

Биологическое и клиническое действие абиратерона на антирезорбтивную и анаболическую активность микроокружения костной ткани*

Мишель Иулиани¹, Франческо Пантано¹, Консуэло Буттиглиери², Марко Фиорамонти¹, Валентина Бертаглия², Бруно Винченци¹, Алиса Зокколи¹, Джулия Рибели¹, Марчелло Туччи², Франческа Виньяни², Альфредо Беррути³, Джорджио Витторио Скальотти², Джузеппе Тонини¹, Даниэле Сантини¹

¹ Трансляционная онкологическая лаборатория, Департамент медицинской онкологии, Римский университет Био-Медико, Рим, Италия;

² кафедра онкологии, Туринский университет, Больница Сан-Луиджи, Орбассано (Турин), Италия;

³ отделение оперативной онкологии, Гражданская больница Брешии, Брешиа, Италия

Контакты: Даниэле Сантини d.santini@unicampus.it

Применение абиратерона ацетата (АА) сопровождается не только значимым увеличением выживаемости пациентов с метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (мКРРПЖ), но также отдалением времени до развития рентгенологического прогрессирования заболевания. Эти преимущества относительно костных метастатических очагов могут быть связаны с непосредственным воздействием на метастатические клетки рака предстательной железы в костях или со специфическими механизмами, направленными на костное микроокружение. Чтобы проверить эти гипотезы, мы провели исследование *in vitro*, направленное на оценку потенциального действия АА на первичные остеокласты (ОКЛ)/остеобласты (ОБЛ); *in vivo* оценивали изменения уровней маркеров костного метаболизма, С-концевых телопептидов коллагена 1-го типа (СТХ, маркер костной резорбции) и щелочной фосфатазы (ЩФ) у 49 пациентов с мКРРПЖ, получавших АА.

Наши результаты показали, что АА оказывает статистически значимое ингибирующее действие на дифференцировку и активность ОКЛ, уменьшая экспрессию ОКЛ-маркерных генов TRAP (тарtrate-резистентная кислая фосфатаза), образование катепсина К и матриксной металлопротеиназы-9. Кроме того, АА способствовал дифференцировке ОБЛ и отложению костной матрицы, увеличивая экспрессию специфичных для ОБЛ генов RUNX2 (фактор транскрипции-2, содержащий домен Run1), образование ЩФ и остеокальцина. Также мы наблюдали *in vivo* значимое снижение уровня СТХ в сыворотке и повышение уровня ЩФ у пациентов, получавших АА.

Эти данные позволяют предполагать новый биологический механизм действия АА, состоящий в прямом анаболическом и антирезорбтивном влиянии на костную ткань.

Ключевые слова: абиратерона ацетат, остеокласт, остеобласт, костный маркер

Введение

Существует несколько противоопухолевых лекарственных средств, которые непосредственно влияют на костное ремоделирование, воздействуя на специализированные клетки костной ткани, такие как остеокласты (ОКЛ), остеобласты (ОБЛ), остециты, что обуславливает анаболическое и антикатаболическое терапевтическое действие данных препаратов на костную ткань. В настоящее время лекарственные препараты, воздействующие на костную ткань, находятся на стадиях доклинических и клинических исследований, это, например ингибиторы c-Src, ингибиторы интегринов, ингибиторы катепсина-К, антагонисты рецепторов эндотелина и модуляторы сигнального пути Wnt [1].

Абиратерона ацетат (АА) является селективным ингибитором биосинтеза андрогенов, который актив-

но и необратимо блокирует CYP17. Он снижает продукцию андрогенов в надпочечниках, яичках и клетках предстательной железы, в результате чего уровень андрогенов в сыворотке и в опухоли снижается ниже границы выявления [2, 3]. В исследованиях III фазы у пациентов с метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (мКРРПЖ) было показано, что лечение АА сопровождается не только значимой пользой для выживания [4–6], но также и лучшим контролем боли и отдалением времени до развития рентгенологического прогрессирования заболевания. Влияние АА на костные метастазы может быть следствием системного контроля заболевания в результате непосредственного противоопухолевого эффекта, который, в свою очередь, приводит к разрыву «порочного круга», включающего раковые

* Iuliani M., Pantano F., Buttigliero C. et al. Biological and clinical effects of abiraterone on anti-resorptive and anabolic activity in bone microenvironment. *Oncotarget* 2015;6 (14):12520–8. Настоящая статья находится в открытом доступе и распространяется в соответствии с лицензией Creative Commons «С указанием авторства», которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение в любой среде при условии упоминания авторов и источника.

клетки/ОКЛ/ОБЛ, или, как вариант, специфического воздействия на костное микроокружение. Чтобы проверить эту гипотезу, было разработано трансляционное исследование, цель которого заключалась в изучении потенциального прямого воздействия АА на костную ткань в модели первичных ОКЛ/ОБЛ человека *in vitro* и в проспективной когорте пациентов с мКРРПЖ, у которых в ходе лечения АА определяли маркеры костного метаболизма.

Результаты

Экспрессия Сур17а1 и андрогенного рецептора в ходе дифференцировки ОКЛ и ОБЛ

Экспрессию Сур17а1 оценивали на разных этапах дифференцировки ОКЛ/ОБЛ с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Уровни мРНК ОКЛ оценивали в 3 различных временных точках в рамках протокола дифференцировки – в 0-й день (моноцит), 6-й день (пре-ОКЛ), 12-й день (зрелый ОКЛ), по аналогичной схеме определяли экспрессию ОБЛ: в 0-й день (мезенхимальные клетки), 14-й день (пре-ОБЛ) и 21-й день (зрелый ОБЛ). Сур17А1 экспрессировался на всех этапах дифференцировки ОКЛ/ОБЛ со значимым увеличением уровня матричной РНК (мРНК) на ранней стадии дифферен-

циации ОКЛ (моноциты в сравнении с пре-ОКЛ: $p < 0,001$; моноциты в сравнении с ОКЛ: $p < 0,0001$) (рис. 1). В процессе дифференцировки остеобластов уровни мРНК Сур17а1, напротив, оставались неизменными (см. рис. 1). Оценивали также уровни экспрессии андрогенного рецептора в ходе дифференцировки ОКЛ/ОБЛ, поскольку другие авторы продемонстрировали непосредственное воздействие стероидов на костные клетки [7–12]. Андрогенный рецептор экспрессировался на различных этапах дифференцировки ОКЛ со значимым снижением уровней транскриптов в зрелых ОКЛ (моноциты в сравнении с ОКЛ: $p < 0,001$). Как и в случае с Сур17а1, уровни мРНК андрогенного рецептора оставались стабильными в ходе всех фаз дифференцировки ОБЛ (см. рис. 1).

Влияние АА на дифференцировку и активность первичных ОКЛ при наличии или при отсутствии стероидов

Первичные клетки обрабатывали АА в 2 различных концентрациях – 5 и 10 мкмоль/л, как и в других доклинических исследованиях *in vitro*, в рамках которых концентрация величиной 10 мкмоль/л была максимальной [13–15]. Ни одна из доз не влияла на жизнеспособность ОКЛ. АА добавляли к клеточным культурам ОКЛ каждые 3 дня, дифференцировку ОКЛ оценивали по окончании протокола дифферен-

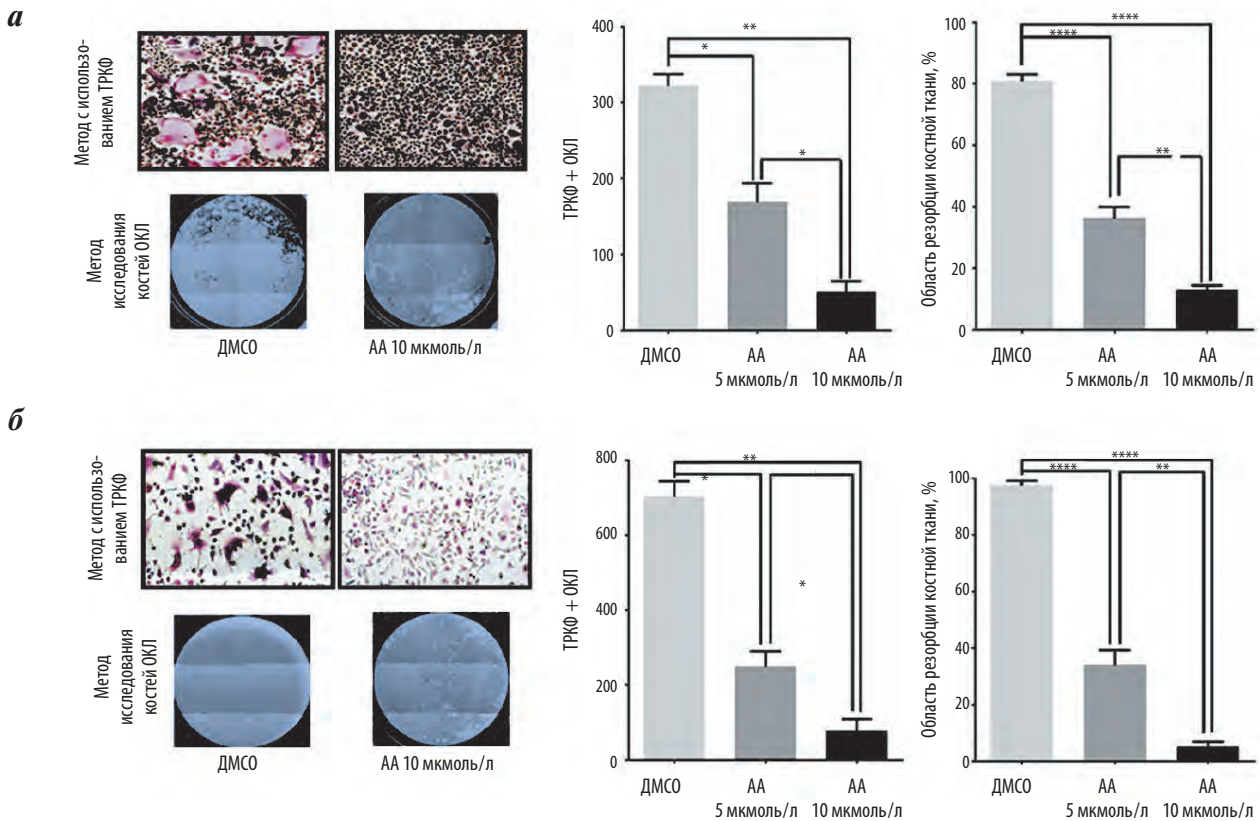


Рис. 1. Влияние обработки абиратероном на первичные ОКЛ. Результаты применения методов ТРКФ и Osteoassay с использованием обработанных и необработанных ОКЛ (ДМСО) при наличии (а) и при отсутствии (б) стероидов. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$. ТРКФ – тетра-резистентная кислая фосфатаза; ДМСО – демтилсульфоксид

цировки (12-й день) с использованием метода определения кислой фосфатазы (МКФ). Обработка АА оказывала статистически значимое ингибирующее действие на созревание ОКЛ, что приводило к уменьшению количества зрелых ОКЛ в сравнении с контрольной группой (диметилсульфоксид, ДМСО) (ДМСО в сравнении с АА в концентрации 5 мкмоль/л: $p < 0,05$; ДМСО в сравнении с АА в концентрации 10 мкмоль/л: $p < 0,001$; АА в концентрации 5 мкмоль/л в сравнении с АА в концентрации 10 мкмоль/л: $p = 0,032$) (см. рис. 1а). Влияние АА на ОКЛ-активность изучали посредством посева моноцитов в лунки, покрытые неорганическим фосфатом кальция, чтобы имитировать костную матрицу, и оценки областей реабсорбции (ямки), образуемой ОКЛ по окончании протокола дифференцировки. АА значимо ингибировал реабсорбцию костной ткани, нарушая функцию остеокластов (ДМСО в сравнении с АА в концентрации 5 мкмоль/л: $p < 0,0001$; ДМСО в сравнении с АА в концентрации 10 мкмоль/л: $p < 0,0001$; АА в концентрации 5 мкмоль/л в сравнении с АА в концентрации 10 мкмоль/л: $p = 0,020$) (см. рис. 1а). Кроме того, влияние АА на дифференцировку ОКЛ и активность также оценивали с использованием сыворотки, которую с применением угля очищали от содержания стероидов в культуральной среде. В этой модели частота встречаемости зрелых ОКЛ значимо повышалась, как и способность этих кле-

ток реабсорбировать костную матрицу ($p < 0,001$) (рис. 2). В данной модели (с использованием МКФ и анализа резорбции) результаты также подтвердили значимое антирезорбтивное действие АА, что позволяет предполагать независимый от андрогенов ингибирующий механизм (см. рис. 1б).

Влияние АА на дифференцировку и активность первичных ОБЛ при наличии или при отсутствии стероидов

Влияние АА на дифференцировку ОБЛ оценивали как при наличии, так и при отсутствии стероидов посредством метода определения щелочной фосфатазы (МЩФ), который позволяет выявить экспрессию щелочной фосфатазы (ЩФ), основного маркера ОБЛ. После обработки АА в ОБЛ, культивированных в среде, содержащей стероиды, отмечалось значимое увеличение экспрессии ЩФ (ДМСО в сравнении с АА в концентрации 5 мкмоль/л: $p = 0,035$; ДМСО в сравнении с АА в концентрации 10 мкмоль/л: $p = 0,30$) (см. рис. 2а). Способность ОБЛ продуцировать костную матрицу анализировали только в присутствии андрогенов, так как депривация стероидов делала клетки неспособными индуцировать отложение фосфата кальция. АА значимо усиливал отложение костной матрицы, окрашиваемой ализариновым красным (ДМСО в сравнении с АА в концентрации 5 мкмоль/л: $p = 0,026$; ДМСО в сравнении с АА в концентрации 10 мкмоль/л: $p = 0,014$) (см. рис. 2а).

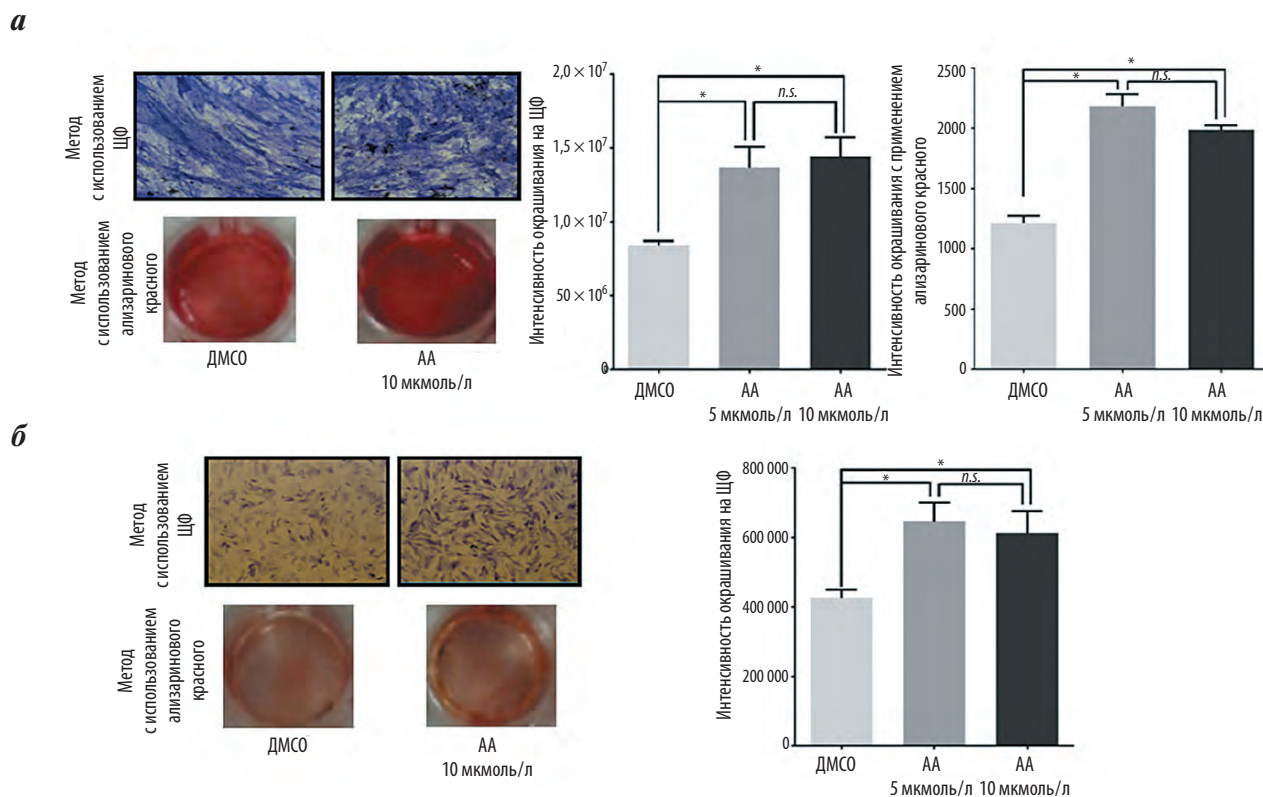


Рис. 2. Влияние АА на первичные ОБЛ. Методы с использованием ЩФ и ализаринового красного применительно к обработанным и необработанным ОБЛ (ДМСО) при наличии (а) и при отсутствии (б) стероидов. * $p < 0,05$

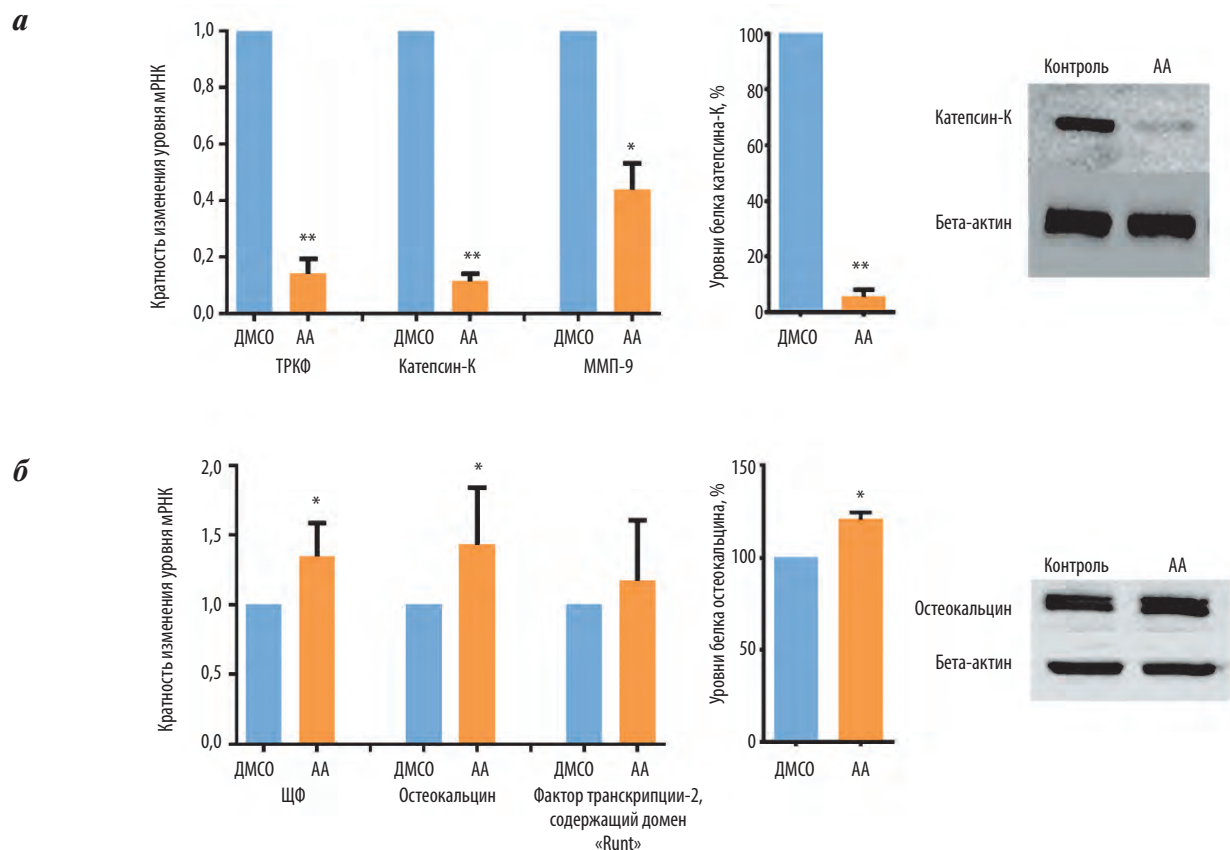


Рис. 3. Анализ экспрессии генов и белков: а – уровни мРНК ТРКФ, катепсина-К и MMP-9 (ПЦР в режиме реального времени) и уровни белка катепсина-К (вестерн-блот) в обработанных и необработанных остеокластах (ДМСО), культивированных со стероидами; б – уровни ЩФ, остеокальцина и фактора транскрипции-2 (ПЦР в режиме реального времени) и уровни белка остеокальцина (вестерн-блот) в обработанных и необработанных остеокластах (ДМСО), культивированных со стероидами. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. MMP-9 – матриксная металлопротеиназа-9

Это доказывает, что ОБЛ в отличие от ОКЛ требуют источника стероидов для достижения полной дифференцировки, хотя обработка АА приводит к значительному усилению дифференцировки в условиях недостатка стероидов, что позволяет предполагать наличие независимого от стероидов анаболического эффекта АА. Действительно, после применения АА процент ЩФ+ОБЛ значимо увеличивался по сравнению с контролем (ДМСО в сравнении с АА в концентрации 5 мкмоль/л: $p = 0,018$; ДМСО в сравнении с АА в концентрации 10 мкмоль/л: $p = 0,020$) (см. рис. 2б).

Влияние АА на маркеры ОБЛ/ОКЛ

По сравнению с исходными значениями АА вызвал значимую отрицательную модуляцию таких маркеров ОКЛ, как кислая фосфатаза ($p < 0,001$), катепсин-К ($p < 0,001$), MMP-9 ($p = 0,015$), и положительную модуляцию экспрессии в ОБЛ генов: ЩФ ($p = 0,015$) и остеокальцина ($p = 0,034$) как при наличии, так и при отсутствии стероидов (рис. 3). Снижение уровня катепсина-К и усиление экспрессии остеокальцина были подтверждены с помощью вестерн-блота (см. рис. 3).

Влияние АА на маркеры костного метаболизма у пациентов с РПЖ

В исследование были включены 49 пациентов, 18 из них наблюдались в течение 10 мес после окончания лечения. Характеристики пациентов представлены в табл. 1. Средний возраст составил 67 лет. У 16 из них сумма баллов по шкале Глисона (индекс Глисона) составила 7, у 6 < 7, у 23 > 7. У 16 пациентов имели место метастазы в кости, у 18 – в кости и лимфатические узлы, у 9 пациентов – в лимфатические узлы, у 3 – в кости и внутренние органы, у 1 – во внутренние органы, у 1 – в кости, лимфатические узлы и внутренние органы, у 1 – метастазы в кости и местный рецидив. Двадцать пациентов начали прием золедроновой кислоты по меньшей мере за 3 мес до начала лечения АА. Медиана полученных доз золедроновой кислоты до начала терапии АА составила 12.

Наблюдалось значимое снижение уровней С-концевых телопептидов коллагена 1-го типа (СТХ): исходно медиана составляла 0,86 нг/мл (95 % доверительный интервал (ДИ) 0,84–1,25), а через 3, 6 и 9 мес – 0,78 нг/мл (95 % ДИ 0,67–1,01; $p = 0,077$), 0,61 нг/мл (95 % ДИ 0,73–1,19; $p = 0,027$)

Таблица 1. Характеристики пациентов (средний возраст 67 лет)

Показатель	Число пациентов, n
Индекс Глисона	
7	16
< 7	6
> 7	23
неизвестен	4
Метастазы	
кости	16
кости и лимфатические узлы	18
лимфатические узлы	9
кости и внутренние органы	3
внутренние органы	1
кости, внутренние органы и лимфатические узлы	1
кости и местный рецидив	1
Применение золедроновой кислоты в ходе лечения АА	20
Функциональный статус по шкале ECOG	
0	31
1	15
2	3

Таблица 2. Разница медианного уровня маркеров резорбции и образования костной ткани

Показатель	Исходно	Через 3 мес	Через 6 мес	Через 9 мес
СТХ				
Медиана, 95 % ДИ, нг/мл	0,86 (0,84–1,25)	0,78 (0,67–1,01)	0,61 (0,73–1,19)	0,66 (0,38–0,71)
p (при сравнении с исходным уровнем)		0,077	0,027	0,006
ЩФ				
Медиана, 95 % ДИ, Ед/л	123 (126–261)	143 (255–382)	126 (200–327)	190 (172–344)
p (при сравнении с исходным уровнем)		0,01	0,62	0,28

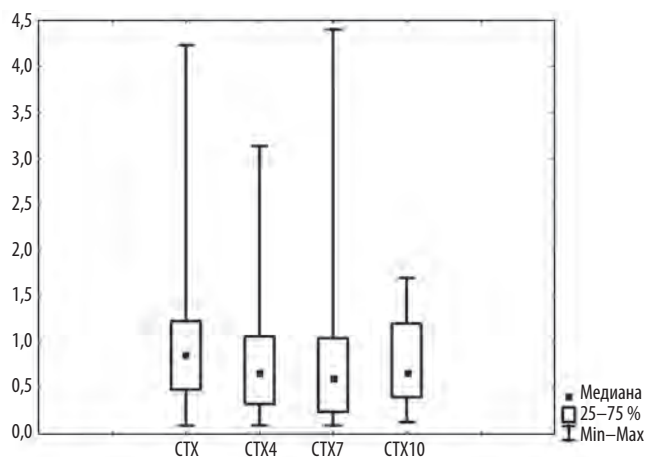


Рис. 4. Сравнение уровней СТХ исходно, через 3, 6 и 9 мес с использованием графика «ящик с усами»

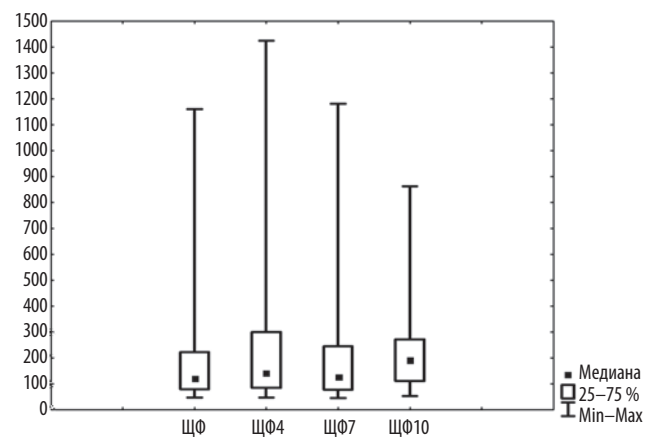


Рис. 5. Сравнение уровней ЩФ исходно, через 3, 6 и 9 мес с использованием графика «ящик с усами»

и 0,66 нг/мл (95 % ДИ 0,38–0,71; $p = 0,006$) соответственно (табл. 2, рис. 4). По сравнению с исходной медианой по прошествии 3, 6 и 9 мес отмечалось снижение уровня СТХ на 9,3; 29 и 23 % соответственно.

Уровень ЩФ составил 123 Ед/л (95 % ДИ 126–261) и 190 Ед/л (95 % ДИ 172–344) исходно и по прошествии 9 мес ($p = 0,28$) соответственно. Сравнение уровней ЩФ исходно и по прошествии 3 мес показало значимое повышение ($p = 0,010$) (табл. 2, рис. 5). По сравнению с исходной медианой по прошествии 3, 6 и 9 мес отмечалось повышение уровня ЩФ на 16,3; 2,4 и 54,5 % соответственно.

Обсуждение

Результаты настоящего исследования впервые продемонстрировали непосредственное анаболическое и антирезорбтивное воздействие АА на костную кань *in vitro* и у пациентов с мКРРПЖ *in vivo*. Действительно, АА способен специфически модулировать дифференцировку ОКЛ/ОБЛ без какого-либо цитотоксического и/или пролиферативного эффекта в применяемых дозах. Кроме того, по нашим данным, АА регулирует экспрессию генов в клетках костной ткани, модулируя уровни мРНК ключевых генов ОКЛ/ОБЛ. Интересно отметить, что анаболические и антирезорбтивные эффекты отмечаются как при наличии, так и при отсутствии стероидов, что позволяет предполагать неканонический механизм действия, который представляется по меньшей мере как частично независимый от андрогенов.

Недавно R.D. Bruno и соавт. сообщили об альтернативном механизме действия после анализа влияния АА и других специфических ингибиторов СУР17

на линию андрогеннезависимых клеток рака предстательной железы (РПЖ) (РС-3) [16]. Применение лекарственного средства индуцировало быстрое высвобождение кальция из эндоплазматического ретикулума (ЭР), что приводило к нарушению кальциевого гомеостаза. Это, в свою очередь, обуславливало стрессовый ответ ЭР, также известный как «реакция неструктурированных белков», который осуществлялся посредством фосфорилирования фактора элонгации трансляции eIF2 α и положительной модуляции генов реакции на стресс с итоговой остановкой клеточного цикла. Кроме того, недавние данные свидетельствуют, что фосфорилирование eIF2 α способствует активации ATF4, ключевого транскрипционного фактора ОБЛ, что приводит к положительной модуляции остеокальцина и отрицательной модуляции ключевого про-остеокластного фактора NFATc1, в результате чего происходит продукция костной матрицы [17]. При совокупном анализе эти данные позволяют предположить новый потенциальный молекулярный механизм, действуя посредством которого, АА, фосфорилируя eIF2 α , может способствовать обстеобластогенезу и ингибировать зависимую от ОКЛ резорбцию кости. Эти обнадеживающие результаты, полученные *in vitro*, позволили дать убедительное обоснование целесообразности разработки трансляционного исследования для изучения потенциальной модуляции сывороточных маркеров костного метаболизма при лечении с применением АА когорты из 49 пациентов с мКРРПЖ. Наши результаты показали, что у этих пациентов абиратерон значительно ингибировал костную резорбцию, о чем свидетельствовало снижение уровня СТХ в сыворотке, и усиливал неоостеогенез, что подтверждалось повышением уровня ШФ, и это согласуется с данными, полученными *in vitro*.

В целом наши доклинические и клинические данные дают биологическое обоснование высокой эффективности лечения с применением АА, выражаемой в улучшении нескольких специфических клинических конечных точек со стороны скелета, что было недавно установлено в клинических исследованиях III фазы.

Молекулы, которые одновременно воздействуют на клетки РПЖ и костную микросреду, могут значительно повлиять на будущие подходы к терапии, что обеспечит лучший контроль в лечении заболевания при РПЖ с метастазами в кости. Если в дальнейшем будет получено перспективное подтверждение, то данные значимые результаты будут свидетельствовать в пользу синергетического эффекта АА и лекарственных средств, специфически воздействующих на костную ткань (бисфосфонатов и деносумаба).

В заключение хотелось бы сказать, что эти результаты представляют собой первые свидетельства нового механизма действия АА, направленного на костное

микроокружение (вместе с известным противоопухолевым действием на клетки мКРРПЖ), и прокладывают путь к новым сценариям лечения метастазов РПЖ в кости.

Материалы и методы

Первичная культура клеток

Мононуклеарные клетки периферической крови получали из лейкоцитарной массы 10 здоровых доноров мужского пола по градиенту плотности Lympholyte[®]-H (Cedarlane Laboratories), а моноциты отсортировывали с помощью гранул, конъюгированных с антителами к CD14 человека (Miltenyi Biotech), а затем культивировали в течение 12 дней в культуральной среде RPMI (Euroclone) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Hyclone, Thermo Scientific), 10 % очищенной на угле сывороткой (Sigma-Aldrich) со 100 Ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (Euroclone), 2 ммоль/л L-глутамин (Euroclone), 25 нг/мл макрофагального колониестимулирующего фактора и 50 нг/мл лиганда рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В (RANKL) (R&D Systems), чтобы дифференцировать их от ОКЛ. В ходе осуществления протокола дифференцировки (в 1–12-й дни) клетки обрабатывали АА в концентрации 5–10 мкмоль/л (Selleckem) или балластным веществом в качестве контроля.

Первичные ОБЛ человека дифференцировали от мезенхимальных стволовых клеток человека (МСКЧ), предоставленных лабораторией клеточных культур кафедры биомедицины и профилактики Университета Тор Вергата (Рим). МСКЧ культивировали в течение 21 дня в среде альфа-МЕМ (Euroclone), обогащенной 15 % фетальной бычьей сывороткой или 15 % очищенной на угле сывороткой, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 2 ммоль/л L-глутамин, 10 ммоль/л бета-глицеролфосфата (Sigma-Aldrich), 50 мкмоль/л аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich) и 100 нмоль/л дексаметазона (Sigma-Aldrich). В ходе осуществления протокола дифференцировки (в 1–21-й дни) клетки обрабатывали АА в концентрации 5–10 мкмоль/л (Selleckem) или балластным веществом в качестве контроля.

Все культуральные среды, факторы роста, цитокины и АА меняли каждые 3–4 дня [18, 19].

Функциональный анализ ОКЛ

По окончании осуществления протокола дифференцировки (12-й день) культуральную среду удаляли и клетки фиксировали в 4 % формальдегиде в течение 5 мин, а также окрашивали с использованием набора ТРКФ (Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкциями производителя. После этого подсчитывали окрашенные клетки (> 3 ядер) [20].

Активность ОКЛ оценивали посредством культивирования клеток на планшетах, покрытых синтетической неорганической матрицей, имитирующей

костную (Osteoassay, Corning). На 12-й день культивирования среду удаляли, а планшеты заполняли раствором натрия гипохлорида, чтобы оценить способность зрелых ОКЛ реабсорбировать этот субстрат; ямки, образованные в результате реабсорбционной активности ОКЛ, подсчитывали с использованием программного обеспечения ImageJ.

Функциональные анализы ОБЛ

На 21-й день клетки фиксировали в 4 % формальдегиде в течение 5 мин и окрашивали с использованием набора ЩФ (Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкциями производителя. Окрашивание ЩФ количественно оценивали с использованием программного обеспечения ImageJ.

Чтобы обнаружить отложение костной матрицы как маркера активности ОБЛ, клетки фиксировали в 4 % формальдегиде в течение 20 мин и окрашивали ализариновым красным в течение 1 ч при комнатной температуре. Флуоресценцию ализаринового красного регистрировали при длине волны 470 нм и количественно определяли с помощью спектрофлуориметра (Tecan Infinite M200Pro) [19].

Анализ МТТ

Жизнеспособность клеток оценивали с использованием набора определения роста клеток, анализа на основе МТТ (Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкциями производителя; оптическую плотность образовавшегося цветного комплекса определяли с использованием спектрофотометра при длине волны 570 нм с вычитанием фонового поглощения при длине волны 690 нм.

Экстракция РНК и анализ экспрессии генов

РНК экстрагировали из ОКЛ и ОБЛ по окончании протокола дифференцировки с использованием реагента Тризола (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. РНК обрабатывали буфером ДНКазы и ДНКазой (DNase Turbo, Эпплайд Байосистемз), чтобы избежать контаминации геномной ДНК. Комплементарную ДНК получали с использованием набора обратной транскрипции (Applied Biosystems) в соответствии с инструкциями производителя. Уровни мРНК измеряли при помощи количественной ПЦР в реальном времени с использованием тестов экспрессии генов TaqMan в рамках системы «7900HT» ПЦР в реальном времени (Applied Biosystems). Уровни экспрессии TRAP (Hs00356261_m1), катепсина-К (Hs00166156_m1), ММП-9 (Hs00234579_m1), ЩФ (Hs01029144_m1), остеокальцина (Hs00234160_m1) и фактора транскрипции-2, содержащего домен Runt (RUNX2) (Hs00231692_m1), были нормализованы по эндогенному конститутивному гену глюкоксидазы-бета (GUSB) (Hs99999908_m1) в образцах, подвергавшихся и не подвергавшихся обработке, с расчетом Δ СТ. Затем относительные уровни экспрессии в обработанных образцах были нормали-

зованы по уровням мРНК, обнаруженным в контрольных образцах, с расчетом $\Delta\Delta$ СТ [21].

Экстракция белка и анализ вестерн-блот

Клеточные лизаты получали с использованием анализа буфера радиоиммунопреципитации (анализа RIPA) (Sigma-Aldrich) и количественно оценивали с использованием набора для анализа белков DC (совместимость с детергентом) (Bio-Rad). Из каждого образца 20 мг общего белкового экстракта загружали в 8 %/15 % полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия и переносили на нитроцеллюлозные мембраны с использованием системы передачи Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad) и инкубировали в блокирующий буфер (TBST 1X с 5 % обезжиренным сухим молоком) в течение 1 ч. Мышинные моноклональные антитела к катепсину К (Santa Cruz Biotechnologies), кроличьи поликлональные антитела к остеокальцину человека (Santa Cruz Biotechnologies) и мышинные антитела к актину-бета человека (Sigma-Aldrich) инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Применяли антикроличьи/антимышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Abcam), а хемилюминесцентный сигнал обнаруживали с использованием программного обеспечения ChemiDoc (Bio-Rad) и Quantity One (Bio-Rad) для подсчета интенсивности сигнала зон.

Пациенты

Проводили проспективное обследование пациентов с мКРРПЖ с метастазами в кости в состоянии клинического прогрессирования после лечения с применением доцетаксела, включенных в расширенную программу получения АА в отделении медицинской онкологии Больницы Сан-Луиджи (Орбассано). АА применяли в дозе 1000 мг в день в комбинации с преднизолоном в дозе 5 мг 2 раза в день и аналогами лютеинизирующего гормона рилизинг-гормона до рентгенологического прогрессирования. Подгруппа пациентов получала также лечение золедроновой кислотой в стандартных неизменных дозах в последние 3 мес до начала применения АА. Всех пациентов обследовали на предмет образования и резорбции костной ткани.

Уровни ЩФ в сыворотке в качестве маркера активности ОБЛ и СТХ в сыворотке в качестве маркера резорбции костей оценивали каждые 3 мес в центральной лаборатории Больницы Сан-Луиджи Орбассано. Общий уровень ЩФ определяли с помощью стандартных автоматизированных аналитических процедур (Architect, Abbott), нормальный диапазон составлял от 30 до 120 Ед/л. Уровни СТХ в сыворотке измеряли с помощью коммерческого набора для иммуноферментного анализа (IDS-ISYS СТХ-I, Immunodiagnostic Systems Ltd.). Нормальные значения, минимальные определяемые концентрации, внутри- и межтестовые коэффициенты вариации СТХ были следующими: 0,12–0,75; 0,023 нг/мл; 3,2 и 6,3 % соответственно.

Статистический анализ

Данные, полученные *in vitro*, анализировали с использованием t-критерия Стьюдента и однофакторного вариационного анализа ANOVA с последующими многократными сравнительными тестами Тьюки. Обработка графиков и статистические тесты проводили с использованием программы GraphPad Prism.

Благодарность

Благодарим доктора Франческу Агостини из лаборатории клеточных культур кафедры биомедицины и профилактики Университета Тор Вергата за предоставленные МСКЧ.

Финансирование

Исследование проводилось без каких-либо сторонних финансовых средств или грантов.

Конфликт интересов

Авторы статьи не заявляют о каком-либо конфликте интересов.

При анализе маркеров использовали парный знаковый ранговый критерий Вилкоксона для сравнения парных данных исходно, а также по прошествии 3, 6 и 9 мес лечения. Все сообщаемые величины *p* были двусторонними; величины *p* < 0,05 были выбраны при определении статистической значимости. Статистический расчет проводили с использованием пакета программ SPSS для операционной системы Windows.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Santini D., Galluzzo S., Zoccoli A. et al. New molecular targets in bone metastases. *Cancer Treat Rev* 2010;36(Suppl 3):6–10.
- O'Donnell A., Judson I., Dowsett M. et al. Hormonal impact of the 17alpha-hydroxylase/C(17,20)-lyase inhibitor Abiraterone acetate (CB7630) in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 2004;90:2317–25.
- Barrie S.E., Potter G.A., Goddard P.M. et al. Pharmacology of novel steroidal inhibitors of cytochrome P450(17) alpha (17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase). *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994;50:267–73.
- De Bono J.S., Logothetis C.J., Molina A. et al. AA and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2011;364:1995–2005.
- Fizazi K., Scher H.I., Molina A. et al. Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Lancet Oncol* 2012;13:983–92.
- Ryan C.J., Smith M.R., de Bono J.S. et al. AAraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *N Engl J Med* 2013;10;368:138–48.
- Kawano H., Sato T., Yamada T. et al. Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9416–21.
- Wiren K.M., Semirale A.A., Zhang X.W. et al. Targeting of androgen receptor in bone reveals a lack of androgen anabolic action and inhibition of osteogenesis: a model for compartment-specific androgen action in the skeleton. *Bone* 2008;43:440–51.
- Chiang C., Chiu M., Moore A.J. et al. Mineralization and bone resorption are regulated by the androgen receptor in male mice. *J Bone Miner Res* 2009;24:621–31.
- Falahati-Nini A., Riggs B.L., Atkinson E.J. et al. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest* 2000;106:1553–60.
- Kousteni S., Chen J.R., Bellido T. et al. Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science* 2002;298:843–6.
- Kousteni S., Bellido T., Plotkin L.I. et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001;104:719–30.
- Duc I., Bonnet P., Duranti V. et al. In vitro and in vivo models for the evaluation of potent inhibitors of male rat 17alpha-hydroxylase/C17,20-lyase. *J Steroid BiochemMol Biol* 2003;84:537–42.
- Richards J., Lim A.C., Hay C.W. et al. Interactions of AAraterone, eplerenone, and prednisolone with wild-type and mutant androgen receptor: a rationale for increasing AAraterone exposure or combining with MDV3100. *Cancer Res* 2012;72:2176–82.
- van Soest R.J., van Royen M.E., de Morré E.S. et al. Cross-resistance between taxanes and new hormonal agents AAraterone and enzalutamide may affect drug sequence choices in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur J Cancer* 2013;49:3821–30.
- Bruno R.D., Gover T.D., Burger A.M. et al. 17alpha-hydroxylase/17, 20 lyase inhibitor VN/124-1 inhibits growth of androgen-independent prostate cancer cells via induction of the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cancer Ther* 2008;7:2828–36.
- Hamamura K., Tanjung N., Yokota H. Suppression of osteoclastogenesis through phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha. *J Bone Miner Metab* 2013;31:618–28.
- Susa M., Luong-Nguyen N.H., Cappellen D. et al. Human primary osteoclasts: in vitro generation and applications as pharmacological and clinical assay. *J Transl Med* 2004;2:6.
- He W., Mazumder A., Wilder T., Cronstein B.N. Adenosine regulates bone metabolism via A1, A2A, and A2B receptors in bone marrow cells from normal humans and patients with multiple myeloma. *FASEB J* 2013;27:3446–54.
- Yen M.L., Hsu P.N., Liao H.J. et al. TRAF-6 dependent signaling pathway is essential for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces osteoclast differentiation. *PLoS One* 2012;7:e38048.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402–8.