

## ТКАНЕВАЯ СИСТЕМА АКТИВАЦИИ ПЛАЗМИНОГЕНА ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ

**Франциянц Е. М., Комарова Е. Ф., Позднякова В. В., Погорелова Ю. А., Черярина Н. Д., Козлова Л. С., Хохлова О. В.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия (344037, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63), e-mail: [super.gormon@yandex.ru](mailto:super.gormon@yandex.ru)*

Изучен уровень плазмينا, плазминогена, активаторов плазминогена (урокиназный uPA и тканевой tPA активаторы плазминогена) и их ингибитора PAI-1 в цитозольной фракции 40 образцов ткани меланомы кожи pT<sub>1-4</sub>N<sub>0</sub>-xM<sub>0</sub>, ее перифокальной зоны и по линии резекции. Полученные результаты указывают на достоверную связь компонентов тканевой фибринолитической системы с прогрессированием меланомы кожи; показывают, что компоненты системы активации плазминогена имеют патогенетическое значение для роста и развития меланомы кожи и могут быть мишенью для таргетной терапии; позволяют задуматься о границах резекции при меланоме кожи, так как хирургическое вмешательство в окружающее ее метаболически измененное опухолевое поле может способствовать возникновению как местных, так и отдаленных метастазов.

Ключевые слова: плазмин, плазминоген, урокиназный и тканевой активаторы плазминогена, ингибитор активатора плазминогена, меланома.

## TISSULAR SYSTEM OF ACTIVATION OF PLASMINOGEN WITH SKIN MELANOMA

**Frantsiyants E. M., Komarova E. F., Pozdnyakova V. V., Pogorelova Y. A., Cheryarina N. D., Kozlova L. S., Khokhlova O. V.**

*Federal state budget-funded institution of the Ministry of Health of Russia "Rostov scientific and research institute of oncology", Rostov-on-Don, Russia (63, 14 Liniya Str., 344037, Rostov-on-Don), e-mail: [super.gormon@yandex.ru](mailto:super.gormon@yandex.ru)*

The level of plasmin, plasminogen, and plasminogen activators (urokinase uPA and tissue tPA activators of plasminogen) in cytosolic fraction has been studied in 40 samples of tissue taken from skin melanoma pT<sub>1-4</sub>N<sub>0</sub>-xM<sub>0</sub>, its perifocal area and along the resection line. The results obtained indicate that the connection between components of tissular fibrinolytic system and skin melanoma progressing is true. They also show that components of plasminogen activation system have pathogenetic meaning for growth and development of skin melanoma and they may be a target in target therapy. They allow considering resection limits with skin melanoma, as surgical interference in the metabolically changed tumor field around it may foster emergence of both local and remote metastases.

Key words: plasmin, plasminogen, urokinase and tissue activators of plasminogen, inhibitor of plasminogen activator, melanoma.

### Введение

В процессе развития злокачественной опухоли ведущую роль отводят разрушению базальной мембраны протеазами, ассоциированными с неоплазмой [1,2]. Разрушение базальной мембраны и внеклеточного матрикса ассоциированными с опухолью протеазами изменяет пролиферативные и инвазивные свойства опухоли. Активация системы образования плазмина тесно сопряжена со стимуляцией миграции и пролиферации клеток, в том числе и эндотелиальных, что указывает на ее важную роль в процессах неангиогенеза.

Плазмин, образованный из плазминогена, участвует в расщеплении основных компонентов базальной мембраны, активирует латентные факторы роста фибробластов и некоторые изоформы VEGF – основного участника неангиогенеза. Ключевую роль в

активации образования ассоциированных с опухолью протеиназ играют активаторы плазминогена [3]. Уровень и соотношение экспрессии различных компонентов системы активации плазминогена в опухолевой ткани служит показателем биологической агрессивности опухоли, определяющей направленность патологического процесса. А подавление активаторов плазминогена в ткани опухоли может стать одним из подходов к разработке новых видов терапии [1,2]. В настоящее время изучены два типа активаторов плазминогена: активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) и активатор плазминогена тканевого типа (tPA). Клиническими исследованиями доказано, что уровень uPA в опухолевой ткани при некоторых локализациях рака служит диагностическим и прогностическим фактором [3,7].

Целью настоящей работы явилось изучение уровня активаторов плазминогена и их ингибитора в цитозольной фракции ткани меланомы кожи, ее перифокальной зоны и по линии резекции.

### **Материалы и методы**

Были изучены 40 образцов ткани меланомы кожи, полученные при оперативном иссечении опухоли у больных обоего пола: 17 образцов  $pT_{1-2}N_0M_0$  и 23 образца  $pT_{3-4}N_{0-x}M_0$ . У 85 % опухолей имело место эпителиоподобное гистологическое строение. По 5% приходилось на веретенноклеточную, неусоподобную и смешанноклеточную гистологическую структуру. Тканью перифокальной зоны (40 образцов) считали образцы кожи на расстоянии  $1 \pm 0,1$  см от видимого края опухоли, тканью по линии резекции (30 образцов) – образцы кожи на расстоянии  $2 \pm 0,2$  см.

Активность плазмина, плазминогена, uPA антиген, uPA активность, tPA антиген, tPA активность, PAI-1 антиген, PAI-1 активность определяли в 10 % цитозолях, приготовленных на калий-фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 0,1 % Твин-20 и 1 % БСА, методом ИФА с использованием стандартных тест-систем. В качестве контрольных образцов использовали интактную кожу, полученную при оперативном лечении больных без онкопатологии.

Во всех случаях получено письменное добровольное информированное согласие больных на использование материала для научных исследований.

Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета Statistica 6,0 (Stat-Soft, 2001). Оценка достоверности произведена с использованием t-критерия Стьюдента. Уровень  $P < 0,05$  принимали как значимый.

### **Результаты и обсуждение**

Установлено, что уровень показателей системы активации плазминогена в образцах меланомы кожи имел четкую зависимость от степени распространенности процесса (табл. 1).

Так, содержание плазмينا в ткани меланомы кожи при  $pT_{1-2}N_0M_0$  не имело достоверных отличий от контрольных значений, а при  $pT_{3-4}N_{0-x}M_0$  превосходило их в 20,2 раза. При этом уровень плазминогена был снижен в ткани меланомы как при  $pT_{1-2}N_0M_0$ , так и при  $pT_{3-4}N_{0-x}M_0$  в 1,7 раза и 2,9 раза соответственно.

Таблица 1

**Уровень показателей системы активации плазминогена в ткани опухоли при различной распространенности меланомы кожи**

Показатель	ткань меланомы кожи $pT_{1-2}N_0M_0$ (n=17)	ткань меланомы кожи $pT_{3-4}N_{0-x}M_0$ (n=23)	интактная кожа
плазмин, нг/г	22,3±1,7	397,3±32,6 <sup>1,2</sup>	19,6±2,4
плазминоген, нг/г	1,5±0,2 <sup>1</sup>	0,9±0,07 <sup>1,2</sup>	2,6±0,2
uPA антиген, нг/г	15,8±1,3 <sup>1</sup>	38,3±3,4 <sup>1,2</sup>	3,4±0,3
uPA активность, ед/г	0,8±0,06 <sup>1</sup>	2,5±0,18 <sup>1,2</sup>	0,1±0,01
tPA антиген, нг/г	3,2±0,27 <sup>1</sup>	4,1±0,35 <sup>1,2</sup>	1,9±0,16
tPA активность, ед/г	0,8±0,07 <sup>1</sup>	1,4±0,1 <sup>1,2</sup>	0,6±0,04
РАI-1 антиген, нг/г	3,8±0,2	3,8±0,3	4,3±0,5
РАI-1 активность, ед/г	1,6±0,3 <sup>1</sup>	2,6±0,3 <sup>1,2</sup>	0,9±0,15

Примечание: <sup>1</sup> – достоверно по отношению к показателю в интактной коже;

<sup>2</sup> – достоверно по отношению к показателю в ткани меланомы кожи  $pT_{1-2}N_0M_0$

Превращение плазминогена в плазмин происходит под действием двух активаторов, обнаруживаемых во всех тканях млекопитающих, – активаторов плазминогена тканевого (tPA) и урокиназного (uPA) типа [6]. Уровень антигена uPA в ткани меланомы кожи при  $pT_{1-2}N_0M_0$  был в 4,6 раза, а активность uPA – в 8 раза выше, чем в интактной коже. В ткани опухоли при  $pT_{3-4}N_{0-x}M_0$  уровень антигена возрастал в 11,3 раза относительно контрольных величин, а активности – в 25 раз. Уровень tPA антигена увеличивался от  $pT_{1-2}N_0M_0$  до  $pT_{3-4}N_{0-x}M_0$  в 1,7 раза и 2,2 раза, а tPA активность – в 1,3 раза и 2,3 раз соответственно относительно показателей в интактной коже.

Активность активаторов плазминогена регулируется сериновыми протеазами. Наибольшее значение имеет ингибитор активаторов первого типа – РАI-1. Установлено, что уровень РАI-1 антигена при всех стадиях меланомы кожи не имел достоверных отличий от контрольных значений, тогда как его активность была в 1,8 раза выше, чем в ткани интактной кожи при  $pT_{1-2}N_0M_0$  и в 2,9 раза при  $pT_{3-4}N_{0-x}M_0$ .

Таким образом, полученные результаты указывают на достоверную связь компонентов тканевой фибринолитической системы с прогрессированием меланомы кожи и согласуются с рядом исследований, показавших высокий уровень активаторов плазминогена, сопряженный с неблагоприятным прогнозом течения опухолевой болезни. Вместе с тем интересно, что при  $pT_{1-2}N_0M_0$  на фоне сниженного содержания плазминогена и повышенного уровня uPA и tPA не отмечено повышение образования плазмينا, что имеет место при  $pT_{3-4}N_{0-x}M_0$ . Вероятнее всего, в начальных стадиях меланомы под действием активаторов активно идет образование из плазминогена не плазмина, а ангиостатина. Такая возможность показана в карциномах мочевого пузыря и меланоме [5]. Ангиостатин, в свою очередь, препятствует образованию плазмина, участвующего в процессах неоангиогенеза, вмешиваясь во взаимодействие между эндотелиальными клетками и межклеточным матриксом. В случае меланомы кожи, основной точкой приложения действия ангиостатина, вырабатываемого первичной опухолью, является подавление роста метастазов. Это проявляется торможением роста опухолей, которое сопровождается сначала уменьшением в размерах, а затем переходом их в спящее состояние, характеризующееся отсутствием инвазивности. Индукция ангиостатином подобного состояния связана с повышением апоптической гибели клеток опухоли, вызванной отсутствием васкуляризации.

В процессе развития злокачественной опухоли вокруг нее формируется опухолевое поле, в которое, кроме эпителиального компонента, входят клеточные и неклеточные компоненты стромы и сосуды, образующие сосудистое опухолевое поле, являющееся важной составной частью единого опухолевого поля. Определение размеров и изучение метаболизма опухолевого поля позволяет индивидуализировать план лечения: знание истинных границ опухолевого поля при злокачественном новообразовании может служить контролем радикальности оперативных вмешательств или более адекватно планировать поле облучения при злокачественных новообразованиях кожи [4].

Результаты изучения показателей системы активации плазминогена представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Уровень показателей системы активации плазминогена в ткани перифокальной зоны опухоли при различной распространенности меланомы кожи**

Показатель	ткань перифокальной зоны меланомы кожи $pT_{1-2}N_0M_0(n=17)$	ткань перифокальной зоны меланомы кожи $pT_{3-4}N_{0-x}M_0(n=23)$	интактная кожа
плазмин, нг/г	23,4±2,3	356,1±22,3 <sup>1,2</sup>	19,6±2,4

плазминоген, нг/г	1,7±0,2 <sup>1</sup>	1,0±0,1	2,6±0,2
uPA антиген, нг/г	8,3±0,6 <sup>1</sup>	8,5±0,5 <sup>1</sup>	3,4±0,3
uPA активность, ед/г	0,4±0,03 <sup>1</sup>	0,4±0,04 <sup>1</sup>	0,1±0,01
tPA антиген, нг/г	2,2±0,2	4,7±0,4 <sup>1,2</sup>	1,9±0,16
tPA активность, ед/г	0,7±0,03	1,2±0,1 <sup>1,2</sup>	0,6±0,04
РАI-1 антиген, нг/г	3,4±0,4	7,8±0,8 <sup>1,2</sup>	4,3±0,5
РАI-1 активность, ед/г	1,9±0,2 <sup>1</sup>	2,4±0,4 <sup>1</sup>	0,9±0,15

Примечание: <sup>1</sup> – достоверно по отношению к показателю в интактной коже;  
<sup>2</sup> – достоверно по отношению к показателю в ткани перифокальной зоны  
меланомы кожи pT<sub>1-2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>.

Было установлено, что содержание плазмина в ткани перифокальной зоны меланомы кожи при pT<sub>1-2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> также не имело достоверных отличий от показателя в интактной коже и значений в ткани опухоли. Уровень плазмина в ткани перифокальной зоны при pT<sub>3-4</sub>N<sub>0-x</sub>M<sub>0</sub> превосходил контрольные значения в 18,2 раза и не имел достоверных отличий от показателя в ткани меланомы. При этом уровень плазминогена был снижен относительно показателя в интактной коже в 1,5 раза и 2,6 раза соответственно при pT<sub>1-2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> и pT<sub>3-4</sub>N<sub>0-x</sub>M<sub>0</sub> и ни в одном случае не имел достоверных отличий от значений в ткани меланомы.

Уровень антигена и активность uPA в перифокальной зоне меланомы вне зависимости от стадии превосходил контрольные значения в среднем в 2,5 раза и 4 раза соответственно. Содержание антигена и активности tPA в перифокальной зоне меланомы кожи, в отличие от активатора урокиназного типа, имел выраженные изменения, связанные с распространенностью процесса. Так, в ткани перифокальной зоны опухоли при pT<sub>1-2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> антиген и активность tPA не имели достоверных отличий от показателей в интактной коже, тогда как при pT<sub>3-4</sub>N<sub>0-x</sub>M<sub>0</sub> эти показатели были в среднем в 2,2 раза выше, чем в интактной ткани, и не имели достоверных отличий от значений в ткани меланомы.

Уровень РАI-1 антигена в ткани перифокальной зоны опухоли при pT<sub>1-2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> не имел достоверных отличий от контрольных значений и показателя в ткани соответствующей опухоли, при этом его активность была в 2,1 раза выше, чем в ткани интактной кожи, и также достоверно не отличалась от значений в ткани меланомы. В ткани перифокальной зоны при pT<sub>3-4</sub>N<sub>0-x</sub>M<sub>0</sub> уровень антигена и активности РАI-1 были повышены: относительно интактной ткани в 1,8 раза и 2,7 раза. Относительно ткани меланомы pT<sub>3-4</sub>N<sub>0-x</sub>M<sub>0</sub> повысился только уровень антигена в 2,1 раза, а активность не имела достоверных отличий.

Далее мы проанализировали показатели системы активации плазминогена по линии резекции, которая проходила на расстоянии  $2\pm 0,2$  см от видимого края меланомы (табл. 3).

Таблица 3

**Уровень показателей системы активации плазминогена в ткани по линии резекции при различной распространенности меланомы кожи**

Показатель	ткань по линии резекции при меланоме кожи pT <sub>1-2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> (n=7)	ткань по линии резекции при меланоме кожи pT <sub>3-4</sub> N <sub>0-х</sub> M <sub>0</sub> (n=14)	интактная кожа
плазмин, нг/г	21,8±1,4	280,1±18,3 <sup>1,2</sup> (43%) 67,7±8,1 <sup>1,2</sup> (57%)	19,6±2,4
плазминоген, нг/г	2,7±0,3	1,1±0,1 <sup>1,2</sup>	2,6±0,2
uPA антиген, нг/г	2,8±0,3	3,6±0,5	3,4±0,3
uPA активность, ед/г	0,07±0,01	0,1±0,02	0,1±0,01
tPA антиген, нг/г	2,2±0,3	5,6±0,4 <sup>1,2</sup>	1,9±0,16
tPA активность, ед/г	0,6±0,05	1,0±0,09 <sup>1,2</sup>	0,6±0,04
РАI-1 антиген, нг/г	4,4±0,5	3,5±0,4	4,3±0,5
РАI-1 активность, ед/г	1,4±0,35	1,0±0,2	0,9±0,15

Примечание: <sup>1</sup> – достоверно по отношению к показателю в интактной коже;  
<sup>2</sup> – достоверно по отношению к показателю в ткани по линии резекции при меланоме кожи pT<sub>1-2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>.

Как следует из результатов, представленных в таблице 3, все изученные показатели по линии резекции при pT<sub>1-2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> соответствовали значениям в интактной ткани. Иная ситуация отмечена при pT<sub>3-4</sub>N<sub>0-х</sub>M<sub>0</sub>. В ткани по линии резекции у 6 из 14 человек активность плазмينا превосходила контрольные величины в 14,3 раза, а у 8 больных – в 3,5 раза. При этом у всех больных уровень плазминогена был снижен в 2,4 раза. Не найдено изменения показателей антигена и активности активатора урокиназного типа и ингибитора активаторов РАI-1. Вместе с тем уровень антигена и активности активатора плазминогена тканевого типа был повышен в коже по линии резекции всех обследованных больных в 2,9 раза и 1,7 раза соответственно.

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что компоненты системы активации плазминогена имеют патогенетическое значение для роста и развития меланомы кожи, которые могут быть мишенью для таргетной терапии. Особое внимание обращают показатели в перифокальной зоне опухоли, которые практически полностью повторяют

значения в самой опухоли. С одной стороны, это свидетельствует о том, что меланома кожи не является локальным заболеванием, а в его патогенез вовлечены, по крайней мере, окружающие структуры. С другой стороны, полученные результаты позволяют задуматься о границах резекции при меланоме кожи, так как хирургическое вмешательство в окружающее ее метаболически измененное опухолевое поле может способствовать возникновению как местных, так и отдаленных метастазов. Прежде всего, это касается меланомы, размеры которой выходят за рамки T<sub>1,2</sub>.

### Список литературы

1. Герштейн Е. С. Система активации плазминогена как показатель метастатической активности опухолей и потенциальная мишень противоопухолевой терапии // Материалы IV ежегодной Российской онкологической конференции. – Москва, 2000. – С. 21.
2. Герштейн Е. С., Кушлинский Н. Е. Активаторы плазминогена урокиназного и тканевого типов и их ингибитор PAI-1 в опухолях человека // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2001. – Т.131, № 1. – С. 81.
3. Кушлинский Н. Е., Казанцева И. А., Сандыбаев М. Н. и др. Активаторы плазминогена урокиназного и тканевого типов и их ингибитор при заболеваниях щитовидной железы // Сибирский онкологический журнал. – 2006. – № 3 (19). – С. 54-58.
4. Розенфельд Л. Г., Колотилов Н. Н. Дистанционная инфракрасная термография в онкологии // Онкология. – 2001. – № 2-3. – С. 103-106.
5. Киселев С. М., Луценко С. В., Северин С. Е., Северин Е. С. Ингибиторы опухолевого ангиогенеза (обзор) // Биохимия. – 2003. – Т. 68. – Вып. 5. – С. 611-631.
6. Парфенова Е. В., Плеханова О. С., Ткачук В. А. Система активаторов плазминогена в ремоделировании сосудов и ангиогенезе (обзор) // Биохимия. – 2002. – Т. 67. – Вып. 1. – С. 139-156.
7. Lisboa B. W., Friedrichs K., Riethdorf L. et al. Urokinase plasminogen activator (uPA) and its type-1 inhibitor (PAI-1) are superior to the Nottingham Prognostic Index NPI in predicting relapse in node-negative breast cancer patients // Breast Cancer Res. Treat. – 2000. – Vol.64. – P. 40.

### Рецензенты:

Каймакчи Олег Юрьевич, д-р мед. наук, ассистент кафедры онкологии Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону.

Николаева Надежда Владимировна, д-р мед. наук, ассистент кафедры онкологии Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону.