

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-2-41-52>

Количественное соотношение экспрессии мРНК генов рецепторов системы IGF/INS при множественной миеломе

С.С. Шушанов¹, Ю.Б. Черных², Т.А. Захарова¹, Н.П. Акентьева³

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; Россия, 129110 Москва, ул. Щепкина, 61/2;

³ФГБУН Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН; Россия, 142432 Московская обл., Черноголовка, пр-кт Академика Семенова, 1

Контакты: Саин Саенович Шушанов sainHershy@yandex.ru

Введение. Индивидуумы с повышенной экспрессией компонентов системы IGF/INS чаще подвержены риску возникновения различных злокачественных новообразований. А в случае, когда компоненты системы IGF/INS гиперэкспрессированы в опухолях, это неблагоприятно влияет на прогноз заболевания, в том числе ведет к снижению безрецидивной выживаемости. Характерной особенностью системы IGF/INS является способность одних и тех же лигандов связываться с разными рецепторами (перекрестные взаимодействия) и активировать разные сигнальные пути в клетке. Эта особенность системы требует комплексного подхода к изучению экспрессии ее компонентов, а именно – исследования количественного соотношения экспрессии отдельных компонентов. Полученный результат позволит определить возможные сочетания лиганд-рецепторных связей и в конечном счете будет иметь как прогностическое, так и оценочное значение в плане терапевтической мишени.

Цель исследования – установить количественное соотношение экспрессии мРНК генов рецепторов системы IGF/INS: *IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R* и *IGF-2R* в линии лимфобластоидных клеток IM9 и в трех линиях миеломных клеток – RPMI1640, RPMI8226, H929, а также выявить частоту экспрессии генов этих рецепторов в мононуклеарной фракции аспиратов костного мозга, полученных от леченых больных множественной миеломой.

Материалы и методы. В работе были использованы лимфобластоидные клетки человека и 3 типа миеломных клеток человека, отличающиеся по степени дифференцировки, а также аспираты костного мозга, полученные от 19 леченых больных множественной миеломой III стадии. Экспрессию мРНК в клетках изучали методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени, а в образцах аспиратов костного мозга – методом полуколичественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. В ходе исследования мы обнаружили, что внутри каждой линии клеток экспрессия мРНК *IR-A* является преобладающей по сравнению с экспрессией мРНК *IR-B*. У больных множественной миеломой наблюдается высокая частота экспрессии мРНК *IR-A* по сравнению с мРНК *IR-B*. Минимальное соотношение мРНК *IGF-1R:IR-A* и *IGF-1R:IR-B* приходится на лимфобластоидные клетки IM9, а для миеломных клеток эти соотношения высокие. Соотношение *IGF-2R:IR-A* максимально для лимфобластоидных клеток IM9, а для миеломных клеток это соотношение в 3 и более раза меньше.

Заключение. На основании исследования количественного соотношения мРНК генов рецепторов мы утверждаем, что в миеломных клетках высока вероятность присутствия гомодимеров IGF-1R/IGF-1R и IR-A/IR-A и гетеродимера IGF-1R/IR-A. Эти данные имеют как прогностическое, так и оценочное значение, поскольку указанные комбинации рецепторов предполагают существенное усиление митогенного эффекта за счет активации тремя лигандами – IGF-1, IGF-2 и INS, что является неблагоприятным фактором, особенно в том случае, когда больному множественной миеломой с сопутствующим сахарным диабетом наряду с химиотерапией назначена инсулинотерапия. На основании полученных данных в качестве терапевтической мишени мы рекомендуем ингибировать одновременно и рецептор IGF-1R, и рецептор IR-A.

Ключевые слова: инсулиноподобные факторы роста, инсулин, множественная миелома, экспрессия мРНК

Для цитирования: Шушанов С.С., Черных Ю.Б., Захарова Т.А., Акентьева Н.П. Количественное соотношение экспрессии мРНК генов рецепторов системы IGF/INS при множественной миеломе. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(2):41–52. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-41-52

Quantitative ratio of mRNA expression of IGF/INS system receptors in multiple myeloma

Sain S. Shushanov¹, Yulia B. Chernykh², Tatiana A. Zakharova¹, Natalia P. Akentieva³

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute; 61/2 Shchepkin St., Moscow 129110, Russia;

³Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences; 1 Akademika Semenova Ave., Chernogolovka, Moscow region 142432, Russia

Contacts: Sain Sakenovich Shushanov sainHershly@yandex.ru

Background. Individuals with increased expression of components of the IGF/INS system, are more likely to develop various malignancies. And in the case when the components of the IGF/INS system are overexpressed in tumors, this adversely affects the prognosis of the disease, including leading to a decrease in relapse-free survival. A characteristic feature of the IGF/INS system is the ability of the same ligands to bind to different receptors and vice versa (cross interactions) and activate different signaling pathways in the cell. This feature of the system requires an integrated approach to the study of the expression of its components, namely, the study of the quantitative ratio of the expression of individual components. The result obtained will make it possible to determine possible combinations of ligand-receptor bonds and, ultimately, will have both prognostic and evaluative value: in terms of a therapeutic target.

Aim. To establish the quantitative ratio of mRNA expression of the IGF/INS system receptors: *IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R*, and *IGF-2R* in the IM9 lymphoblastoid cell line and in three myeloma cell lines: RPMI1640, RPMI8226, H929, and to identify frequency of expression of these receptors in the mononuclear fraction of bone marrow aspirates obtained from treated patients with multiple myeloma.

Materials and methods. We used human lymphoblastoid cells and 3 types of human myeloma cells, differing in the degree of differentiation and, as well as bone marrow aspirates obtained from 19 treated patients with stage III multiple myeloma. Expression of mRNA in cells was studied by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction and in bone marrow aspirate samples by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.

Results. During the study, we found that within each cell line, the receptor *IR-A* is predominant compared to the receptor *IR-B*. Patients with MM have a high frequency of *IR-A* expression compared to *IR-B*. The minimum ratio of *IGF-1R:IR-A* and *IGF-1R:IR-B* mRNA is in IM9 lymphoblastoid cells, and for myeloma cells these ratios are high. The ratio of *IGF-2R:IR-A* is maximum for IM9 lymphoblastoid cells, and for myeloma cells this ratio is three or more times less.

Conclusion. Based on the study of the quantitative ratio of receptor mRNA, we state that in myeloma cells there is a high probability of the presence of IGF-1R/IGF-1R and IR-A/IR-A homodimers, and an IGF-1R/IR-A heterodimer. These data have both prognostic and evaluative value, since these combinations of receptors suggest a significant increase in the mitogenic effect due to activation by three ligands: IGF-1, IGF-2 and INS, which is an unfavorable factor, especially when a patient with multiple myeloma with concomitant Diabetes mellitus was prescribed insulin therapy along with chemotherapy. Based on our findings, we recommend simultaneously inhibiting both the IGF-1R receptor and the IR-A receptor as a therapeutic target.

Keywords: insulin-like growth factors, insulin, multiple myeloma, mRNA expression

For citation: Shushanov S.S., Chernykh Yu.B., Zakharova T.A., Akentieva N.P. Quantitative ratio of mRNA expression of IGF/INS system receptors in multiple myeloma. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(2):41–52. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-41-52

Введение

Система инсулиноподобных факторов роста и инсулина (IGF/INS) включает инсулиноподобные факторы роста 1-го (IGF-1) и 2-го (IGF-2) типов, инсулин (INS), 6 типов IGF-связывающих белков (IGFBP1–IGFBP6), а также рецепторы IR-A, IR-B, IGF-1R, IGF-2R и их гибридные комбинации IR-A/IR-B, IGF-1R/IR-A и IGF-1R/IR-B [1–3]. Эта система важна для нормального (пренатального и постнатального) развития, клеточного метаболизма, пролиферации и выживания клеток, а также вовлечена в развитие различных типов злокачественных новообразо-

ваний [1]. INS с высокой аффинностью связывается с рецепторами IR-A и IR-B, с меньшей аффинностью – с рецептором IGF-1R и не связывается с гибридными рецепторами IGF-1R/IR-A и IGF-1R/IR-B. IGF-1 связывается с высокой аффинностью с IGF-1R, гибридными рецепторами IGF-1R/IR-A и IGF-1R/IR-B и имеет низкое сродство к рецепторам IR-A и IR-B. IGF-2 связывается с рецепторами IGF-1R, IR-A и с гибридным рецептором IGF-1R/IR-A. Фосфорилирование рецептора IGF-1R и гибридного рецептора IGF-1R/IR-A при связывании с IGF-1 или IGF-2 преимущественно активирует митогенные

сигналы. Фосфорилирование IR-A при связывании с INS или IGF-2 также приводит к активации митогенного сигналинга. Активация IR-B при взаимодействии с INS и активация гибридного рецептора IGF-1R/IR-B при связывании с IGF-1 в основном приводят к активации сигнальных путей, регулирующих метаболизм [2, 3]. Таким образом, характерной особенностью системы IGF/INS является способность одних и тех же лигандов связываться с разными рецепторами (перекрестные взаимодействия) и активировать различные сигнальные пути.

Установлено, что индивидуумы с повышенной экспрессией компонентов системы IGF/INS чаще подвержены риску возникновения различных злокачественных новообразований, а в случае, когда компоненты системы IGF/INS гиперэкспрессированы в уже возникших опухолях, это неблагоприятно влияет на прогноз заболевания, в том числе ведет к снижению безрецидивной выживаемости [1, 3, 4]. Поэтому исследование экспрессии генов системы IGF/INS в опухолях имеет как прогностическое, так и оценочное значение с точки зрения определения терапевтической мишени.

Еще одной характерной особенностью системы IGF/INS является способность подвергаться диверсификации сигналов с помощью различных механизмов. Например, клинические исследования ингибирования IGF-1R специфическими ингибиторами и моноклональными антителами привели к неожиданному результату: в ответ на ингибирование IGF-1R активировался IR-зависимый сигнальный путь, что стало причиной возникновения резистентности к IGF-1R-таргетной терапии. Также было установлено, что чувствительность к ингибированию IGF-1R зависит от соотношения экспрессии IGF-1R и IR. Если соотношение IGF-1R:IR высокое, как в случае с клетками рака молочной железы, ингибирование IGF-1R является эффективным, и, напротив, если соотношение IGF-1R:IR низкое, ингибирование IGF-1R не достигает результата [5–8]. Таким образом, прежде чем использовать в качестве терапевтической мишени тот или иной компонент системы IGF/INS, важно знать количественное соотношение экспрессии всех рецепторов этой системы, что позволит правильно оценить возможные варианты диверсификации сигналов и подобрать наиболее адекватную схему ингибирования.

На сегодняшний день существует достаточно много работ, посвященных исследованию экспрессии отдельных компонентов системы IGF/INS в опухолях человека. В частности, исследована частота экспрессии мРНК некоторых компонентов системы IGF/INS в нейроэндокринных опухолях [9], при легочном лимфангиолейомиоматозе [10], колоректальном раке [11, 12], саркоме Юинга [13] и целом ряде других

опухолей [14–19]. Часть из этих работ проведена в 2019–2022 гг., что свидетельствует о важности системы IGF/INS в онкологии и актуальности данного направления на сегодняшний день.

Множественная миелома (ММ) – злокачественное лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся инфильтрацией костного мозга плазматическими клетками, наличием моноклонального иммуноглобулина в сыворотке крови и/или моче и остеолитическими поражениями костей. ММ относится к периферическим В-клеточным лимфоидным опухолям, на ее долю приходится 1 % всех онкологических заболеваний и 13 % всех гемобластозов [2, 20]. Данные литературы свидетельствуют о том, что система IGF/INS играет ключевую роль в патогенезе ММ и выполняет множественные функции в прогрессии ММ: усиливает пролиферацию и выживание миеломных клеток, участвует в селективной локализации клеток миеломы в костном мозге, остеоллизе, а также регулирует механизмы возникновения лекарственной устойчивости [2, 20]. Несмотря на большие успехи в терапии, ММ неизлечима, общая выживаемость составляет примерно 5,2 года после постановки диагноза в зависимости от возраста и терапии [20]. Хотя система IGF/INS играет ключевую роль в патогенезе ММ, терапевтическое воздействие на эту систему с использованием блокирующих антител или низкомолекулярных ингибиторов остается довольно ограниченным, и, учитывая многокомпонентность этой системы, требуется больше доклинических исследований [20].

Цель исследования – установить количественное соотношение экспрессии мРНК генов рецепторов системы IGF/INS: *IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R* и *IGF-2R* в линии лимфобластоидных клеток IM9 и в трех линиях миеломных клеток – RPMI1640, RPMI8226, H929, а также выявить частоту экспрессии этих рецепторов в моноклеарной фракции аспиратов костного мозга, полученных от леченых больных ММ.

Полученные данные позволят установить присутствие наиболее характерных для ММ компонентов системы IGF/INS и выявить наиболее возможные и присущие ММ комбинационные взаимодействия между лигандами и рецепторами системы IGF/INS.

Материалы и методы

Линии клеток множественной миеломы. В работе были использованы 3 типа линий клеток ММ человека, отличающиеся по степени дифференцировки – RPMI8226, RPMI1640, H929, и лимфобластоидные клетки человека IM9. Происхождение миеломных клеток: человек, костный мозг, миелома. Происхождение клеток IM9: В-клетки, иммортализованные путем трансфекции вирусом Эпштейна–Барр. Способ культивирования – суспензионный в среде RPMI1640

с 10 % телячьей эмбриональной сывороткой при 37 °С, 5 % CO₂.

Клинический материал. В исследование были включены 19 пациентов в возрасте от 52 до 78 лет (10 мужчин и 9 женщин), у всех пациентов была диагностирована ММ III стадии. Диагноз ММ устанавливался на основании данных о плазмноклеточной инфильтрации костного мозга, иммунохимического исследования сыворотки крови и мочи, рентгенологических данных. Стадирование на момент диагностики проводили по общепринятой системе В.Г.М. Durie и С.Е. Salmon [21]. При иммунохимической характеристике патологического иммуноглобулина (PIg) установлено, что у 4 пациентов секретировался PIg Gκ, у 3 пациентов – PIg Gλ, у 5 пациентов – PIg Bκ, у 1 пациента – PIg BJ/Аλ, у 5 пациентов – PIg Aκ и у 1 пациента была определена секреция PIg Mκ.

Выделение РНК из клеток костного мозга и электрофорез. Для исследования экспрессии генов от больных получали костномозговой пунктат (аспират), из которого в дальнейшем выделяли РНК. С этой целью клетки костного мозга наслаивали на 3 мл Ficoll и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 30 мин, после чего на границе раздела фаз отбирали мононуклеарную фракцию клеток костного мозга, содержащую плазматические клетки. Затем отобранные клетки переносили в пробирку, содержащую 8 мл раствора Эрла, пересаживали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин и отмывали в 2–3 мл раствора Эрла. К осадку клеток добавляли 1 мл тризола (Trizol, Sigma, США). Процедуру выделения РНК выполняли 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 рибосомальной РНК. Концентрацию тотальной РНК определяли по оптическому поглощению при длине волны 260 нм.

Полуколичественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Экспрессию мРНК исследуемых генов определяли полуколичественным методом ОТ-ПЦР. Реакционная смесь для синтеза кДНК содержала 2 мкг тотальной клеточной РНК, 4 мкл «случайных» праймеров (гексануклеотиды) («Литех», Россия), 2 мМ смеси dNTP (MBI Fermentas), 2–4 ед. ингибитора РНКаз (MBI Fermentas), 100 ед. обратной транскриптазы М–MuLV (MBI Fermentas). Объем смеси составлял 25 мкл. Синтез кДНК с матрицы РНК проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) со следующими параметрами: обратная транскрипция – 42 °С, 50 мин; денатурация – 94 °С, 5 с. Для наработки продуктов ПЦР составляли реакционную смесь, содержащую 1 мкл раствора кДНК; 20 пкмоль каждого из праймеров; 2 мМ смеси dNTP (MBI Fermentas); 2,5 мкл 10-кратного буфера с (NH₄)₂SO₄ (MBI Fermentas), 25 мМ MgCl₂; 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы; H₂O до конечного объема 25 мкл; минеральное масло – 30 мкл. 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; аннилинг – T_m, 10 с; синтез – 72 °С, 20 с. Наименование исследуемых генов, нуклеотидные последовательности праймеров и размеры ПЦР-продуктов приведены в табл. 1 и 2. В качестве внутреннего контроля для оценки количества взятой в реакцию РНК определяли экспрессию референсного гена глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*GAPDH*). Продукты реакции ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Размеры фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДНК. Гель фотографировали при ультрафиолетовом

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для полуколичественной ОТ-ПЦР и размер ПЦР-продукта
Table 1. Nucleotide sequences of primers used for semi-quantitative RT-PCR and PCR product size

| Ген Gene | Последовательность прямого (F)/обратного (R) праймеров (5'-3') Forward (F)/Reverse (R) primer sequence (5'-3') | Размер продукта, п. о. Product size, b. p. |
|---------------|---|---|
| <i>IR-A</i> | F: AACCCAGAGTGAGTATGAGGAT R: CCGTTCCAGAGCGAAGTGCTT | 600 |
| <i>IR-B</i> | F: AACCCAGAGTGAGTATGAGGAT R: CCGTTCCAGAGCGAAGTGCTT | 636 |
| <i>IGF-1R</i> | F: ATTGAGGAGGTCACAGAGAAC R: TTCATATCCTGTTTGGCCTG | 755 |
| <i>GAPDH</i> | F: CCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTT R: GGCCATGAGGTCACCACCCTGTTGCTGTA | 513 |

Примечание. ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.
Note. PCR – polymerase chain reaction; RT-PCR – polymerase chain reaction with reverse transcription.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для количественной ПЦР в реальном времени и размер ПЦР-продукта

Table 2. Nucleotide sequences of primers used for quantitative real-time PCR and size of the PCR product

| Ген Gene | Последовательность прямого (F)/обратного (R) праймеров (5'-3') Forward (F)/Reverse (R) primer sequence (5'-3') | Размер продукта, п. о. Product size, b. p. |
|----------------|---|---|
| <i>IR-A</i> | F: TTTTCGTCCTCCAGGCCATC R: GTCACATTCCCAACATCGCC | 58 |
| <i>IR-B</i> | F: CCCCAGAAAAACCTCTTCAGG R: GTCACATTCCCAACATCGCC | 87 |
| <i>IGF-1R</i> | F: GGCACAATTACTGCTCCAAAGAC R: CAAGGCCCTTTCTCCCCAC | 121 |
| <i>IGF-2R</i> | F: GAGGGAAGAGGCAGGAAAG R: TGTGGCAGGCATACTCAG | 164 |
| <i>β-Actin</i> | F: AGCCATGTACGTTGCTATCCA R: ACCGGAGTCCATCACGATG | 79 |

Примечание. ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Note. PCR – polymerase chain reaction.

возбуждении с помощью цифровой камеры Samsung CCTV LENZ.

Количественная ПЦР в реальном времени. Определение экспрессии мРНК генов *IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R*, *IGF-2R* в линиях клеток проводили с помощью ПЦР в реальном времени на приборе CFX 96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad, США). Использовали набор реагентов для количественной ПЦР Cat# R-412 («НПФ Синтол», Россия). Смесь для ПЦР состояла из dNTP, 10 × ПЦР-буфера, ДНК-полимеразы *SynTaq*, $MgCl_2$, красителя SYBR Green, 10 пмоль прямого и обратного праймеров, кДНК образцов и ddH₂O в общем объеме 20 мкл. Условия циклирования были следующими: 95 °C в течение 5 мин и 40 циклов при 95 °C в течение 15 с, затем 60 °C в течение 25 с и 72 °C в течение 25 с. В этих условиях амплификацию не наблюдали в контрольных образцах без матрицы или без обратной транскрипции. Специфичность продукта амплификации определяли путем анализа кривой плавления для каждой пары праймеров. Данные были проанализированы с помощью сравнительного метода СТ, а кратность изменения была рассчитана с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Для нормализации эффективности синтеза кДНК использовали амплификацию референсного гена β-актина. Все образцы анализировали в трех повторах и использовали средние значения экспрессии. Используемые последовательности олигонуклеотидных праймеров и размеры ПЦР-продуктов (пары оснований) отражены в табл. 2.

Статистическая обработка данных. Достоверность различий определяли с использованием U-критерия Манна–Уитни (непараметрического критерия). Различия в уровне экспрессии генов считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Мы исследовали количественное соотношение экспрессии мРНК генов рецепторов системы IGF/INS: *IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R* и *IGF-2R* в 3 линиях миеломных клеток (RPMI1640, RPMI8226, H929) и в 1 линии лимфобластоидных клеток IM9. Полученные значения экспрессии мРНК исследуемых генов были нормализованы относительно значения экспрессии *IR-A*.

Количественное соотношение *IR-B:IR-A*. Наши исследования показали, что во всех линиях клеток экспрессия изоформы *IR-A* превалирует над экспрессией изоформы *IR-B*: в клетках RPMI1640 соотношение *IR-B:IR-A* составляет 0,1, в клетках RPMI8226 – 0,15, в клетках H929 – 0,035 и в клетках IM9 – 0,014 (табл. 3, рис. 1).

Таблица 3. Количественное соотношение *IR-B:IR-A*Table 3. Quantitative ratio of *IR-B:IR-A*

| Ген Gene | IM9 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | RPMI1640 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | RPMI8226 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | H929 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|-------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| <i>IR-A</i> | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>IR-B</i> | 0,014 | 0,1 | 0,15 | 0,035 |

На основании сравнения ΔCt между линиями клеток мы отмечаем, что наименьшая экспрессия мРНК изоформы *IR-A* характерна для иммортализованных В-клеток IM9 ($\Delta Ct = 16,9$), а в миеломных клетках экспрессия *IR-A* выше (RPMI1640: $\Delta Ct = 10,94$; RPMI8226: $\Delta Ct = 12,86$; H929: $\Delta Ct = 9,52$). Экспрессия мРНК *IR-B* в клетках IM9 также ниже ($\Delta Ct = 21,7$),

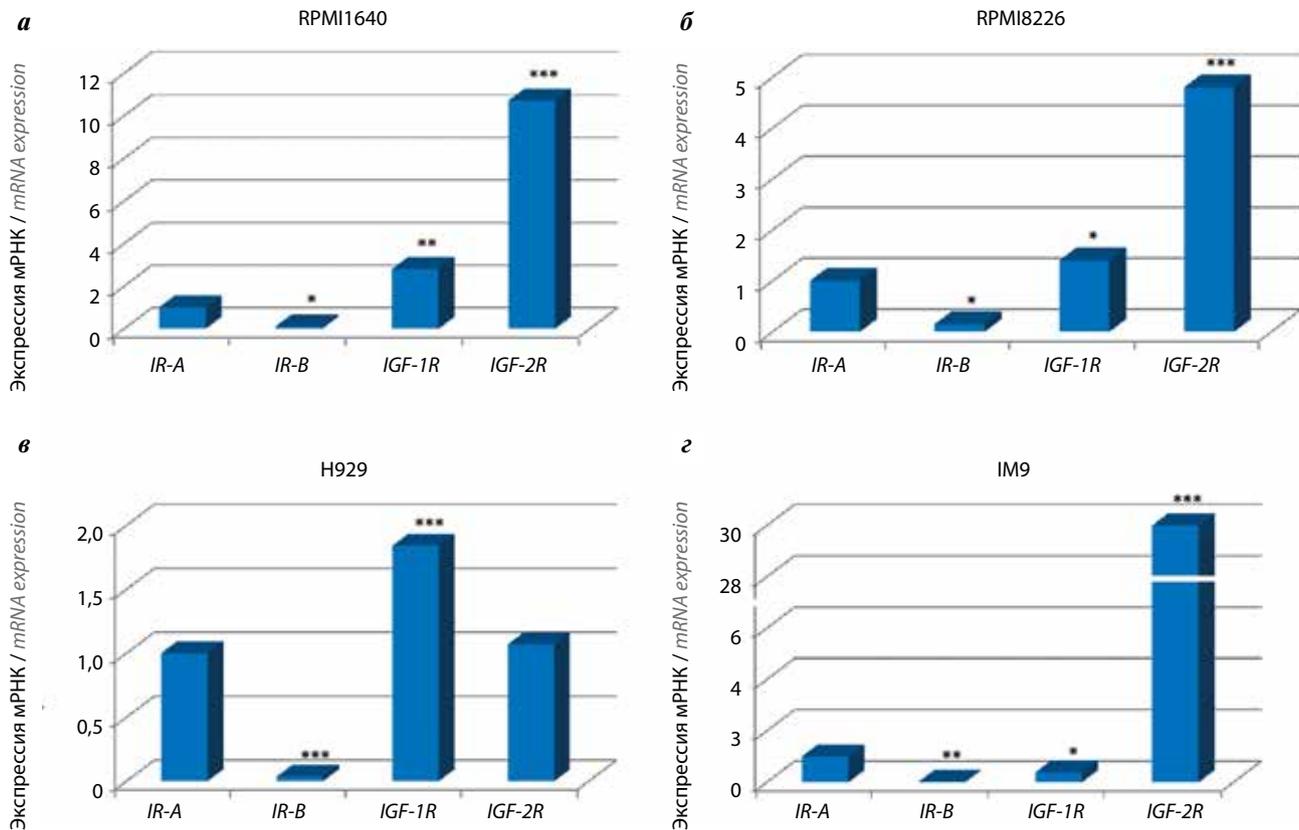


Рис. 1. Соотношения экспрессии мРНК генов рецепторов системы IGF/INS в клетках RPMI1640 (а), RPMI8226 (б), H929 (в) и IM9 (г). Приведены значения, нормализованные к IR-A. Статистически значимые различия по сравнению с IR-A: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$

Fig. 1. Expression ratios of mRNA of IGF/INS system receptors in RPMI1640 (a), RPMI8226 (б), H929 (в) и IM9 (г) cells. Values given are normalized to IR-A. Statistically significant differences compared to IR-A: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

чем в миеломных клетках (RPMI1640: $\Delta Ct = 13,7$; RPMI8226: $\Delta Ct = 14,1$; H929: $\Delta Ct = 14,35$).

Мы исследовали экспрессию мРНК IR-A и мРНК IR-B в аспиратах костного мозга, полученных от леченых больных, у которых была диагностирована ММ III стадии, и установили, что преимущественно экспрессируется мРНК IR-A (в 100 % случаев), а экспрессия мРНК IR-B наблюдается только у 32 % больных ММ (рис. 2).

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, которые указывают на то, что во многих злокачественных новообразованиях преимущественно экспрессируется изоформа IR-A по сравнению с IR-B: при раке молочной железы, желудка [22], гепатокарциноме, раке предстательной железы, мочевого пузыря, эндометрия, яичников, щитовидной железы [23]. Механизмы, регулирующие экспрессию изоформ IR-A и IR-B, сложны и до конца не изучены. Известно, что активация изоформы IR-A опосредует митогенные эффекты, тогда как активация изоформы IR-B опосредует метаболические эффекты [2, 3].

Еще в 1994 г. в двух работах, вышедших с интервалом в 1 год, G.G. Freund и соавт. впервые показали,

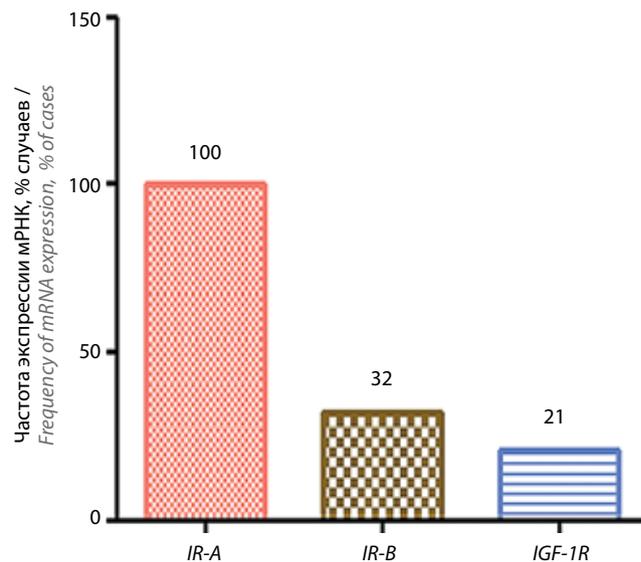


Рис. 2. Частота экспрессии мРНК генов рецепторов IR-A, IR-B и IGF-1R в мононуклеарной фракции клеток костного мозга, полученных от больных множественной миеломой (n = 19)

Fig. 2. Frequency of mRNA expression of receptors IR-A, IR-B and IGF-1R in the mononuclear fraction of bone marrow cells obtained from patients with multiple myeloma (n = 19)

что в клетках RPMI8226 INS усиливает митогенез и метаболизм глюкозы [24] и что IR (белок) экспрессируется преимущественно в миеломных линиях клеток U266 и RPMI8226 по сравнению с лимфобластоидными клетками (EBV, Ramos, HS Sultan) [25]. В настоящей работе мы показали, что в лимфобластоидных клетках IM9 обнаруживается низкая (по сравнению с миеломными клетками) экспрессия мРНК *IR-A* и *IR-B*, что коррелирует с экспрессией белка IR и согласуется с данными, полученными в упомянутой работе [25]. В 2010 г. А.С. Sprynski и соавт. показали, что рецептор IR является маркером плазматических клеток и не экспрессируется нормальными В-клетками памяти. Вместе с тем экспрессия IR индуцируется на 4-й день в ходе дифференцировки *in vitro* В-клеток памяти в активированные В-клетки, на 7-й день – в плазмобластах и на 10-й – в плазматических клетках. Рецептор IR также высоко экспрессируется нормальными плазматическими клетками в костном мозге. Таким образом, экспрессия рецептора IR возрастает в ходе нормальной дифференцировки плазматических клеток. Кроме того, в этой работе показано, что INS является значимым фактором роста для клеток миеломы [26]. Клетки IM9 – дифференцирующиеся (после стимуляции антигеном) формы антиген-наивного В-лимфоцита, и в ряду дифференцировки они находятся выше, чем плазмобласты. Тем не менее они экспрессируют и *IR-A*, и *IR-B*, и, возможно, что это результат их происхождения, т.е. клетки IM9 – это В-клетки, иммортализованные путем трансфекции вирусом Эпштейна–Барр.

Перечисленные выше работы коллег имеют obvious недостаток, который заключается в том, что они оценивали белок IR (суммарное количество белковых изоформ рецепторов *IR-A* и *IR-B*), и полученные данные не дают ответа на вопросы: как меняется экспрессия изоформ *IR-A* или *IR-B*, и в каком количественном соотношении они находятся в миеломных клетках. Дело в том, что на сегодняшний день не существует антител, которые различали бы рецепторы (белки) *IR-A* и *IR-B*. Эти изоформы отличаются всего лишь на 1 экзон (в гене рецептора *IR-A* отсутствует 11-й экзон), а используемые антитела определяют их суммарное количество [27]. Поэтому оценить экспрессию этих изоформ возможно только с помощью ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, различающих мРНК *IR-A* и мРНК *IR-B* (см. табл. 1). В этом смысле настоящая работа имеет преимущество по сравнению с работами, в которых использовали антитела для исследования экспрессии суммарного количества обеих изоформ, которое в литературе обозначают как IR [24, 25].

Таким образом, мы исследовали экспрессию мРНК *IR-A* и мРНК *IR-B* в лимфобластоидных В-клетках IM9, трех линиях миеломных клеток (RPMI1640,

RPMI8226, H929) и в образцах, полученных от леченных больных ММ, и обнаружили, что во всех случаях изоформа *IR-A* является преобладающей по сравнению с изоформой *IR-B*. У больных ММ наблюдается высокая частота экспрессии *IR-A* по сравнению с *IR-B*. На основании сравнения ΔC_t мы заключаем, что наименьшая экспрессия мРНК и изоформы *IR-A*, и изоформы *IR-B* характерна для В-клеток IM9, тогда как во всех миеломных клетках экспрессия этих изоформ существенно выше. Ранее мы также показали, что INS является фактором роста для клеток RPMI1640, RPMI8226 и IM9 [28]. Учитывая то, что для миеломных клеток характерна высокая экспрессия мРНК гена рецептора *IR-A*, активация которого усиливает митогенный сигнал, можно предположить, что присутствие INS является неблагоприятным прогностическим фактором для пациентов с ММ, у которых сопутствующим заболеванием является сахарный диабет 2-го типа с присущей ему хронической гиперинсулинемией. Также при длительном лечении глюкокортикоидами у больных ММ часто возникает резистентность к INS и в последующем развивается сахарный диабет 2-го типа [29–32]. В таком случае инсулинотерапия, с одной стороны, и гиперэкспрессия *IR-A*, с другой, будут способствовать усилению митогенного ответа миеломных клеток на INS и IGF-2, который также взаимодействует и активирует *IR-A* и продуцируется локально как эпителиальными, так и стромальными клетками [2, 3]. Совокупность описанных событий, несомненно, будет усиливать пролиферацию миеломных клеток.

Известно, что изоформы IR представлены гомодимерами *IR-A/IR-A* и *IR-B/IR-B* и гетеродимером *IR-A/IR-B* (гибридный рецептор). Учитывая то, что во всех исследованных нами линиях клеток и в образцах от пациентов с ММ мРНК *IR-A*-изоформы является преобладающей по сравнению с мРНК *IR-B*-изоформы, мы можем утверждать, что вероятность присутствия гомодимера *IR-A/IR-A* при ММ является более высокой, чем присутствие *IR-A/IR-B* гибридного рецептора. Подтвердить это заключение на уровне белка невозможно из-за отсутствия антител, специфических для каждой изоформы IR. Что касается исследований количественного соотношения экспрессии *IR-A:IR-B* при ММ, таких данных в литературе мы не обнаружили, и данная работа, по-видимому, является одной из первых.

Количественное соотношение *IGF-1R:IR-A* и *IGF-1R:IR-B*. IGF-1R (белок) в клетках может присутствовать в виде гетеродимеров *IGF-1R/IR-A* и *IGF-1R/IR-B*. По этой причине мы исследовали соотношения и *IGF-1R:IR-A*, и *IGF-1R:IR-B*. Наши исследования показали, что во всех трех линиях миеломных клеток экспрессия мРНК *IGF-1R* превалирует над экспрессией мРНК изоформы *IR-A*: в клетках RPMI1640

соотношение *IGF-1R:IR-A* составляет 2,8, в клетках RPMI8226 – 1,4, в клетках H929 – 1,84, тогда как в лимфобластоидных клетках IM9 – 0,38 (табл. 4, см. рис. 1).

Таблица 4. Количественное соотношение *IGF-1R:IR-A*

Table 4. Quantitative ratio of *IGF-1R:IR-A*

| Ген Gene | IM9 2 ^{-ΔΔCt} | RPMI1640 2 ^{-ΔΔCt} | RPMI8226 2 ^{-ΔΔCt} | H929 2 ^{-ΔΔCt} |
|---------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| <i>IR-A</i> | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>IGF-1R</i> | 0,38 | 2,8 | 1,4 | 1,84 |

В миеломных линиях клеток мРНК *IGF-1R* также превалирует над экспрессией мРНК изоформы *IR-B*: в клетках RPMI1640 соотношение мРНК *IGF-1R:IR-B* составляет 25,8, в клетках RPMI8226 – 9,25, в клетках H929 – 51,98, а в лимфобластоидных клетках IM9 отмечено незначительное преимущество мРНК *IGF-1* – 1,6 (табл. 5, см. рис. 1).

Таблица 5. Количественное соотношение *IGF-1R:IR-B*

Table 5. Quantitative ratio of *IGF-1R:IR-B*

| Ген Gene | IM9 2 ^{-ΔΔCt} | RPMI1640 2 ^{-ΔΔCt} | RPMI8226 2 ^{-ΔΔCt} | H929 2 ^{-ΔΔCt} |
|---------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| <i>IR-B</i> | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>IGF-1R</i> | 1,6 | 25,8 | 9,25 | 51,98 |

Таким образом, минимальные количественные соотношения мРНК *IGF-1R:IR-A* (в 0,38 раза) и *IGF-1R:IR-B* (в 1,6 раза) приходится на лимфобластоидные клетки IM9, в которых экспрессия и *IR-A*, и *IR-B* слабее, чем в миелоидных клетках. Для миеломных клеток характерна повышенная экспрессия *IGF-1R* по сравнению с *IR-A* (в 2,8; 1,4; 1,84 раза), и существенно более высокая экспрессия *IGF-1R* по сравнению с *IR-B* (в 25,8; 9,25; 51,98 раза).

На основании сравнения ΔCt между линиями клеток мы отмечаем, что наименьшая экспрессия мРНК *IGF-1R* характерна для иммортализованных В-клеток IM9 (ΔCt = 21,03), а в миеломных клетках экспрессия мРНК *IGF-1R* выше (RPMI1640: ΔCt = 11,84; RPMI8226: ΔCt = 12,75; H929: ΔCt = 8,64).

Ранее было показано, что в клетках RPMI8226 IGF-1 усиливает митогенез и метаболизм глюкозы [24] и что IGF-1R экспрессируется преимущественно в линиях миеломных клеток U266 и RPMI8226 по сравнению с лимфобластоидными клетками (EBV, Ramos, HS Sultan) [25]. Также показано, что IGF-1 является выраженным фактором роста для миеломных клеток и что IGF-1R не экспрессируется нормальными В-клетками и плазматическими клетками, включая плазмо-

бласты. В то же время ген *IGF-1R* aberrантно экспрессируется в 31–50 % случаев у ранее не леченных пациентов с ММ [33]. R. Bataille и соавт. исследовали экспрессию белка IGF-1R в нормальных и малигнизированных плазматических клетках и обнаружили, что IGF-1R aberrантно экспрессируется в миеломных клетках человека. В этой работе была исследована экспрессия IGF-1R у 37 больных с впервые диагностированной ММ и показано, что экспрессия IGF-1R имеет плохое прогностическое значение [34]. W.G. Chng и соавт. исследовали экспрессию мРНК гена *IGF-1R* у 72 больных с впервые диагностированной ММ и отметили, что экспрессия *IGF-1R* увеличивалась в группе больных с плохим прогнозом [35]. Наши данные согласуются с данными перечисленных авторов: ранее мы также показали, что IGF-1 является фактором роста для клеток RPMI1640, RPMI8226 и IM9 [36]. В данной нашей работе мы установили, что мРНК *IGF-1R* экспрессируется преимущественно в миеломных линиях клеток RPMI1640, RPMI8226, H9292 по сравнению с лимфобластоидными клетками IM9.

Мы также исследовали экспрессию мРНК *IGF-1R* в аспиратах костного мозга, полученных от 19 леченных больных, у которых была диагностирована ММ III стадии, и выявили, что мРНК *IGF-1R* экспрессируется у 21 % больных ММ (см. рис. 2). Если сравнить с данными А.С. Sprynski и соавт. [33], которые показали, что *IGF-1R* aberrантно экспрессируется в 31–50 % случаев у ранее не леченных пациентов с ММ, то в нашем случае показатель еще меньше – 21 % больных ММ. Возможно, что при лечении больных ММ часть клеток с положительной экспрессией *IGF-1R* погибает, и, таким образом, смещается соотношение клеток, экспрессирующих *IGF-1R*.

IGF-1R (белок) в клетках может присутствовать в виде гомодимера IGF-1R/IGF-1R и в виде гетеродимеров IGF-1R/IR-A и IGF-1R/IR-B. Оценить присутствие этих белковых комбинаций рецепторов можно только с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров (см. табл. 2). Благодаря полученным данным и с учетом того, что и мРНК рецептора *IGF-1R*, и мРНК рецептора *IR-A* во всех исследованных нами миеломных клетках являются преобладающими, мы можем утверждать, что высока вероятность присутствия гомодимера IGF-1R/IGF-1R и гетеродимера IGF-1R/IR-A и в гораздо меньшей степени – гетеродимера IGF-1R/IR-B. Как было сказано выше, и IGF-1R/IGF1R, и IGF-1R/IR-A с высокой аффинностью связываются с IGF-1 и IGF-2, и последующее фосфорилирование рецепторов преимущественно активируют митогенные сигналы. Известно, что IGF-1 экспрессируется клетками стромы (фибробластами), а также остеобластами и в высокой концентрации присутствует

в микроокружении костного мозга [2]. В этом случае IGF-1 паракринным образом стимулирует пролиферацию миеломных клеток в костном мозге. Мы исследовали и показали (неопубликованные данные), что сами миеломные клетки RPMI1640, RPMI8226 и H929 экспрессируют IGF-1, и в таком случае имеет место аутокринная стимуляция пролиферации миеломных клеток. Аутокринная стимуляция возможна и *in vivo*, о чем свидетельствует наша более ранняя работа. Мы исследовали экспрессию мРНК *IGF-1* в моноклеарной фракции клеток костного мозга, полученных от 26 леченых больных ММ, у которых была диагностирована ММ III стадии, и показали, что мРНК *IGF-1* экспрессируется в 19 случаях. При этом для пациентов с ММ, у которых наблюдался высокий уровень экспрессии *IGF-1*, характерно уменьшение показателя общей выживаемости, и, наоборот, при слабой экспрессии *IGF-1* или при ее отсутствии наблюдалось увеличение общей выживаемости [37].

Что касается INS, то классически считается, что он не связывается с гетеродимером IGF-1R/IR [3], тем не менее имеется работа, в которой доказывалось, что в миеломных клетках INS связывается и активирует IGF-1R/IR и тем самым усиливает рост клеток [26]. В таком случае присутствие в миеломных клетках гомодимера IGF-1R/IGF1R, гетеродимера IGF-1R/IR-A и гомодимера IR-A/IR-A предполагает существенное усиление митогенного эффекта за счет активации этих рецепторов тремя лигандами – IGF-1, IGF-2 и INS, что является неблагоприятным фактором. Это имеет как прогностическое, так и оценочное значение – в качестве терапевтической мишени необходимо ингибировать и IGF-1R, и IR-A. Если ингибировать только IGF-1R, тогда митогенный сигнал будет поступать через гомодимер IR-A/IR-A за счет активации лигандами IGF-2 и INS, что является особенно неблагоприятным для пациентов с ММ с сопутствующим сахарным диабетом, когда онкобольной принимает еще и INS. Как было сказано выше, у больных ММ часто возникает сахарный диабет, индуцированный цитостатиками, и при такой комбинации, когда, с одной стороны, миеломные клетки гиперэкспрессируют IR-A, а с другой – пациентам назначают INS, это, несомненно, будет активировать рост миеломных клеток и явно ухудшит прогноз лечения.

Количественное соотношение IGF-2R:IR-A. Наши исследования показали, что максимальное соотношение мРНК *IGF-2R:IR-A* характерно для лимфобластоидных клеток IM9–30,7, в то время как для миеломных клеток это соотношение в 3 и более раз меньше: в клетках RPMI1640 соотношение мРНК *IGF-2R:IR-A* составляет 10,7, в клетках RPMI8226 – 4,8, в клетках H929 – 1,07 (табл. 6, см. рис. 1).

На основании сравнения ΔCt между линиями клеток мы отмечаем, что наименьшая экспрессия мРНК

IGF-2R характерна для иммортализованных В-клеток IM9 ($\Delta Ct = 14,69$), а в миеломных клетках экспрессия мРНК *IGF-1R* существенно выше (RPMI1640: $\Delta Ct = 9,91$; RPMI8226: $\Delta Ct = 10,96$; H929: $\Delta Ct = 9,42$). Таким образом, полученные нами данные показывают, что для миеломных клеток характерен высокий уровень экспрессии мРНК *IGF-2R* по сравнению с лимфобластоидными клетками. Полученные данные, на первый взгляд, являются противоречивыми: с одной стороны, экспрессия *IGF-2R* в клетках IM9 очень высокая по отношению ко всем другим рецепторам (*IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R*), а с другой – заметно более низкая по сравнению с экспрессией *IGF-2R* в миелоидных клетках. Известно, что рецептор IGF-2R (белок) не имеет тирозинкиназной активности и служит для удаления IGF-2 из экстраклеточного окружения путем связывания его на поверхности клетки [1]. То есть чем больше рецепторов IGF-2R на поверхности клеток, тем большее количество IGF-2 связывается и тем меньшее количество IGF-2 остается для активации IR-A и/или IGF-1R и проявляет митогенный эффект.

Таблица 6. Количественное соотношение IGF-2R:IR-A

Table 6. Quantitative ratio of IGF-2R:IR-A

| Ген Gene | IM9 2 ^{-$\Delta\Delta Ct$} | RPMI1640 2 ^{-$\Delta\Delta Ct$} | RPMI8226 2 ^{-$\Delta\Delta Ct$} | H929 2 ^{-$\Delta\Delta Ct$} |
|---------------|---|--|--|--|
| <i>IR-A</i> | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>IGF-2R</i> | 30,7 | 10,7 | 4,8 | 1,07 |

Вместе с тем имеются данные, согласно которым IGF-2 при связывании с IGF-2R инициирует ERK1/2-сигналинг, регулирующий пролиферацию клеток [38]. На основании этих данных литературы мы предполагаем, что, поскольку в клетках IM9 наблюдается низкий уровень экспрессии как мРНК *IR-A*, так и мРНК *IGF-1R* и в то же время гиперэкспрессия мРНК *IGF-2R*, то в этом контексте возможно, что клеткам IM9 и не нужно чрезмерное воздействие IGF-2. И в этом случае высокая экспрессия IGF-2R позволяет связывать и блокировать IGF-2. В миеломных же клетках наблюдается более низкий, чем в IM9, уровень экспрессии мРНК *IGF-2R* относительно мРНК *IR-A*, однако экспрессия мРНК генов рецепторов *IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R*, включая экспрессию *IGF-2R*, существенно выше, и в этом контексте возможно, что IGF-2/IGF-1R- и IGF-2/IR-A-сигналинг усиливает митогенный статус через активацию ERK1/2.

Во всех исследованных линиях клеток мРНК *IGF-2* экспрессируется очень слабо (неопубликованные данные). В аспиратах костного мозга, полученных от леченых больных, у которых была диагностирована

ММ III стадии, мРНК *IGF-2* экспрессировалась в разной степени в 13 из 23 образцов (неопубликованные данные). По-видимому, для миеломных клеток не характерна аутокринная стимуляция через активацию *IGF-2/IGF-1R*- и *IGF-2/IR-A*-сигналинга. В клиническом материале мы не исследовали экспрессию *IGF-2R*.

Закключение

Мы исследовали количественное соотношение экспрессии мРНК генов рецепторов системы *IGF/INS*: *IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R* и *IGF-2R* в линии лимфобластоидных клеток IM9 и в трех линиях миеломных клеток – RPMI1640, RPMI8226, H929, а также определили частоту экспрессии этих рецепторов в мононуклеарной фракции аспиратов костного мозга, полученных от леченых больных ММ. В ходе исследования мы обнаружили, что внутри каждой линии клеток экспрессия мРНК рецептора *IR-A* является преобладающей по сравнению с экспрессией мРНК *IR-B*. У больных ММ наблюдается высокая частота экспрессии *IR-A* по сравнению с *IR-B*. Минимальное соотношение мРНК *IGF-1R:IR-A* и *IGF-1R:IR-B* характерно для лимфобластоидных клеток IM9 и мак-

симальное — для миеломных клеток. Соотношение *IGF-2R:IR-A* является максимальным для лимфобластоидных клеток IM9, а для миеломных клеток это соотношение в 3 и более раза меньше.

На основании исследования количественного соотношения мРНК рецепторов мы можем утверждать, что в миеломных клетках высока вероятность присутствия гомодимеров (белков) *IGF-1R/IGF1R* и *IR-A/IR-A*, а также гетеродимера *IGF-1R/IR-A*. Эти данные имеют как прогностическое, так и оценочное значение, поскольку указанные комбинации рецепторов предполагают существенное усиление митогенного эффекта за счет активации тремя лигандами – *IGF-1*, *IGF-2* и *INS*, что является неблагоприятным прогностическим фактором.

На основании полученных данных в качестве терапевтической мишени мы рекомендуем ингибировать и рецептор *IGF-1R*, и рецептор *IR-A*. Ингибирование только рецептора *IGF-1R* не исключает митогенный сигнал, поступающий через гомодимер *IR-A/IR-A* за счет активации лигандами *IGF-2* и *INS*, что является неблагоприятным фактором, особенно в том случае, когда больному ММ с сахарным диабетом наряду с химиотерапией назначена инсулинотерапия.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Fettig L.M., Yee D. Advances in insulin-like growth factor biology and-directed cancer therapeutics. *Adv Cancer Res* 2020;147:229–57. DOI: 10.1016/bs.acr.2020.04.005
- Шушанов С.С. Роль инсулиноподобного фактора роста I типа (*IGF-1*) и некоторых других членов системы *IGF/инсулин* в прогрессии множественной миеломы. Российский биотерапевтический журнал 2012;11(3):71–80. Shushanov S.S. The role of insulin-like growth factor I type (*IGF-1*) and some other members of the *IGF/insulin* system in the progression of multiple myeloma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2012;11(3):71–80. (In Russ.).
- Gallagher E.J., LeRoith D. Minireview: *IGF*, insulin, and cancer. *Endocrinology* 2011;152(7):2546–51. DOI: 10.1210/en.2011-0231
- Wang C., Su K., Zhang Y. et al. *IR-A/IGF-1R*-mediated signals promote epithelial-mesenchymal transition of endometrial carcinoma cells by activating *PI3K/AKT* and *ERK* pathways. *Cancer Biol Ther* 2019;20(3):295–306. DOI: 10.1080/15384047.2018.1529096
- Ulanet D.B., Ludwig D.L., Kahn C.R., Hanahan D. Insulin receptor functionally enhances multistage tumor progression and conveys intrinsic resistance to *IGF-1R* targeted therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(24):10791–8. DOI: 10.1073/pnas.0914076107
- Dinchuk J.E., Cao C., Huang F. et al. Insulin receptor (*IR*) pathway hyperactivity in *IGF-1R* null cells and suppression of downstream growth signaling using the dual *IGF-1R/IR* inhibitor, *BMS-754807*. *Endocrinology* 2010;151(9):4123–32. DOI: 10.1210/en.2010-0032
- Zhang H., Pelzer A.M., Kiang D.T., Yee D. Down-regulation of type I insulin-like growth factor receptor increases sensitivity of breast cancer cells to insulin. *Cancer Res* 2007;67(1):391–7. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1712
- Burtrum D., Zhu Z., Lu D. et al. A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth *in vivo*. *Cancer Res* 2003;63(24):8912–21.
- Wulbrand U., Rimmert G., Zöfel P. et al. mRNA expression patterns of insulin-like growth factor system components in human neuroendocrine tumours. *Eur J Clin Invest* 2000;30(8):729–39. DOI: 10.1046/j.1365-2362.2000.00700.x
- Valencia J.C., Matsui K., Bondy C. et al. Distribution and mRNA expression of insulin-like growth factor system in pulmonary lymphangiomyomatosis. *J Investig Med* 2001;49(5):421–33. DOI: 10.2310/6650.2001.33787
- Yamamoto N., Oshima T., Yoshihara K. et al. Clinicopathological significance and impact on outcomes of the gene expression levels of *IGF-1*, *IGF-2* and *IGF-1R*, *IGFBP-3* in patients with colorectal cancer: overexpression of the *IGFBP-3* gene is an effective predictor of outcomes in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett* 2017;13(5):3958–66. DOI: 10.3892/ol.2017.5936
- Kasprzak A. Insulin-like growth factor (*IGF-1*) signaling in glucose metabolism in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2021;22(12):6434. DOI: 10.3390/ijms22126434
- Scotlandi K., Manara M.C., Serra M. et al. Expression of insulin-like growth factor system components in Ewing's sarcoma and their association with survival. *Eur J Cancer* 2011;47(8):1258–66. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.01.007

14. Catellani C., Ravegnini G., Sartori C. et al. GH and IGF system: the regulatory role of miRNAs and lncRNAs in cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:701246. DOI: 10.3389/fendo.2021.701246
15. Mancarella C., Morrione A., Scotlandi K. et al. Novel regulators of the IGF system in cancer. *Biomolecules* 2021;11(2):273. DOI: 10.3390/biom11020273
16. Altieri B., Colao A., Faggiano A. et al. The role of insulin-like growth factor system in the adrenocortical tumors. *Minerva Endocrinol* 2019;44(1):43–57. DOI: 10.23736/S0391-1977.18.02882-1
17. Zheng Y., Sowers J.Y., Houston K.D. et al. IGFBP-1 expression promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells *via* Erk pathway activation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:233. DOI: 10.3389/fendo.2020.00233
18. Nguyen T.N.Q., Jung S., Nguyen H.A. et al. The regulation of insulin receptor/insulin-like growth factor 1 receptor ratio, an important factor for breast cancer prognosis, by TRIP-Br1. *J Hematol Oncol* 2022;15(1):82. DOI: 10.1186/s13045-022-01303-6
19. Tirrò E., Massimino M., Romano C. et al. Prognostic and therapeutic roles of the insulin growth factor system in glioblastoma. *Front Oncol* 2021;10:612385. DOI: 10.3389/fonc.2020.612385
20. Bieghs L., Johnsen H.E., Maes K. et al. The insulin-like growth factor system in multiple myeloma: diagnostic and therapeutic potential. *Oncotarget* 2016;7(30):48732–52. DOI: 10.18632/oncotarget.8982
21. Durie B.G.M., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. *Cancer* 1975;36(3):842–54. DOI: 10.1002/1097-0142(197509)36:3<842::aid-cnrc2820360303>3.0.co;2-u
22. Heckl S.M., Wiesener V., Behrens H.-M. et al. The expression of the insulin receptor in gastric cancer correlates with the HER2 status and may have putative therapeutic implications. *Gastric Cancer* 2019;22(6):1130–42. DOI: 10.1007/s10120-019-00964-6
23. Vella V., Milluzzo A., Scalisi N.M. et al. Insulin receptor isoforms in cancer. *Int J Mol Sci* 2018;19(11):3615. DOI: 10.3390/ijms19113615
24. Freund G.G., Kulas D.T., Mooney R.A. Insulin and IGF-1 increase mitogenesis and glucose metabolism in the multiple myeloma cell line, RPM1 8226. *J Immunol* 1993;151(4):1811–20.
25. Freund G.G., Kulas D.T., Way B.A., Mooney R.A. Functional insulin and insulin-like growth factor-1 receptors are preferentially expressed in multiple myeloma cell lines as compared to B-lymphoblastoid cell lines. *Cancer Res* 1994;54(12):3179–85.
26. Sprynski A.C., Hose D., Kassambara A. et al. Insulin is a potent myeloma cell growth factor through insulin/IGF-1 hybrid receptor activation. *Leukemia* 2010;24(11):1940–50. DOI: 10.1038/leu.2010.192
27. Flannery C.A., Rowzee A.M., Choe G.H. et al. Development of a quantitative PCR assay for detection of human insulin-like growth factor receptor and insulin receptor isoforms. *Endocrinology* 2016;157(4):1702–8. DOI: 10.1210/en.2015-1698
28. Shushanov S.S., Kalinina A.A., Kravtsova T.A. et al. Dual effect exhibited by insulin in myeloma and lymphoblastoid cells. *Biointerf Res Appl Chem* 2021;12(3):2715–28. DOI: 10.33263/BRIAC123.27152728
29. Wu W., Merriman K., Nabaah A. et al. The association of diabetes and anti-diabetic medications with clinical outcomes in multiple myeloma. *Br J Cancer* 2014;111(3):628–36. DOI: 10.1038/bjc.2014.307
30. Zein N., Shehata M., Amer A.M. Carvone's hypoglycemic and hypolipidemic potent activity *via* regulation insulin-induced genes in diabetic hyperlipidemic rats. *Biointerf Res Appl Chem* 2023;13(3):206. DOI: 10.33263/BRIAC133.206
31. Altiti A.J., Khleifat K.M., Alqaraleh M. et al. Protective role of combined *Crataegus aronia* ethanol extract and phytosomes against hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rat. *Biointerf Res Appl Chem* 2023;13(3):207. DOI: 10.33263/BRIAC133.207
32. Gaur P.K., Pal H., Puri D. et al. Formulation and development of hesperidin loaded solid lipid nanoparticles for diabetes. *Biointerf Res Appl Chem* 2020;10(1):4728–33. DOI: 10.33263/BRIAC101.728733
33. 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(19):4614–26. DOI: 10.1182/blood-2008-07-170464
34. Bataille R., Robillard N., Avet-Loiseau H. et al. CD221 (IGF-1R) is aberrantly expressed in multiple myeloma, in relation to disease severity. *Haematologica* 2005;90(5):706–7.
35. Chng W.J., Gualberto A., Fonseca R. IGF-1R is overexpressed in poor-prognostic subtypes of multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20(1):174–6. DOI: 10.1038/sj.leu.2403997
36. Шушанов С.С., Кравцова Т.А., Черных Ю.Б. Факторы, определяющие выживаемость клеток множественной миеломы человека *in vitro*. *Клиническая онкогематология* 2014;7(1):39–45. Shushanov S.S., Kravtsova T.A., Chernykh Yu.B. Factors determining the survival of human multiple myeloma cells *in vitro*. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2014;7(1):39–45. (In Russ.).
37. Шушанов С.С., Кравцова Т.А., Вайман А.В. и др. Гиперэкспрессия IGF-1 – неблагоприятный прогностический фактор при множественной миеломе. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(1):42–9. DOI: 10.17650/1726-97840-2019-18-1-42-49 Shushanov S.S., Kravtsova T.A., Vayman A.V. et al. IGF-1 overexpression is an unfavorable prognostic factor in multiple myeloma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2019;18(1):42–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-97840-2019-18-1-42-49
38. El-Shewy H.M., Lee Mi-H., Obeid L.M. et al. The insulin-like growth factor type I and insulin-like growth factor type 2/ mannose-6-phosphate receptors independently regulate ERK1/2 activity in HEK293 cells. *J Biol Chem* 2007;282(36):26150–7. DOI: 10.1074/jbc.M703276200

Вклад авторов

С.С. Шушанов, Н.П. Акентьева: разработка концепции и дизайна исследования, сбор, обработка, анализ и интерпретация данных, написание и редактирование текста рукописи;

Ю.Б. Черных: предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи;

Т.А. Захарова: сбор и обработка данных, редактирование рукописи.

Author's contributions

S.S. Shushanov, N.P. Akentieva: research concept and design, data collection and processing, data analysis and interpretation, article written and editing;

Y.B. Chernykh: provision of research materials, data analysis and interpretation, editing of the article;

T.A. Zakharova: data collection and processing, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.С. Шушанов / S.S. Shushanov: <https://orcid.org/0000-0002-2273-3024>

Ю.Б. Черных / Yu.B. Chernykh: <https://orcid.org/0000-0002-7271-1560>

Т.А. Захарова / T.A. Zakharova: <https://orcid.org/0000-0001-7545-5876>

Н.П. Акентьева / N.P. Akentieva: <https://orcid.org/0000-0002-9126-3070>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках государственного задания (№ госрегистрации АААА-А19-119071890015-6 и № госрегистрации 2023-0015).

Funding. The study was carried out with financial support within the framework of the state assignment (state registration number АААА-А19-119071890015-6 and state registration number 2023-0015).

Статья поступила: 13.01.2023. Принята к публикации: 24.04.2023.

Article received: 13.01.2023. Accepted for publication: 24.04.2023.