

# Роль системы RANK/RANKL/OPG в патогенезе первичных и метастатических опухолей костей

Кушлинский Н.Е., Тимофеев Ю.А.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,  
115446, Москва, Каширское ш., 24; e-mail: biochimia@yandex.ru

*Система RANK/RANKL/OPG — важный элемент костного гомеостаза, обеспечивающий процесс ремоделирования костной ткани. Нарушения в работе системы могут обуславливать патогенез ряда патологических состояний, в том числе и онкологических. В обзоре рассматриваются механизмы работы системы, приведены основные принципы ее функционирования и клиническое значение. Особое внимание уделяется значению системы RANK/RANKL/OPG в развитии метастазов в кости и при первичных опухолях костей.*

**Ключевые слова:** RANK, RANKL, OPG, саркома, метастазы, опухоль кости, гомеостаз

## Введение

Костная ткань — динамическая структура, постоянно изменяющаяся в ответ на механические стрессы и гормональные изменения [2]. Одним из ключевых звеньев гомеостаза костной ткани является система RANK/RANKL/OPG. Дефекты, связанные с функционированием системы RANK/RANKL/OPG, играют роль в развитии ряда патологических процессов, ассоциированных с ремоделированием костной ткани. Имеются данные о вовлеченности рассматриваемой сигнальной системы в патогенез первичных новообразований костей, а также в развитие костных метастазов.

Контроль костного ремоделирования осуществляется остеобластами, ответственными за производство нового костного вещества, и остеокластами — специализированными клетками гемопоэтического происхождения, отвечающими за резорбцию неорганического и органического костного матрикса. Функции остеобластов и остеокластов в нормальной костной ткани скоординированы.

В регуляции функциональной активности остеокластов принимают участие следующие факторы:

- 1) интерлейкины (IL-1, 6, 11);
- 2) колониестимулирующие факторы;
- 3) паратиреоидный гормон (PTH);
- 4) 1,25-дигидроксивитамин D3;
- 5) кальцитонин и др.

По последним данным литературы [8], ключевым молекулярным звеном в формировании остеокластов, их функционировании и клеточном выживании, является система рецептора активатора ядерного транскрипционного фактора капша В — RANK, состоящая, соответственно, из самого рецептора, его лиганда RANKL и остеопротегерина (OPG). RANKL является членом суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей (TNF), а RANK — рецептором, родственным рецептору TNF (TNFR) [20].

RANKL экспрессируется костными стромальными клетками остеобластной линии, а RANK, в свою очередь, — предшественниками остеокластов миелоидного происхождения. Взаимодействие лиганда и рецептора RANK необходимо для дифференцировки, выживания и активации остеокластов. В результате взаимодействия RANK и RANKL происходит запуск ряда транскрипционных факторов, стимулирующих остеокластогенез [3].

Например, в экспериментах на моделях подавление как RANK, так и RANKL приводило к значительному остеопетрозу в результате недостаточности остеокластов, а также нарушению резорбции костной ткани [25], что свидетельствует о вовлеченности данной сигнальной системы в процесс ремоделирования костей.

Следующий компонент системы RANK/RANKL/OPG — остеопротегерин (OPG). OPG — является членом суперсемейства TNFR, который экспрессируется остеобластами. По своей природе остеопротегерин является растворимым рецептором, который способен связывать RANKL и выполняет функцию рецепторной ловушки для данного лиганда.

Значительная роль OPG в остеокластогенезе и ремоделировании костной ткани впервые показана на модели трансгенных мышей с чрезмерной экспрессией OPG, у которых наблюдали увеличение массы костной ткани в результате снижения количества остеокластов. Это может свидетельствовать о том, что взаимодействие RANKL и OPG ингибирует пролиферацию остеокластов, а также их дифференцировку, что, в конечном итоге, предотвращает резорбцию костной ткани.

Сохранение точного и сбалансированного взаимодействия RANK, RANKL и OPG критично для остеокластогенеза и, как следствие, поддержания гомеостатического ремоделирования костной ткани. Полагают, что данный регуляторный механизм может быть нарушен в ходе таких процессов, как остеопороз или опухоль-индуцированное разрушения костной ткани.

## Сывороточный OPG и растворимая форма RANKL (sRANKL)

Остеопротегерин является гликопротеином, который циркулирует в крови в форме мономера или гомодимера и может быть связан с RANKL. Помимо костей, OPG продуцируется в различных тканях и органах: коже, желудке, кишечнике, легких, сердце и плаценте, поэтому сывороточные концентрации остеопротегерина могут не точно отражать его уровень в пораженной кости. Стандартные иммуноферментные тест-системы обнаруживают все формы циркулирующих фрагментов OPG [14]. В свою очередь, методы, основанные на ПЦР, способны выявлять только гомодимерные формы остеопротегерина [12].

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 [15]. Некоторые исследования [21] 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 контрольной группе такого же возраста и пола [32]. 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 концентрации OPG в сыворотке крови и могут обуславливать ускоренное remodelирование костной ткани в данных физиологических условиях. Важным фактом является то, что как бы ни варьировали показатели OPG и RANKL в сыворотке крови, изменения их уровней носят противоположный характер [19].

Исходя из вышеприведенных данных, 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 исследования различных патологий, в то время как их значимость для обследования отдельных пациентов еще предстоит изучить [44]. Также стоит отметить важность исследования соотношения OPG/RANKL, которое, является более постоянным и показывает зависимость от клинической картины.

#### Генетические нарушения в системе RANK/RANKL/OPG

Известен ряд мутаций гена, кодирующего остеопротегерин, которые могут приводить к аномалиям связывания RANKL, в результате чего развиваются заболевания с рядом специфических фенотипических проявлений [26].

Например, ювенильная болезнь Педжета (JPD) — 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, кодирующем OPG — *TNFRSF11B*, локализованном в хромосоме 8q24.2. Одним

из предположительных механизмов действия мутации, которая наблюдается в наиболее тяжелых случаях, является взаимодействие аминокислотные 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 экзона 5 данного гена наблюдали при мягких формах патологии.

RANK кодируется геном *TNFRSF11A*, локализованным в 18 хромосоме. Мутации в данном гене могут поражать сигнальный пептидный участок белка RANK. В результате этого нарушения в структуре пептида происходит усиление сигнальной функции данного рецептора. Описываемая активирующая мутация может проявляться в следующих патологических состояниях:

1) ранняя костная болезнь Педжета (PDB2) — гетерогенное аутосомно-доминантное нарушение скелета, которое характеризуется деформацией костей, нарушениями слуха, стоматологическими проблемами. Скелетные проявления могут манифестировать в возрасте до 10 лет и прогрессировать в течение всей жизни. Генетическая природа этой патологии заключается в наличии тандемной дупликации 27-bp в гене *TNFRSF11A*, кодирующем RANK;

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. Скелетные симптомы начинаются с пубертатного периода и прогрессируют до среднего возраста. Генетическая причина данного состояния заключается в наличии тандемной дупликации 15-bp в гене *TNFRSF11A* [46];

3) семейный экспансильный остеолит — аутосомно-доминантное заболевание, которое проявляется с раннего детства до раннего зрелого возраста нарушениями слуха. Остеопения и аномалии зубов наблюдаются при данной патологии реже. Генетической причиной данной аномалии является активирующая мутация, заключающаяся в тандемной дупликации 18-bp в гене *TNFRSF11A* [47].

Генетические аномалии в системе RANK/RANKL/OPG представлены в таблице.

Таблица

Генетические патологии, ассоциированные с системой RANK/RANKL/OPG

Заболевания	Генетическая природа	Клинические проявления
Ювенильная болезнь Педжета (JPD)	Аутосомно-рецессивный тип наследования. Хромосома <b>8q24.2</b> . Делеция в гене <i>TNFRSF11B</i> .	Нарушения слуха Остеопения Нарушения моторики Деформация костей Гиперкальциурия
Ранняя костная болезнь Педжета (PDB2)	Аутосомно-доминантный тип наследования. Хромосома <b>18q21-22</b> . Инсерционная мутация <b>27-bp</b> в <i>TNFRSF11A</i> .	Аномалии развития зубов Нарушения слуха в раннем возрасте Боль и деформации в области таза Гиперкальциемия
Экспансильная скелетная гиперфосфатемия	Аутосомно-доминантный тип наследования. Хромосома <b>18q21-22</b> . Инсерционная мутация <b>15-bp</b> в <i>TNFRSF11A</i> .	Ранняя глухота Ранняя потеря зубов Деформации лица и пальцев Генерализованные скелетные боли Эпизодическая гиперкальциемия
Экспансильный семейный остеолит	Аутосомно-доминантный тип наследования. Хромосома <b>18q21-22</b> . Инсерционная мутация <b>18-bp</b> в <i>TNFRSF11A</i> .	Глухота в детстве Дефекты зубов Боль и деформации костей

## Клинические состояния, ассоциированные с изменением системы RANK/RANKL/OPG

Существует ряд заболеваний, при которых система RANK/RANKL/OPG играет значительную роль в патогенезе. Первым рассматриваемым нами состоянием является *постменопаузальный остеопороз*. Так, в экспериментах *in vitro* на клеточных линиях человеческих остеобластов, получено зависимое от дозы и времени воздействие увеличения мРНК OPG в ответ на введение  $17\beta$ -эстрадиола. Известно, что введение OPG способно предотвращать потерю костной массы у крыс с удаленными яичниками. Кроме того, повышенная экспрессия RANKL была выявлена в костной ткани женщин в постменопаузе, не получавших заместительной терапии, в сравнении с теми, которым проводили терапию эстрогенами [9].

Критическая роль системы RANK/RANKL/OPG при *глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе* была показана в клинических исследованиях, проведенных на пациентах с болезнью Крона и гломерулонефритами, которым проводили лечение глюкокортикоидами. Соотношение RANKL/OPG в сыворотке крови у них было достоверно повышено, и эти изменения коррелировали с повышением уровней сывороточных маркеров костной резорбции и соответствующих маркеров в моче [45].

Дисбаланс системы RANK/RANKL/OPG может быть вовлечен и в процессы кальцификации при атеросклерозе [31]. Например, у мышей с отключенным геном OPG выявлены накопления кальция в аорте и почечных артериях. С другой стороны, повышенные уровни экспрессии RANK и RANKL обнаружены в кальцифицированных артериях на моделях млекопитающих. Согласно некоторым авторам [27], возрастание сывороточной концентрации OPG в старшем возрасте, может служить адаптивным механизмом, при помощи которого осуществляется контроль кальцификации сосудов.

Система RANK/RANKL/OPG также вовлечена в развитие ревматоидного артрита. В синовиальной жидкости пациентов с этим заболеванием Т-лимфоциты способны экспрессировать RANKL в местах резорбции костей. Повышенные уровни растворимого лиганда sRANKL и OPG выявлены и в сыворотке больных ревматоидным артритом, при этом их уровни нормализуются после проведения анти-TNF терапии [51].

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

Изменения баланса костного ремоделирования и формирования остеокластов лежат в основе 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 зависеть от типа опухоли, поражающей кость, а также от индивидуальных особенностей конкретной опухоли [21]. При этом все многообразие сигналов 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 опухоли OPG, выполняющего функцию «ловушки» для RANKL, может быть снижена путем уменьшения синтеза данного рецептора или активации его деградации [33].

Некоторые факторы при метастатическом поражении костей могут оказывать двойное влияние на соотношение RANKL/OPG. Такие вещества, как PTHrP, IL-1, простагландин E<sub>2</sub> способны стимулировать активность остеокластов 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 [42]. Например, клетки множественной миеломы могут индуцировать усиление продукции RANKL Т-лимфоцитами [13]. Однако доказательства влияния Т-лимфоцитов на развитие метастатического поражения костей в настоящее время немногочисленны и получены только на предклинических моделях. В свою очередь, увеличение содержания RANKL, которое ведет к опухоль-индуцируемому остеокластогенезу, не лимитируется клетками иммунной системы.

Повышенная экспрессия RANKL была выявлена при раке молочной железы (PMЖ), раке простаты (РП), почки и множественной миеломе. Продуцируемый опухолевыми клетками RANKL способен усиливать процессы остеокластогенеза *in vitro* [49], что позволяет предположить возможность прямого влияния опухолевых клеток, локализованных в костной ткани, на остеокластогенез. Также увеличение уровня RANKL наблюдали в клеточных линиях опухоли простаты, обработанных TGF- $\beta$  [48]. Связь между высокой экспрессией RANKL при первичных опухолях и уровнем метастазирования была описана для пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой [36]. Высокое соотношение RANKL/OPG в сыворотке крови больных множественной миеломой соответствовало более значительному метастатическому поражению костей, что указывает как о повышенной продукции RANKL клетками опухоли, так и о системной природе данного заболевания [41].

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 увеличению сроков выживаемости [50]. Ингибирование RANKL было изучено на моделях различных типов опухолей, таких, как множественная миелома, PMЖ, РП, рак легких, ободочной кишки и т.д., и практически во всех случаях отмечено уменьшение очагов опухоль-индуцированного 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 [39]. Снижение метастазирования в кости и легкие описано у животных с RANK-позитивной меланомой. Описан также и противоположный эф-

фekt, который наблюдали у мышей с повышенным уровнем RANKL и трансплантированными опухолевыми клетками (RANKL-позитивный человеческий РМЖ, полученный от мышей MMTV-neu) [18].

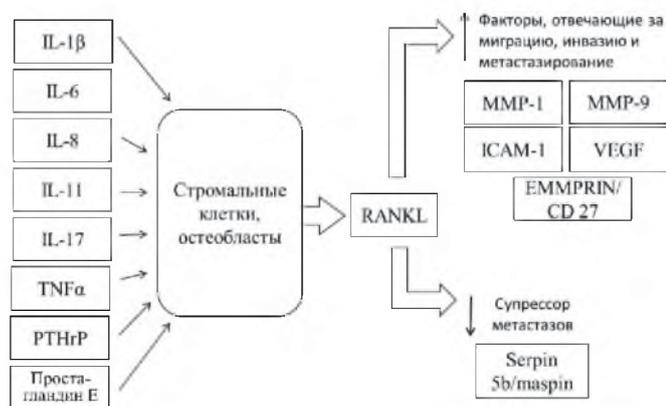
Анализ экспрессии RANK и воздействие с помощью RANKL на клетки *in vitro* показал наличие функциональной экспрессии этого рецептора на поверхности клеток РП, РМЖ, меланомы, а также остеосаркомы. В большинстве подобных исследований RANKL не увеличивал пролиферативную активность RANK-экспрессирующих клеток [1], однако в случае клеток РМЖ наблюдали увеличение их количества в результате защиты от индуцированной повреждением ДНК клеточной смерти под действием химиотерапии или  $\gamma$ -излучения [35].

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 сосудов — VEGF [37].

В свою очередь, воздействие RANKL на клетки костных метастазов РП приводило к снижению экспрессии супрессора метастазов serpin 5b/maspin [24]. 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.

Так известные механизмы взаимосвязи системы RANK/RANKL/OPG с другими клеточными системами (рисунок).

Целенаправленное воздействие на RANKL для ингибирования опухоль-индуцированных остеокластов на преклинических моделях открывает некоторые возможности для лечения скелетных осложнений злокачественных опухолей, включая метастазирование в кости. Для оценки действия ингибиторов остеокластов полезна оценка фармакодинамики маркеров костной резорбции,



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

таких, как N-телопептид коллагена I типа (NTX), повышенные уровни которого ассоциируются с повышенным риском метастазирования в кости и более высоким уровнем смертности пациентов [6].

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, осложненных 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 [4]. Разработан другой препарат OPG — CEP-37251 (Cephalon), однако и его исследование I фазы так и не увенчалось успехом [5].

Антитела к RANKL — ALX-0141 (Ablynx) были протестированы в клиническом исследовании I фазы на здоровых женщинах в постменопаузе [43], а полностью 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), а также 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 РП и множественной миеломе [11].

В ряде исследований для лечения пациентов с метастатическим поражением костей при РМЖ [38], РП [10], множественной миеломе [16] 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 выявляли у больных, которые получали золедроновую кислоту, а у пациентов, получавших Denosumab, чаще наблюдали гипокальцемию.

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

Опухоли костей являются крайне тяжелой в диагностике и лечении группой новообразований, патогенез которых связан с уникальными особенностями костной ткани и 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 лиц 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 остеокластов позволяет предположить тесную связь между агрессивностью остеосаркомы и активностью остеокластов.

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 [7].

На животных моделях 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 [28]. Авторы описанного выше исследования 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 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. При анализе биоптатов больших остеосаркомой также обнаружена экспрессия RANK. Проведенный далее иммуноблотинг показал значительную функциональную активность RANK, выражавшуюся в индукции в клетках остеосаркомы под действием RANKL фосфорилирования таких внутриклеточных сигнальных белков, как ERK1/2, p38, IB. Подобные изменения выявлены в RANK-позитивных клетках остеосаркомы и являются свидетельством 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 на иммунокомпетентных и бестимусных мышах [34]. 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. 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 на экспериментальных моделях остеосаркомы [34], однако эти данные необходимо проверять в клинике.

J.A. Lee с соавторами была изучена связь экспрессии RANKL с эффективностью лечения больных остеосаркомой высокой степени злокачественности. В исследовании принимали участие 40 больных локализованной высокозлокачественной остеосаркомой, у которых были взяты образцы тканей до лечения. У 75% пациентов наблюдали экспрессию RANKL в опухоли, причем у 50% экспрессия RANKL достигала высокой степени. При этом уровень экспрессии RANKL не был связан с возрастом и полом пациентов, локализацией опухоли, ее объемом и морфологическим типом, однако выявлена достоверная связь

между высоким уровнем экспрессии RANKL и слабым ответом на последующую неоадьювантную химиотерапию. Кроме того, высокие уровни экспрессии RANKL связаны с низкой 5-летней выживаемостью [22].

*Саркома Юинга.* Другим новообразованием, при котором изучали роль системы RANK/RANKL/OPG, была 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 с соавторами [40] 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 с обратной транскриптазой показано, что клетки саркомы Юинга способны экспрессировать собственный RANKL, а также макрофагальный колониестимулирующий фактор 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 [49].

*Хондросаркома.* Экспрессия RANKL и RANK в тканях человеческой хондросаркомы 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 приводила к усилению 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 [17]. Помимо вышеприведенных злокачественных опухолей костей, повышенную экспрессию RANKL, OPG и RANK также наблюдали в многоядерных гигантских клетках аневризимальной костной кисты [23].

## Заключение

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 молекулярно-направленного химиотерапевтического лечения.

## Список литературы

1. 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.
2. ASBMR Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral and metabolism. 6<sup>th</sup> ed. — Washington D.C.: American Society for Bone and Mineral Research, 2008. — Vol. 537 p.
3. Blair J.M., Zheng Y., Dunstan C.R. RANK ligand // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* — 2007. — Vol. 39. — P. 1077–1081.
4. Body J.J., Greipp P., Coleman R.E. et al. A phase I study of AMG-007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases // *Cancer*. — 2003. — Vol. 97. — P. 887–892.
5. 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>.
6. 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.
7. 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.
8. Dougall W.C. Molecular Pathways: Osteoclast-Dependent and Osteoclast-Independent Roles of the RANKL/RANK/OPG Pathway in Tumorigenesis and Metastasis // *Clin. Cancer Res.* — 2012. — Vol. 18. — P. 326–335.
9. Eghbali-Fatourehchi G., Khosla S., Sanyal A. et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women // *J. Clin. Invest.* — 2003. — Vol. 111. — P. 1221–1230.
10. 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 randomized, double-blind study // *Lancet*. — 2011. — Vol. 377. — P. 813–822.
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. Furuya D., Kaneko R., Yagihashi A. et al. Immuno-PCR assay for homodimeric osteoprotegerin // *Clin. Chem.* — 2001. — Vol. 47. — P. 1475–1477.
13. 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.
14. Hannon R., Eastell R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover // *Osteoporos. Int.* — 2001. — Vol. 1 (Suppl. 6). — P. 30–40.
15. Hawa G., Brinskelle-Schmal N., Glatz K. et al. Immunoassay for soluble RANKL (receptor activator of NF-B ligand) in serum // *Clin. Lab.* — 2003. — Vol. 49. — P. 461–463.
16. 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.
17. 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. 138–147.
18. 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.
19. 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.
20. Kang Y., Siegel P.M., Shu W. et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone // *Cancer Cell*. — 2003. — Vol. 3. — P. 537–549.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Manolagas S.C. Choreography from the tomb: an emerging role of dying osteocytes in the purposeful, and perhaps not so purposeful, targeting of bone remodeling // *BoneKey-Osteovision*. — 2006. — Vol. 3. — P. 5–14.
26. McKusick V.A. Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11B; TNFRSF11B. In: Online Mendelian inheritance in man. Baltimore, MD: Johns Hopkins University, 2007.
27. Min H., Morony S., Sarosi I. et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis // *J. Exp. Med.* — 2000. — Vol. 192. — P. 463–474.
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. — Vol. 24(2). — P. 235–242.
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. Mundy G.R. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities // *Nat. Rev. Cancer*. — 2002. — Vol. 2. — P. 584–593.
31. Pennisi P., Signorelli S.S., Riccobene S. et al. Low bone density and abnormal bone turnover in patients with atherosclerosis of peripheral vessels // *Osteoporos. Int.* — 2004. — Vol. 15. — P. 389–395.
32. 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.
33. 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.
34. Rousseau J., Escrivou 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.
35. 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.
36. 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.
37. Schramek D., Leibbrandt A., Sigl V. et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer // *Nature*. — 2010. — Vol. 468. — P. 98–102.
38. 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.
39. Tan W., Zhang W., Strasner A. et al. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling // *Nature*. — 2011. — Vol. 470. — P. 548–553.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. van de Wetering de Rooij J., Lyssens C., ten Holder S. et al. Safety, pharmacokinetics and efficacy of anti-RANKL nanobody

ALX-0141 in healthy postmenopausal women // *Ann. Rheum. Dis.* — 2011. — Vol. 70(3). — P. 136.

44. Vega D., Maalouf N.M., Sakhaee K. The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B (RANK)/RANK Ligand/Osteoprotegerin: Clinical Implications // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2007. — Vol. 92(12). — P. 4514–4521.

45. von Tirpitz C., Epp S., Klaus J. et al. Effect of systemic glucocorticoid therapy on bone metabolism and the osteoprotegerin system in patients with active Crohn's disease // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* — 2003. — Vol. 15. — P. 1165–1170.

46. Whyte M.P., Hughes A.E. Expansile skeletal hyperphosphatasia is caused by a 15-base pair tandem duplication in TNFRSF11A encoding RANK and is allelic to familial expansile osteolysis // *J. Bone Miner. Res.* — 2002. — Vol. 17. — P. 26–29.

47. Whyte M.P., Reinus W.R., Podgornik M.N., Mills B.G. Familial expansile osteolysis (excessive RANK effect) in a 5-generation American kindred // *Medicine.* — 2002. — Vol. 81. — P. 101–121.

48. Zhang J., Lu Y., Dai J. et al. In vivo realtime imaging of TGF- $\beta$ -induced transcriptional activation of the RANK ligand ge-

ne promoter in intraosseous prostate cancer // *Prostate.* — 2004. — Vol. 59. — P. 360–369.

49. 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.

50. 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.

51. Ziolkowska M., Kurowska M., Radzikowska A. et al. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after antitumor necrosis factor treatment // *Arthritis Rheum.* — 2002. — Vol. 46. — P. 1744–1753.

*Посылана 19.04.2013*

## ***Role of RANK/RANKL/OPG system in pathogenesis of primary and metastatic bone tumors***

**Kushlinskii N.E., Timofeev Yu.A.**

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences.

Kashirskoye shosse, 24, 115478, Moscow, Russian Federation. Fax: +7 (499)-324-63-54.

E-mail: biochimia@yandex.ru

*RANK/RANKL/OPG system — is a substantial element of bone homeostasis provides the process of bone tissue remodeling. Disorders in this system may be responsible for pathogenesis of a number of pathological states, including oncological. This review describes the mechanisms of the RANK/RANKL/OPG system, the main principles of its functioning and clinical significance. Special attention is given to the role of RANK/RANKL/OPG system in development of bone metastasis and primary bone tumors.*

**Key words:** RANK, RANKL, OPG, sarcoma, metastasis, bone tumors, homeostasis