

**Factors determining *in vitro* survival of human multiple myeloma cells**S.S. Shushanov<sup>1</sup>, T.A. Kravtsova<sup>1</sup>, and Yu.B. Chernykh<sup>2</sup>**ABSTRACT**

In this work, we investigated the survival of the human MM cell lines, i.e. RPMI1640, RPMI8226, and IM9, depending on the degree of their differentiation and impact of exogenous IGF-1. The study showed that the most and least sensitive to growth factors are IM9 cells with CD138+, CD38–, CD45+, CD56–, or CD19+ immunophenotype and RPMI1640 and RPMI8226 cells with (CD138+, CD38+, CD45–, CD56+/-, or CD19– immunophenotype, respectively. The gene expression studies revealed that the level of IGF-1R and IRA mRNA expression was significantly lower in the IM9 cells than in the RPMI1640 or RPMI8226 cells. Also, we established that exogenous IGF-1 could variously influence the survival and growth of MM cells. IGF-1 alone exerts no effect on the myeloma cell viability, but, in combination with serum growth factors, it increases the parameter.

**Keywords:** multiple myeloma (MM), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), cell survival, mRNA expression.

Accepted November 18, 2013

<sup>1</sup> N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS

115478, Kashirskoye shosse, d. 24, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> M.F. Vladimirov Moscow Regional Research-and-Clinical Institute

129110, ul. Shchepkina, d. 61/2, Moscow, Russian Federation

S.S. Shushanov, PhD, Chief scientific worker, Laboratory of tumor cell genetics

T.A. Kravtsova, Technician, Laboratory of tumor cell genetics

Yu.B. Chernykh, Scientific worker, Department of clinical hematology and immunotherapy

**Correspondence should be sent to S.S. Shushanov**

115478, Kashirskoye shosse, d. 24, Moscow, Russian Federation

Tel.: +7 (499) 3241769, e-mail: saintshy@yandex.com

**Факторы, определяющие выживаемость клеток множественной миеломы человека *in vitro***С.С. Шушанов<sup>1</sup>, Т.А. Кравцова<sup>1</sup>, Ю.Б. Черных<sup>2</sup>**РЕФЕРАТ**

В настоящей работе проведено исследование выживаемости линий клеток множественной миеломы (ММ) человека RPMI1640, RPMI8226 и IM9 в зависимости от степени их дифференцировки в среде без сыворотки и/или при воздействии экзогенного инсулиноподобного фактора роста 1-го типа (IGF-1). Установлено, что наиболее чувствительны к сывороточным факторам роста клетки IM9 с иммунофенотипом CD138+, CD38–, CD45+, CD56–, CD19+ и наименее чувствительны клетки RPMI1640 и RPMI8226, имеющие иммунофенотип CD138+, CD38+, CD45–, CD56+/-, CD19–. Исследование генов показало, что в клетках IM9 уровень экспрессии мРНК *IGF-1R* и *IRA* значительно ниже, чем в клетках RPMI1640 и RPMI8226. Кроме того, установлено, что экзогенный IGF-1 может по-разному влиять на выживаемость и рост клеток ММ. Изолированное воздействие IGF-1 не влияет на жизнеспособность миеломных клеток, а в сочетании с факторами роста — усиливает.

**Ключевые слова:**

множественная миелома (ММ), инсулиноподобный фактор роста 1-го типа (IGF-1), выживаемость клеток, экспрессия мРНК.

**Принято в печать:** 18 ноября 2013 г.**ВВЕДЕНИЕ**

Множественная миелома (ММ) — злокачественное лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся инфильтрацией костного мозга плазматическими клетками, наличием моноклонального иммуноглобулина или его фрагментов в сыворотке и/или моче и остеолитическими поражениями костей [1]. Согласно классификации ВОЗ, ММ относится к периферическим В-клеточным лимфоидным опухолям [2]. ММ составляет 1% всех онкологических заболеваний и 13% всех опухолей кроветворной и лимфоидной тканей [3]. Причины развития ММ у человека остаются неясными. Одно из свойств опухолевых клеток при ММ — их способность мигрировать и локализоваться в костном мозге [1, 4]. В микро-

окружении костного мозга клетки ММ взаимодействуют с клетками стромы костного мозга и активируют в них транскрипцию и секрецию различных цитокинов и факторов роста: TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухолей  $\alpha$ ), TGF- $\beta$  (трансформирующий фактор роста  $\beta$ ), SDF-1 $\alpha$  (фактор стромальных клеток 1 $\alpha$ ), IL-6 (интерлейкин-6), VEGF (эндотелиальный фактор роста сосудов), IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста 1-го типа) и др. [5, 6]. Воздействие этих факторов на миеломные клетки может придать им более агрессивные свойства, в т. ч. усилить пролиферацию, повысить жизнеспособность и миграцию, активировать механизмы возникновения лекарственной устойчивости, а также активировать разрушение костной ткани. В связи с этим исследование роли цитокинов и факторов роста в

<sup>1</sup> ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН

115478, Каширское шоссе, д. 24, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва

129110, ул. Щелкина, д. 61/2, Москва, Российская Федерация

прогрессии ММ представляется одним из актуальных современных направлений в экспериментальной онкологии, которому посвящено немало работ. Например, было исследовано влияние на выживаемость миеломных клеток CD45+ и CD45- комбинации нескольких факторов роста: IL-6, IGF-1, HGF (фактор роста гепатоцитов), HB-EGF (эпидермальный фактор роста, связывающий гепарин), APRIL (лиганд, индуцирующий пролиферацию) [6]. В работе было показано, что одним из важных факторов выживания клеток ММ является IGF-1 [6]. В других публикациях продемонстрировано, что IGF-1 усиливает пролиферацию, выживание и миграцию клеток ММ, а также оказывает прямое влияние на развитие устойчивости к ряду цитостатических препаратов [5, 7].

Установлено, что в микроокружении костного мозга клетки ММ при взаимодействии с эндотелием кровеносных сосудов экспрессируют на своей поверхности рецептор инсулиноподобного фактора роста 1-го типа (IGF-1R) [7]. IGF-1R — рецепторная тирозинкиназа-гетеротетрамер, состоящий из двух внеклеточных  $\alpha$ -субъединиц, связывающихся с IGF-1, и двух внутриклеточных  $\beta$ -субъединиц, содержащих тирозинкиназный домен. Связывание IGF-1 с IGF-1R приводит к активации внутренней тирозинкиназы IGF-1R и последующему аутофосфорилированию тирозинов внутриклеточной  $\beta$ -субъединицы, включая околочелюбный тирозин в положении 950 [8]. Этот тирозин служит сайтом связывания для субстратов IGF-1R, которые после взаимодействия и последующего фосфорилирования, инициируют передачу сигналов от IGF-1R внутрь клетки посредством активирования целого ряда нижележащих эффекторов [9]. Увеличение количества IGF-1R на поверхности клеток ММ приводит к разнообразным IGF-1/IGF-1R-взаимодействиям с последующей активацией нижележащих сигнальных путей, которые могут усилить злокачественные свойства миеломных клеток — пролиферацию, миграцию, выживаемость (жизнеспособность).

Кроме того, не исключено, что выживаемость миеломных клеток зависит от свойств самих клеток ММ, например от степени их дифференцировки. Степень дифференцировки клеток ММ оценивается в зависимости от маркеров дифференцировки, экспрессирующихся на их поверхности: CD138, CD38, CD45, CD56, CD19 [1]. Некоторые из этих маркеров дифференцировки являются молекулами адгезии. Клетки ММ, проникая в микроокружение костного мозга, посредством молекул адгезии взаимодействуют с клетками стромы (фибробластами) и белками внеклеточного матрикса и, как следствие, приобретают более злокачественные свойства, дающие преимущества в выживании. Исследование механизмов выживания клеток ММ — одно из актуальных направлений в экспериментальной онкологии.

В настоящей работе изучалась выживаемость линий клеток ММ человека RPMI1640, RPMI8226 и IM9 в зависимости от степени их дифференцировки и воздействия экзогенного IGF-1.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Линии клеток множественной миеломы

В работе были использованы три типа суспензионных линий клеток ММ человека, экспрессирующих на своей поверхности IM9 (CD138+, CD38-, CD45+, CD56-

CD19+), RPMI8226 (CD138+, CD38+, CD45-, CD56+/-, CD19-) и RPMI1640 (CD138+, CD38+, CD45-, CD56+/-, CD19-) [10]. Источниками указанных линий клеток служили опухолевые элементы костного мозга больных ММ. Способ культивирования — суспензионный в среде RPMI1640 с 10%-й телячьей эмбриональной сывороткой (ТЭС) при температуре 37 °C с 5% углекислым газом.

### Оценка выживаемости клеток ММ колориметрическим методом

Метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ клеток превращать «желтый» 3-(4,5-диметилтиазол-2)2,5-дифенилтетразолиум бромид в «синий» фармазан (МТТ-тест). В 96-луночное плато засеивали по  $2 \times 10^4$  клетки на лунку в 150 мкл ростовой среды без сыворотки и без IGF-1 (контроль) или без сыворотки, но содержащей IGF-1 в концентрации 300 нг/мл. На каждую линию клеток для эксперимента в присутствии IGF-1 или без него (контроль) использовали не менее 3 лунок. Эксперимент повторяли не менее 3 раз. Клетки инкубировали в течение 72 ч в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Через 72 ч в лунки добавляли 3-(4,5-диметилтиазол-2)2,5-дифенилтетразолиум бромид в объеме 25 мкл на 2–3 ч (срок инкубации зависит от метаболической активности митохондрий используемых клеток). Исходная концентрация вещества составила 5 мг/мл деионизированной стерильной воды. Затем удаляли среду и добавляли 60 мкл ДМСО на лунку. Для гомогенного распределения красителя использовался шейкер в течение 3 мин при 300 об./мин. Анализ проводили на цитофотометре «Унискан» (компания «Пикон», Россия) с фильтром 595 нм. Жизнеспособность клеток при действии IGF-1 оценивалась сопоставлением оптической плотности в экспериментальных и контрольных лунках. На основании полученных при сканировании данных строили графики с учетом отклонения от средних значений. Влияние IGF-1 на выживаемость клеток ММ исследовалось более чем в 3 независимых экспериментах.

### Выделение РНК из клеток ММ и полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Для исследования экспрессии генов к осадку клеток добавляли 1 мл тризола (Trizol®; Sigma, США). Процедуру выделения РНК проводили согласно стандартному протоколу. Электрофорез выделенной РНК проводили в 1% агарозном геле при напряжении 100 В в течение 30–40 мин. Качество выделенной РНК оценивали по наличию полос рибосомной РНК. Концентрацию РНК определяли по оптическому поглощению при длине  $\lambda$  260 нм. Экспрессию мРНК исследуемых генов определяли полуколичественным методом ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией). Реакционная смесь для синтеза кДНК содержала 2 мкг тотальной клеточной РНК, 4 мкл «случайных» праймеров (гексануклеотиды) (компания «Литех», Россия), 2 ммоль смеси dNTP (МБИ Fermentas, Литва), 2–4 ед. ингибитора РНКаз (МБИ Fermentas), 100 ед. обратной транскриптазы М-МуLV (МБИ Fermentas). Объем смеси составлял 25 мкл. Синтез кДНК с матрицы РНК проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) со следующими параметрами: обратная транскрипция — 42 °C в течение 50 мин; денатурация —

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности специфичных праймеров, использованных в работе

Ген	Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Размер продукта, пары оснований	Температура отжига праймера, °С
IR-A	IRA-F	5'-AACCAAGAGTGAGTATGAGGAT-3'	600	60
	IRA-R	5'-CCGTTCCAGAGCGAAGTGCTT-3'		
IR-B	IRB-F	5'-AACCAAGAGTGAGTATGAGGAT-3'	636	60
	IRB-R	5'-CCGTTCCAGAGCGAAGTGCTT-3'		
IGF-1A	IGF-1A-F	5'-GGACCGGAGACGCTCTGCGG-3'	284	60
	IGF-1A-R	5'-TCTACTTGCCTTCTCAAAT-3'		
IGF-1B	IGF-1B-F	5'-GGACCGGAGACGCTCTGCGG-3'	431	60
	IGF-1B-R	5'-TTTGCCTCTGCATTCAGCAT-3'		
IGF-IR	IGF-IR-F	5'-ATTGAGGAGGTCACAGAGAAC-3'	755	67
	IGF-IR-R	5'-TTCATATCCTGTTTGGCCTG-3'		
IGF-2	IGF-2-F	5'-AGTCGATGCTGGTCTTCTCA-3'	486	60
	IGF-2-R	5'-GTGGCGGGGTCTGGGTGGGTAG-3'		
GAPDH	GAPDH-F	5'-CCCCTGGCCAAAGTCATCCATGACAACCTTT-3'	513	60
	GAPDH-R	5'-GGCCATGAGGTCACCACCCTGTTGCTGTA-3'		

94 °С, 5 с. Для наработки продуктов ПЦР составляли реакционную смесь, содержащую 1 мкл раствора кДНК, 20 пкмоль каждого из праймеров, 2 ммоль смеси dNTP (MBI Fermentas), 2,5 мкл 10-кратного буфера с (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (MBI Fermentas) и 25 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 1 ед. Taq-ДНК полимеразы, воду до конечного объема 25 мкл, 30 мкл минерального масла. Нуклеотидные последовательности использованных специфических праймеров приведены в табл. 1. Реакцию амплификации проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по следующей схеме: денатурация — 94 °С, 10 с; отжиг — T<sub>m</sub>, 10 с; синтез — 72 °С, 20 с. Значения температуры отжига праймера (T<sub>m</sub>) для каждого из генов приведены в табл. 1. В качестве внутреннего контроля для оценки количества взятой в реакцию РНК определяли экспрессию *GAPDH*. Продукты реакции ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Размер фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДНК, гель фотографировали при ультрафиолетовом возбуждении с помощью цифровой камеры Samsung CCTV LENZ.

**Статистическая обработка данных**

Статистическая обработка полученных данных была выполнена с помощью компьютерной программы GraphPad Prizm 5 (2008). Статистическая значимость определялась с помощью непараметрического статистического *t*-критерия, различия считались значимыми при *p* < 0,05.

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

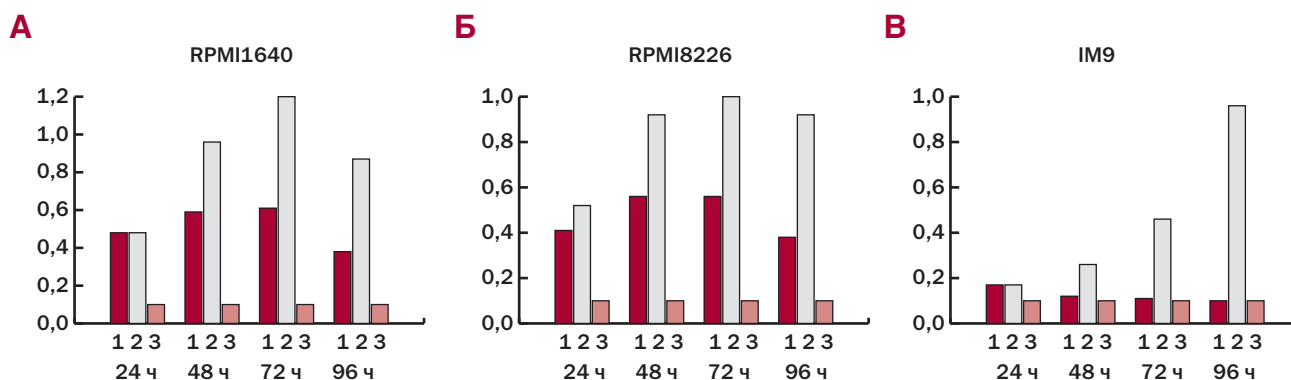
**Выживаемость клеток ММ в среде без телячьей эмбриональной сыворотки**

В данной части работы с использованием метода МТТ охарактеризована выживаемость линий клеток ММ человека — RPMI1640, RPMI8226 и IM9 — в среде без ТЭС в интервалах времени 24, 48, 72 и 96 ч (рис. 1). В качестве контроля оценивали рост клеток в обычной культуральной среде, содержащей 10 % ТЭС.

Оказалось, что в течение 48 и 72 ч в среде без ТЭС количество клеток RPMI1640 продолжает увеличиваться и через 72 ч их число возрастает примерно в 1,5 раза по сравнению с этим показателем через 24 ч (рис. 1, А). Вместе с тем через 96 ч количество клеток RPMI1640 уменьшается (см. рис. 1, А). В целом выживаемость клеток RPMI1640 в среде без сыворотки существенно ниже, чем в среде с ней.

Исследования выживаемости линий клеток ММ человека RPMI8226 также показали, что в течение 48 и 72 ч в среде без ТЭС количество клеток RPMI8226 продолжает увеличиваться и через 72 ч их число возрастает примерно в 1,3 раза по сравнению с этим показателем через 24 ч (рис. 1, Б). Вместе с тем через 96 ч в среде без ТЭС число клеток RPMI8226 снижается (см. рис. 1, Б). В целом выживаемость клеток RPMI8226 в среде без сыворотки существенно ниже, чем в среде с ней.

Исследования выживаемости линий клеток ММ человека IM9 показали, что они чрезвычайно чувствительны к отсутствию ТЭС. Уже через 48 ч их количество



**Рис. 1.** Выживаемость линий клеток RPMI1640 (А), RPMI8226 (Б), IM9 (В) (МТТ-тест): 1 — в отсутствие ТЭС; 2 — в присутствии ТЭС; 3 — контроль, среда без ТЭС

заметно уменьшается по сравнению с этим показателем через 24 ч и достигает минимального значения через 96 ч (рис. 1, В). Таким образом, среди трех линий клеток ММ человека наиболее чувствительными к факторам роста оказались клетки IM9.

Методом проточной цитофлуориметрии было показано, что особенность линии клеток IM9, отличающая ее от двух других линий (RPMI1640 и RPMI8226), заключается в экспрессии иммунологических маркеров дифференцировки [10]. Клетки IM9 имеют следующий иммунофенотип: CD138+, CD38–, CD45+, CD56–, CD19+, а клетки RPMI1640 и RPMI8226 — CD138+, CD38+, CD45–, CD56+/-, CD19–. Иными словами, общим для всех трех линий клеток ММ является экспрессия только одного основного иммунологического маркера плазматических клеток — CD138+ (синдекана-1). По всем остальным маркерам дифференцировки клетки IM9 отличаются от RPMI1640 и RPMI8226. Возможно, данная, характерная для IM9 комбинация маркеров дифференцировки оказывается определяющей в отношении высокой чувствительности клеток IM9 к факторам роста. Ранее нами показано, что именно клетки IM9 в отличие от RPMI1640 и RPMI8226 чувствительны к доксорубину [11]. Таким образом, возможно, что, для клеток ММ человека одним из решающих условий, обуславливающих чувствительность к внешним факторам роста и противоопухолевым препаратам, выступает иммунофенотип, характерный для линии IM9.

#### Исследование экспрессии генов системы IGF/инсулин с телячьей эмбриональной сывороткой и без нее

IGF-1 и его рецептор (IGF-1R) принадлежат к системе IGF/инсулин, которая включает инсулин, инсулиноподобный фактор роста 2-го типа (IGF-2), 6 видов IGF-связывающих и регулирующих белков (IGFBP) и их протеаз, а также различные изоформы и комбинации их общих рецепторов: IGF-1R, IR-A, IR-B (A- и B-изоформы рецептора инсулина), IGF-1R/IR-A, IGF-1R/IR-B (гибридные рецепторы). Активация перечисленных рецепторов опосредует сигналы, играющие различную роль в физиологии клетки: развитие, рост, дифференцировка, регуляция метаболизма, подвижность, чувствительность к апоптозу, ангиогенез, экспрессия молекул адгезии [12]. IGF-1 может связываться и активировать IR-A [13, 14], а также гибридный рецептор IGF-1R/IR-A [15]. Со всеми указанными рецепторами (IR-A, IR-B и IGF-1R) также может связываться IGF-2 [16, 17], который высокоомологичен IGF-1 [18]. В литературе описаны две изоформы мРНК IGF-1 (IGF-1A и IGF-1B), которые образуются в результате альтернативного сплайсинга. При этом обе изоформы сохраняют нуклеотидные последовательности, кодирующие полноразмерный пептид IGF-1, а С-концевые нуклеотидные последовательности этих двух изоформ кодируют два различных пептида: EA и EB. Функциональное значение изоформ мРНК IGF-1A и IGF-1B до конца неизвестно и в настоящее время исследуется. Установлено, что про-IGF-1A-пептид выделяется из клетки в межклеточное пространство. Пептид про-IGF-1B является активной внутриклеточной изоформой, обнаруживается в ядре клетки и, по-видимому, обладает регуляторной функцией [19]. Предполагается, что количественное соотношение этих изоформ может быть одним из факторов, определяющих дальнейшую судьбу клетки,

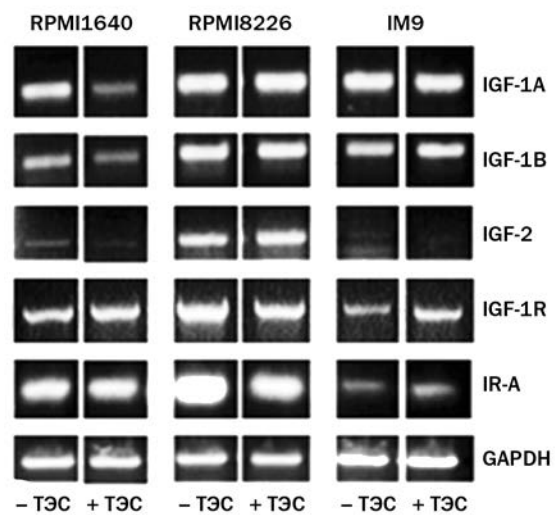


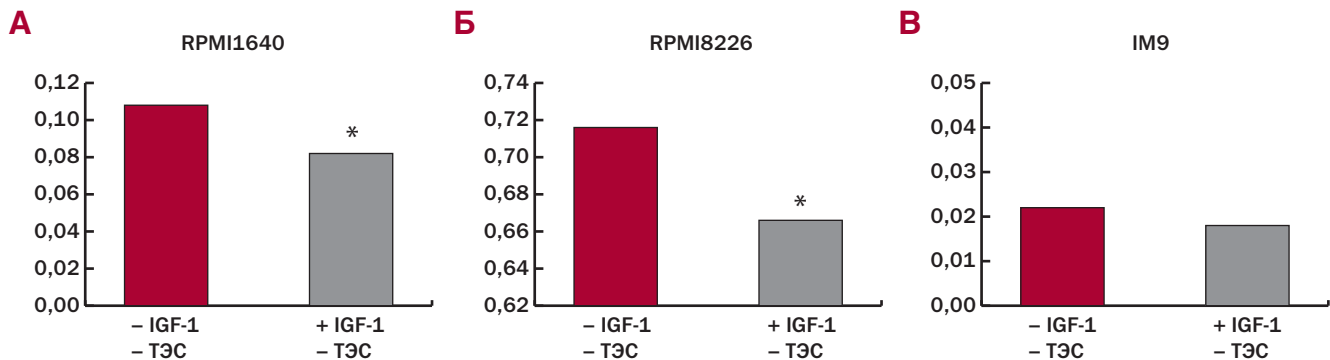
Рис. 2. Экспрессия мРНК генов системы IGF/инсулин в трех линиях клеток множественной миеломы человека: RPMI1640, RPMI8226 и IM9, культивируемых в течение 72 ч с ТЭС и без нее (полуколичественный метод ОТ-ПЦР)

т. е. в случае преобладания одной изоформы клетка будет пролиферировать, в случае другой — дифференцироваться [20].

Система IGF/инсулин является, как известно, одной из наиболее важных и широко изучаемых в онкологии. Ее роль в прогрессии злокачественных новообразований доказана при многих типах опухолей человека и на различных моделях животных. Повышенная экспрессия компонентов системы IGF/инсулин в злокачественных опухолях служит неблагоприятным прогностическим фактором выживаемости больных. Для таких опухолей характерно развитие рецидивов. Они характеризуются инвазивным ростом и отдаленным метастазированием [21–25]. Вместе с тем причины изменения экспрессии компонентов системы IGF/инсулин в злокачественных опухолях остаются неясными.

В настоящей работе исследовано, как экспрессия генов, принадлежащих системе IGF/инсулин, будет изменяться в зависимости от воздействия различных экзогенных факторов, содержащихся в сыворотке. С этой целью в клетках RPMI1640, RPMI8226 и IM9, культивируемых в течение 72 ч с 10%-й ТЭС или без нее, оценивалась экспрессия мРНК: IGF-1A, IGF-1B, IGF-2, IGF-1R, IR-A и IR-B. Результаты исследования показали, что в присутствии ТЭС экспрессия мРНК 2 изоформ IGF-1 (IGF-1A и IGF-1B), мРНК IGF-1R и мРНК IR-A обнаруживается во всех трех линиях клеток ММ (рис. 2). Вместе с тем экспрессия мРНК IGF-2 выявляется только в линии RPMI8226, а экспрессия мРНК IR-B не наблюдается ни в одной из исследованных линий клеток ММ. Кроме того, наши исследования показали, что в клетках IM9 уровень экспрессии мРНК IGF-1R и IR-A как с ТЭС, так и без нее значительно ниже, чем в клетках RPMI1640 и RPMI8226. Не исключено, что в клетках IM9 сигнальные пути IGF-1/IGF-1R- и IGF-1/IRA менее активны, чем в клетках RPMI1640 и RPMI8226.

При сравнении экспрессии мРНК перечисленных генов в отсутствие ТЭС в клетках IM9 заметно уменьшается уровень экспрессии мРНК IGF-1R, а в RPMI1640 увеличивается экспрессия мРНК IGF-1A и IGF-1B (см. рис. 2). В клетках RPMI1640, RPMI8226 в отсутствие ТЭС



**Рис. 3.** Выживаемость клеток RPMI1640 (А), RPMI8226 (Б), IM9 (В), культивируемых в течение 72 ч в среде без ТЭС в присутствии IGF-1 и без него (МТТ-тест)  
\*  $p < 0,05$ .

экспрессия мРНК *IGF-1R* также изменяется, но незначительно. Полученные данные позволили предположить, что ростовые факторы, присутствующие в сыворотке, могут влиять на экспрессию генов системы IGF/инсулин. Наша гипотеза подтверждается ранними работами, в которых показано, что фактор роста тромбоцитов (PDGF) и основной фактор роста фибробластов (bFGF) усиливают экспрессию *IGF-1R* [26, 27]. Что касается PDGF и bFGF, то они могут продуцироваться самими клетками ММ в костном мозге [28, 29]. Не исключено также, что аутокринная регуляция сигнальных путей IGF-1/IGF-1R, IGF-1/IRA, IGF-2/IGF-1R и IGF-2/IRA в клетках ММ зависит от ростовых факторов, присутствующих в сыворотке. Это предположение требует продолжения исследований, в которых будет изучаться влияние различных комбинаций факторов и цитокинов на регуляцию IGF-1-зависимых сигнальных путей в клетках ММ человека.

**Выживаемость клеток ММ с и без IGF-1**

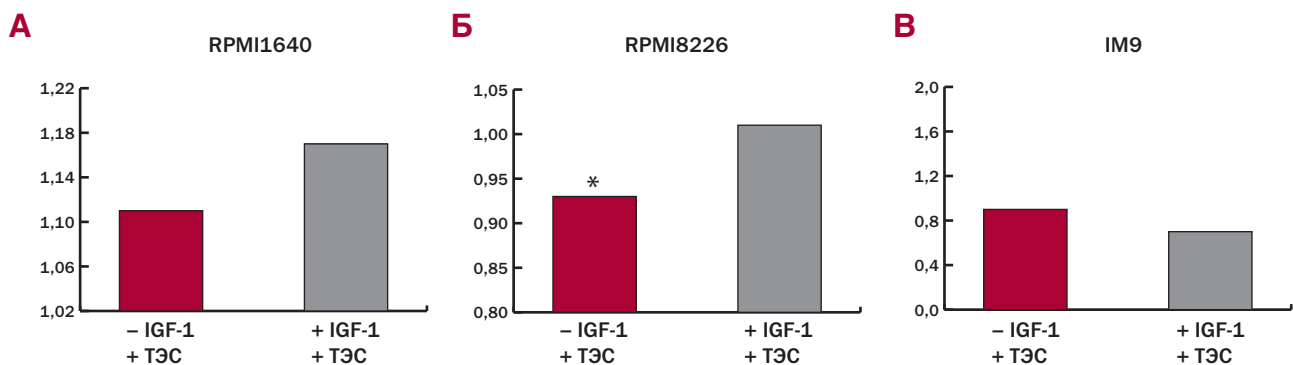
Выживаемость клеток ММ человека (IM9, RPMI8226, RPMI1640) исследовалась методом МТТ. Клетки культивировали в течение 72 ч в бессывороточной среде с и без IGF-1 в концентрации 300 нг/мл (рис. 3). В таких условиях исключены все факторы роста, присутствующие в сыворотке, которые могли бы взаимодействовать с IGF-1 и оказывать дополнительное влияние на выживаемость клеток ММ. В результате исследования было выявлено, что IGF-1 в концентрации 300 нг/мл понижает выживаемость клеток RPMI1640 и RPMI8226 и существенно не воздействует на жизнеспособность IM9 (см. рис. 3). В присутствии 10%-й ТЭС, наоборот, экзогенный IGF-1 увеличивает количество клеток

RPMI1640 и RPMI8226 (рис. 4) и также существенно не влияет на рост клеток IM9. Таким образом, IGF-1 может по-разному влиять на выживаемость и рост клеток ММ. Воздействие только одного IGF-1 ослабляет жизнеспособность клеток RPMI1640 и RPMI8226, а в комбинации с другими факторами роста — усиливает ее.

Из литературы известно, что IGF-1 действительно может проявлять свои функции во взаимодействии с другими факторами. Например, было установлено, что он индуцирует деление клетки во взаимодействии с эпидермальным фактором роста (EGF) и PDGF [30, 31]. Кроме того, было показано, что IGF-1 стимулирует пролиферацию как IL-6-зависимых, так и IL-6-независимых линий миеломных клеток человека путем воздействия на клетки синергически с IL-6, активируя при этом IL-6-независимый путь сигнальной трансдукции [32–34].

Наши исследования продемонстрировали значительно более низкий уровень экспрессии мРНК *IGF-1R* и *IR-A*, чем в клетках RPMI1640 и RPMI8226. В связи этим не исключено, что в клетках IM9 сигнальные пути IGF-1/IGF-1R и IGF-1/IRA менее активны и, как следствие, клетки IM9 менее подвержены воздействию IGF-1, чем RPMI1640 и RPMI8226.

Следует отметить, что в предыдущих экспериментах мы установили, что экзогенный IGF-1 в концентрации 20 нг/мл в среде без ТЭС усиливает выживаемость клеток IM9 и RPMI1640 (статья в печати). Дальнейшие эксперименты, по всей вероятности, помогут понять механизм двойственного воздействия IGF-1 на клетки ММ *in vitro* и объяснить, почему различные концентрации экзогенного IGF-1 по-разному влияют на выживаемость клеток ММ.



**Рис. 4.** Выживаемость клеток RPMI1640 (А), RPMI8226 (Б), IM9 (В), культивируемых в течение 72 ч в среде с 10%-й ТЭС в присутствии IGF-1 и без него (МТТ-тест)  
\*  $p < 0,05$ .

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

Таким образом, в данной работе впервые показано, что для клеток ММ человека одной из важных характеристик, обуславливающей чувствительность к факторам роста, служит экспрессия иммунологических маркеров дифференцировки. Иммунофенотип CD138+, CD38–, CD45+, CD56–, CD19+ позволяет предположить высокую чувствительность, тогда как иммунофенотип CD138+, CD38+, CD45–, CD56+/-, CD19– служит показателем низкой чувствительности к факторам роста, такие опухолевые клетки характеризуются высокой жизнеспособностью. Кроме того, в работе впервые было показано, что ростовые факторы, присутствующие в сыворотке, могут воздействовать на экспрессию генов системы IGF/инсулин и что экзогенный IGF-1 может по-разному влиять на выживаемость клеток ММ. Воздействие одного IGF-1 не повышает жизнеспособность клеток, а в комбинации с другими факторами роста — усиливает ее. Эти данные представляют интерес и требуют дальнейшего изучения, что, вероятно, поможет понять двойственный характер воздействия IGF-1 на клетки ММ *in vitro*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из признаков злокачественности клеток ММ является их способность мигрировать и локализоваться в костном мозге, где они взаимодействуют с элементами костномозгового микроокружения — клетками стромы и белками внеклеточного матрикса. Взаимодействие клеток ММ с клетками стромы (фибробластами) активирует в последних транскрипцию и секрецию цитокинов и факторов роста. В результате воздействия некоторых из них клетки ММ получают сигналы для выживания, пролиферации и формируют опухолевый клон. Среди таких факторов наиболее известен IGF-1, который, как предполагается, может усиливать жизнеспособность клеток ММ. Возможно, их выживаемость зависит от свойств самих опухолевых клеток, в т. ч. от степени их дифференцировки. В настоящей работе мы изучали жизнеспособность линий клеток ММ человека RPMI1640, RPMI8226 и IM9 в зависимости от степени их дифференцировки и воздействия экзогенного IGF-1. В ходе исследований мы впервые показали, что экзогенный IGF-1 может по-разному влиять на выживаемость и рост клеток ММ. Воздействие одного IGF-1 не увеличивает их жизнеспособность, а в комбинации с другими факторами роста — усиливает ее. Также нами выявлено, что наиболее чувствительны к факторам роста клетки IM9, которые отличаются от клеток RPMI1640 и RPMI8226 по экспрессии иммунологических маркеров дифференцировки.

Таким образом, возможно, что для клеток ММ решающим условием, обуславливающим выживаемость, с одной стороны, является воздействие IGF-1 в сочетании с другими цитокинами и факторами роста, а с другой — выживаемость клеток ММ зависит от их иммунофенотипа. Дальнейшие эксперименты, по-видимому, помогут выявить двойственный характер воздействия IGF-1 на опухолевые клетки, что может способствовать более глубокому пониманию роли системы IGF/инсулин в молекулярных механизмах, лежащих в основе прогрессии ММ.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

1. *Вотьякова О.М., Демина Е.А.* Множественная миелома. В кн.: Клиническая онкогематология. Руководство для врачей. 2-е изд., перераб и доп. Под ред. М.А. Волковой. М.: Медицина, 2007: 847–73.  
[*Votyakova O.M., Demina Ye.A.* Mnozhestvennaya miyeloma. V kn.: Klinicheskaya onkogematologiya. Rukovodstvo dlya vrachey, 2-e izd., pererab i dop. Pod red. M.A. Volkovoy. (Multiple myeloma. In: Clinical oncology. Manual for medical practitioners. 2nd ed., rev.&upd. Ed by: M.A. Volkova). M.: Meditsina, 2007: 847–73.]
2. *Jaffe E.E., Harris N., Stein H. et al.* World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2001: 351.
3. *Raab M.S., Podar K., Breitkreutz I. et al.* Multiple myeloma. *Lancet* 2009; 374: 324–39.
4. *Dispenzieri A., Kyle R.A.* Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2005; 18: 553–68.
5. *Hideshima T., Bergsagel P.L., Kuehl W.M. et al.* Advances in Biology of Multiple Myeloma: Clinical Applications. *Blood* 2004; 104: 607–18.
6. *Sprynski A.C., Hose D., Caillot L. et al.* The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor. *Blood* 2009; 113: 4614–26.
7. *Mitsiades C.S., Mitsiades N., Kung A.L. et al.* The IGF/IGF-1R system is a major therapeutic target for multiple myeloma, other hematologic malignancies and solid tumors. *Blood* 2002; 100(11): Abstract 637.
8. *Samani A.A., Yakar S., LeRoith D. et al.* The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: Overview and recent insights. *Endocr. Rev.* 2007; 28: 20–47.
9. *Hernandez-Sanchez C., Werner H., Roberts C.T. et al.* Differential Regulation of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Receptor Gene Expression by IGF-I and Basic Fibroblastic Growth Factor: *JBC* 1997; 272(8): 4663–70.
10. *Kalitin N., Kostjukova M., Kakpakova E. et al.* Vascular endothelial growth factor 1 (VEGFR1) gene expression depends on immunophenotype of human multiple myeloma cells. *Eur. J. Cancer* 2011; 47(1): S644.
11. *Шушанов С.С., Кравцова Т.А.* Цитотоксическое действие доxorubicина *in vitro* на клетки множественной миеломы человека. *Бюл. экспер. биол. и мед.* 2013; 155(2): 195–200.  
[*Shushanov S.S., Kravtsova T.A.* Doxorubicine cytotoxic *in vitro* effect on cells of human multiple myeloma. *Byul. eksper. biol. i med.* 2013; 155(2): 195–200. (In Russ.)].
12. *Шушанов С.С.* Роль инсулиноподобного фактора роста 1 типа (IGF-1) и некоторых других членов системы IGF/инсулин в прогрессии множественной миеломы. *Рос. биотер. журн.* 2012; 11(3):71–80.  
[*Shushanov C.C.* Role of insulin-like growth factor 1 and some other members of IGF/insulin system in progression of multiple myeloma. *Ros. bioter. zhurn.* 2012; 11(3):71–80. (In Russ.)].
13. *Ludwig T., Eggenschwiller J., Fisher P. et al.* Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *igf2* and *igf-1r* null backgrounds. *Dev. Biol.* 1996; 177: 517–35.
14. *Sacco A., Morcavallo A., Pandini G. et al.* Differential signaling activation by insulin and insulin-like growth factors I and II upon binding to insulin receptor isoform A. *Endocrinology* 2009; 150(8): 3594–602.
15. *Moxham C.P., Duronio V., Jacobs S. et al.* Insulin-like growth factor 1 receptor beta-subunit heterogeneity. Evidence for hybrid tetramers composed of insulin-like growth factor 1 and insulin receptor heterodimers. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 13238–44.
16. *Frasca F., Pandini G., Scalia P. et al.* Insulin receptor isoform A a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol. Cell Biol.* 1999; 19: 3278–88.
17. *Yamaguchi Y., Flier J.S., Yokota A. et al.* Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* 1991; 129: 2058–66.
18. *Yu H., Rohan T.* Role of insulin-like growth factor family in cancer development and Progression. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000; 92: 1472–89.
19. *Weber J.D., Kuo M.L., Bothner B. et al.* Cooperative signals governing ARF mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20: 2517–28.
20. *Barton E.R.* The ABCs of IGF-1 isoforms: impact of muscle hypertrophy and implications for repair. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2006; 31: 791–7.
21. *Parker A., Cheville J.C., Lohse C. et al.* Expression of insulin-like growth factor I receptor and survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. *J. Urol.* 2003; 170: 420–4.
22. *Parker A.S., Cheville J.C., Janney C.A.* High expression levels of insulin-like growth factor-I receptor predict poor survival among women with clear-cell renal cell carcinomas. *Hum. Pathol.* 2002; 33(8): 801–5.
23. *Gicquel C., Bertagna X., Gaston V. et al.* Molecular Markers and Long-Term Recurrences in a Large Cohort of Patients with Sporadic Adrenocortical Tumors. *Cancer Res.* 2001; 61: 6762–67.
24. *Sayer R.A., Lancaster J.M., Pittman J. et al.* High insulin-like growth factor-2 (IGF-2) gene expression is an independent predictor of poor survival for patients with advanced stage serous epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2005; 96(2): 355–61.

- 25.** Shariat S.F., Kim J., Nguyen C. et al. Correlation of preoperative levels of IGF-1 and IGFBP-3 with pathologic parameters and clinical outcome in patients with bladder cancer. *Urology* 2003; 61(2): 359–64.
- 26.** Hernandez-Sanchez S., Werner H. et al. Differential regulation of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor gene expression by IGF-1 and basic fibroblastic growth factor. *Biol. Chem.* 1997; 272(8): 4663–70.
- 27.** Rubini M., Werner H., Gandini E. et al. Platelet-derived growth factor increases the activity of the promotor of the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor gene. *Exp. Cell Res.* 1994; 211(2): 374–9.
- 28.** Van Riet I., Vande Broek I., Asosingh K. et al. Endothelial cell-tumor cell interactions in multiple myeloma. *Hematol. J.* 2003; 4(Suppl. 1): P6.3 (abstract).
- 29.** Vanderkerken K., De Greef C., Asosingh K. et al. Selective initial in vivo homing pattern of 5T2 multiple myeloma cells in the C57BL/KalwRij mouse. *Br. J. Cancer* 2000; 82: 953–9.
- 30.** Coppola D., Ferber A., Miura M. et al. A functional insulin-like growth factor 1 receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell Biol.* 1994; 14(7): 4588–99.
- 31.** DeAngelis T., Ferber A., Baserga R. A functional insulin-like growth factor 1 receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the platelet derived growth factor receptor. *J. Cell Physiol.* 1995; 164(1): 214–21.
- 32.** Ferlin M., Noraz N., Hertogh C. Insulin-like growth factor induces the survival and proliferation of myeloma cells through an interleukin-6-independent transduction pathway. *Br. J. Haematol.* 2000; 111: 626–4.
- 33.** Georgii-Hemming P., Wiklund H.J., Ljunggren O. et al. Insulin-like growth factor I is a growth and survival factor in human multiple myeloma cell lines. *Blood* 1996; 88: 2250–8.
- 34.** Qiang Y.W., Kopantzev E., Rudikoff S. et al. Insulin like growth factor-I signaling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates, and pathway cross-talk. *Blood* 2002; 99: 4138–46.

**С.С. Шушанов** — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики опухолевых клеток.

**Т.А. Кравцова** — сотрудник лаборатории генетики опухолевых клеток.

**Ю.Б. Черных** — научный сотрудник отделения клинической гематологии и иммунотерапии.

Адрес для переписки: С.С. Шушанов, 115478, Каширское шоссе, д. 24, Москва, Российская Федерация, тел.: +7 (499) 3241769, e-mail: sainhersh@yandex.com

