 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;24(2):235–42.
29. Rousseau J., Escriou V., Lamoureux F. et al. Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models. *J Bone Miner Res* 2011;26(10):2452–62.
30. 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;111(1):138–47.
31. Wang Z., Ding L., Zhang S. et al. Effects of icariin on the regulation of the OPG-RANKL-RANK system are mediated through the MAPK pathways in IL-1beta-stimulated human SW1353 chondrosarcoma cells. *Int J Mol Med* 2014;34(6):1720–6.
32. Taylor R., Knowles H.J., Athanasou N.A. Ewing sarcoma cells express RANKL and support osteoclastogenesis. *J Pathol* 2011;225(2):195–202.
33. Pelle D.W., Ringler J.W., Peacock J.D. et al. Targeting receptor-activator of nuclear kappaB ligand in aneurysmal bone cysts: verification of target and therapeutic response. *Transl Res* 2014;164(2):139–48.
34. Lopez-Pousa A., Broto J.M., Garrido T., Vazquez J. Giant cell tumour of bone: new treatments in development. *Clin Transl Oncol* 2015;17(6):419–30.
35. Mak I.W., Evaniew N., Popovic S. et al. A translational study of the neoplastic cells of giant cell tumor of bone following neoadjuvant denosumab. *J Bone Joint Surg Am* 2014;96(15):e127.
36. Singh A.S., Chawla N.S., Chawla S.P. Giant-cell tumor of bone: treatment options and role of denosumab. *Biologics* 2015;9:69–74.
37. Ulas A., Bulent Akinci M., Silay K. et al. Denosumab: Excellent response of metastatic giant cell tumor of the bone. *J BUON* 2015;20(2):666–7.
38. Anastasilakis A.D., Toulis K.A., Polyzos S.A., Terpos E. RANKL inhibition for the management of patients with benign metabolic bone disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(8):1085–102.
39. Burkiewicz J.S., Scarpace S.L., Bruce S.P. Denosumab in osteoporosis and oncology. *Ann Pharmacother* 2009;43(9):1445–55.
40. 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;97(3 Suppl):887–92.
41. Branstetter D.G., Nelson S.D., Manivel J.C. et al. Denosumab induces tumor reduction and bone formation in patients with giant-cell tumor of bone. *Clin Cancer Res* 2012;18(16):4415–24.
42. Lam F.C., Arle J.E., Glazer P.A., Kasper E.M. Primary extradural tumors of the spine – case review with evidence-guided management. *Surg Neurol Int* 2014;5(Suppl 7):S373–5.
43. Cathomas R., Rothermundt C., Bode B. et al. RANK ligand blockade with denosumab in combination with sorafenib in chemorefractory osteosarcoma: a possible step forward? *Oncology* 2014;88(4):257–60.
44. Hannon R., Eastell R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int* 2000;11 Suppl 6: S30–44.
45. Findlay D.M., Atkins G.J. Relationship between serum RANKL and RANKL in bone. *Osteoporos Int* 2011;22(10):2597–602.
46. Hawa G., Brinskelle-Schmal N., Glatz K. et al. Immunoassay for soluble RANKL (receptor activator of NF-kappaB ligand) in serum. *Clin Lab* 2003;49(9–10):461–3.
47. Furuya D., Kaneko R., Yagihashi A. et al. Immuno-PCR assay for homodimeric osteoprotegerin. *Clin Chem* 2001; 47(8):1475–7.
48. Mercatali L., Ricci M., Scarpi E. et al. RANK/RANK-L/OPG in patients with bone metastases treated with anticancer agents and zoledronic acid: a prospective study. *Int J Mol Sci* 2013;14(6):10683–93.
49. De Leenheer E., Mueller G.S., Vanderkerken K., Croucher P.I. Evidence of a role for RANKL in the development of myeloma bone disease. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4(4):340–6.
50. Kushlinskii N.E., Timofeev Y.S., Solov'ev Y.N. et al. Components of the RANK/RANKL/OPG system, IL-6, IL-8, IL-16, MMP-2, and calcitonin in the sera of patients with bone tumors. *Bull Exp Biol Med* 2014;157(4):520–3.
51. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Timofeev Y.S. et al. Osteoprotegerin (OPG) – receptor activator of NF-κB (RANK) – RANK ligand (RANKL) signaling system components and pro-inflammatory cytokines in blood serum of patients with primary bone neoplasms. Proceedings of 3rd International Conference on Predictive, Preventive and Personalized Medicine & Molecular Diagnostics, Sept. 01–03, 2015, Valencia, Spain. *J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics* 2015;(2):71.
52. Wagner D., Fahrleitner-Pammer A. Levels of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator for nuclear factor kappa B ligand (RANKL) in serum: are they of any help? *Wien Med Wochenschr* 2010;160(17–18): 452–7.