

## **АКТИВНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ АКТИВАЦИИ ПЛАЗМИНОГЕНА И НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ НЕОАНГИОГЕНЕЗА В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ ПЕРЕВИВАЕМОЙ МЕЛАНОМЫ B16/F10**

**Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Погорелова Ю.А., Ткаля Л.Д., Черярина Н.Д.**

*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России. Россия, 344037, Ростов-на-Дону, 14 линия, 63. E-mail: super.gormon@yandex.ru*

В патогенезе опухолевого роста велика роль активации протеолитических ферментов, участвующих в разрушении базальной мембраны и внеклеточного матрикса, а также в построении новых сосудов. Ведущая роль в этих процессах отводится плазмину и его активаторам плазминогена урокиназного и тканевого типа. Соотношение различных компонентов фибринолитической системы характеризует биологическую агрессивность опухоли. Результаты исследования выявили уже на ранних сроках (3-7 день) после перевивки опухоли динамическое накопление плазмينا, обусловленное увеличением активности и уровня tPA и PAI-1. При этом активность uPA снижалась, несмотря на увеличение его уровня. В дальнейшем, после появления меланомы, в неповрежденной коже животных произошла смена приоритетов между uPA и tPA. Активность первого резко увеличилась, а активность второго, напротив, снизилась до нормативных величин. При этом содержание обоих активаторов оставалось значительно выше нормы. Такое же соотношение компонентов системы было характерно и для перифокальной зоны. Результаты, полученные в настоящем исследовании, позволяют говорить о формировании опухолевого поля задолго до «выхода» перевитой экспериментальной меланомы B16/F10.

Ключевые слова: меланома B16/F10, плазминоген, активаторы плазминогена урокиназного и тканевого типа (uPA и tPA).

## **THE ACTIVITY OF PLASMINOGEN ACTIVATION SYSTEM COMPONENTS AND SOME FACTORS OF NEOANGIOGENESIS IN THE DEVELOPMENT DYNAMICS OF TRANSPLANTABLE MELANOMA B16/F10**

**Frantsiyants E.M., Bandovkina V.A., Pogorelova Y.A., Tkalya L.D., Cheryarina N.D.**

*Rostov Research Institute of Oncology. Rostov-on-Don, 344037 14 Line 63. Russia. E-mail: super.gormon@yandex.ru*

The proportion of various plasminogen activation system components can characterize the biological aggressiveness of a tumor. Results of the research have revealed accumulation of plasmin conditioned by increased activity and higher tPA and PAI-1 level already in the early stages, on day 3-7 after transplantation of the tumor. The activity of uPA went down in spite of its level rising. After emergence of melanoma, in the intact skin of animals, priorities changed: uPA activity increased while that of tPA decreased against a high content of both activators in the tissue. The same proportion of the system components was also characteristic for the perifocal area. In the melanoma, the increase of both plasmin itself and urokinase and tissue type activators was registered. The results obtained in this research allow speaking about the formation of tumor field long before the "surfacing" of grafted test melanoma B16/F10.

Keywords: melanoma B16/F10, plasminogen, urokinase and tissue type plasminogen activators (uPA and tPA).

Знание специфических биологических характеристик опухоли может помочь и в усовершенствовании существующих схем терапии, а также в разработке новых подходов к диагностике, лечению и общему прогнозу течения злокачественных новообразований [4]. Фундаментальным свойством злокачественных опухолей является их способность к метастазированию и инвазии, основным механизмом которых является разрушение базальной мембраны и внеклеточного матрикса ассоциированными с опухолью протеазами [1]. Активация протеолитических ферментов играет существенную роль в патогенезе злокачественных заболеваний. Особенный интерес привлекает система активации

плазминогена, представляющая собой каскад протеолитических ферментов, участвующих в разрушении базальной мембраны и внеклеточного матрикса, который представляет собой циклическую амплификацию, регулируемую по механизму обратной связи. Образование плазмина происходит под действием активаторов плазминогена урокиназного (uPA) и тканевого (tPA) типа, активность которых подавляется 2 белковыми ингибиторами PAI-1 и PAI-2, принадлежащими к семейству серпинов [2; 5]. Ведущая роль в этом каскаде принадлежит активаторам плазминогена, превращающим неактивный плазминоген в активный плазмин [2; 3; 9].

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 [2; 3]. Система активации плазминогена имеет непосредственное отношение к построению новых кровеносных сосудов в опухоли, т.е. к неоангиогенезу.

При изучении уровня активаторов плазминогена и их ингибитора в цитозольной фракции ткани меланомы кожи людей, ее перифокальной зоны и по линии резекции было показано, что компоненты системы активации плазминогена имеют большое значение для роста и развития меланомы кожи и могут быть мишенью для таргетной терапии. Особое внимание обращали на себя показатели в перифокальной зоне опухоли, которые практически полностью повторяли значения в самой опухоли. Это свидетельствовало о том, что меланома кожи не является локальным заболеванием, а в его патогенез вовлечены, по крайней мере, окружающие структуры [6].

Для выяснения роли компонентов системы активации плазминогена в патогенезе развития меланомы кожи целесообразно использовать экспериментальные исследования.

Целью настоящего исследования явилось изучение активности системы активации плазминогена и уровня факторов ангиогенеза в ткани кожи, опухоли и ее перифокальной зоне в динамике роста экспериментальной меланомы В 16/ F10.

### **Материал и методы**

Работа выполнена на самках мышей линии C57BL/6 (n=40), 8-недельного возраста с начальной массой 22-24 г. Животные были получены из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область). В работе использовали клеточную линию мышинной, метастазирующей в легкие меланомы В16/F10, полученную из РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва). Животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Все исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных

рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики». Перевивка меланомы B16/F10 производилась путем подкожного введения в правую заднюю лапку мыши 0,1 мл взвеси опухолевой ткани в растворе Хенкса по стандартным методикам. Мышам контрольной группы осуществлялось подкожное введение 0,5 мл раствора Хенкса. Рост опухоли оценивали путем ежедневного замера диаметров ее в трех взаимно перпендикулярных областях, с последующим расчетом объема опухоли как произведение трех ее замеров.

В первую, вторую и третью недели эксперимента животных быстро декапитировали, все процедуры проводили в соответствии с международными правилами работы с животными (European Communities Council Directive, 86/609/ЕЕС). Опухоль, перифокальную зону и кожу выделяли сразу после декапитации. Из тканей получали 10%-ные цитозольные фракции, приготовленные на 0,1М калий-фосфатном буфере рН 7,4, содержащем 0,1% Твин-20 и 1% БСА, в которых с помощью стандартных тест-систем ИФА-методами определяли уровень: плазминогена, содержания и активности uPA, t-PA и PAI-I (Technoclone, Австрия).

Статистическая обработка материала проводилась с помощью программы Statistica 6,0 с определением средних значений с указанием стандартных отклонений. Значимость различий средних показателей оценивалась с помощью критерия суммы рангов Вилкоксона. Существенными считали различия при  $p < 0,05$ .

### **Результаты и обсуждение**

Установлено, что уровень показателей системы активации плазминогена в образцах кожи мышей в динамике роста перевивной меланомы имел четкую временную зависимость (табл. 1). Так, уже на 3-и сутки после перевивки самкам меланомы B16/F10 в коже животных отмечено увеличение большинства показателей системы активации плазминогена относительно показателей в коже интактных мышей: уровень плазмина возрос на 29,9%, активность tPA – в 1,3 раза, содержание tPA - в 2,3 раза, активность и содержание PAI-1 – в 1,5 и 2,6 раза соответственно. Исключение составила активность uPA, которая на 3-и сутки была ниже показателей в интактной коже на 25%, при этом содержание uPA, напротив, было выше показателя в интактной коже почти в 2 раза.

Через 7 дней после перевивки опухоли в коже самок мышей часть показателей продолжали увеличиваться: активность и содержание tPA – на 33,4% и в 4,6 раза соответственно, активность и содержание PAI-1 – в 2,8 и 2,7 раза соответственно, содержание uPA – в 2,7 раза относительно предыдущего срока исследования. Активность uPA осталась на прежнем уровне.

Активность и содержание компонентов фибринолитической системы в динамике роста В16 у самок мышей

	плазмин (нг/гтк)	uPA акт. (ед/гтк)	uPA сод. (нг/гтк)	tPA акт. (ед/гтк)	tPA сод. (нг/гтк)	PAI-1 акт. (ед/гтк)	PAI-1 сод. (нг/гтк)
Кожа интактная	10,7±0,7	1,6±0,12	31,7±2,1	0,6±0,04	0,4±0,02	24,0±0,16	9,9±0,4
3 дня кожа	12,9±0,5 <sup>1</sup>	1,2±0,07 <sup>1</sup>	61,8±4,2 <sup>1</sup>	0,8±0,05 <sup>1</sup>	0,9±0,04 <sup>1</sup>	35,1±2,1 <sup>1</sup>	25,5±1,3 <sup>1</sup>
7 дней кожа	13,9±0,8	1,2±0,10	164,3±7,6 <sup>2</sup>	1,0±0,06 <sup>2</sup>	4,1±0,3 <sup>2</sup>	98,5±7,4 <sup>2</sup>	68,5±5,2 <sup>2</sup>
2 недели введения меланомы В16							
Кожа	19,0±1,0 <sup>1</sup>	1,8±0,11 <sup>2</sup>	185,4±8,9 <sup>1</sup>	0,7±0,05 <sup>2</sup>	2,6±0,18 <sup>1,2</sup>	83,1±5,3 <sup>1</sup>	150,1±12 <sup>1,2</sup>
Опухоль	36,5±1,2 <sup>1,3</sup>	2,9±0,16 <sup>1,3</sup>	354,9±21 <sup>1,3</sup>	2,7±0,20 <sup>1,3</sup>	14,4±1,2 <sup>1,3</sup>	129,1±9,4 <sup>1,3</sup>	161,1±14 <sup>1</sup>
П/ зона	19,6±1,0 <sup>1</sup>	1,8±0,09	185,1±14 <sup>1</sup>	0,7±0,04	2,5±0,19 <sup>1</sup>	131,1±12 <sup>1</sup>	156,0±11,4
3 недели введения меланомы В16							
Кожа	19,9±1,1 <sup>1</sup>	2,5±0,2 <sup>1,2</sup>	187,5±13 <sup>1</sup>	0,7±0,03	2,0±0,15 <sup>1</sup>	24,0±1,4 <sup>2</sup>	24,5±1,8 <sup>2</sup>
Опухоль	36,4±1,5	2,8±0,19	335,5±23	2,2±0,19	12,3±0,9	71,1±4,2	79,5±6,3
П/ зона	18,9±1,2	2,6±0,17	186,5±12,5	0,7±0,06	2,5±0,13	81,0±5,8	71,6±5,2

Примечание: 1 – достоверно по отношению к показателям в интактной коже; 2 - достоверно по отношению к показателям предыдущего срока исследования; 3 - достоверные отличия от кожи у животных одного срока исследования  $p < 0,05$ .

На 10-е сутки после перевивки меланомы В16/F10 у самок опытных групп был отмечен «выход» опухоли. На 14-е сутки от момента перевивки меланомы В16/F10 средний объем опухоли составил 2,1 см<sup>3</sup>. В этот срок в коже животных, не пораженной злокачественным процессом, произошли значимые изменения в системе активации плазминогена. Это выразалось, прежде всего, в смене приоритетов между tPA и uPA. Так, активность uPA резко возросла относительно предыдущего срока исследования в 1,5 раза, превосходя значения в интактной коже на 12,5%. Активность tPA, напротив, снизилась на 30% относительно показателя на 7-е сутки. Разнонаправленным было и изменение содержания активаторов: uPA повысилось на 12,8%, а tPA снизилось в 1,6 раза. Не изменилась в этот срок исследования активность PAI-1, хотя его содержание увеличилось более чем в 2 раза. На таком фоне активаторов и ингибиторов активаторов плазминогена уровень плазмينا в коже, не пораженной злокачественным процессом, не изменился относительно предыдущего срока и оставался в 1,8 раза выше нормативных значений.

Через 21 день после перевивки опухоли (средний объем опухоли 3,4 см<sup>3</sup>) в коже самок мышей, не пораженной злокачественным процессом, найдено дальнейшее нарастание активности uPA на 38,9% относительно показателя на 14-е сутки без изменения его уровня, и резкое падение активности и содержания PAI-1 в 3,5 и 6,1 раза соответственно. Уровень плазмينا, активность и содержание tPA не имели отличий от предыдущего срока исследования.

Ткань опухоли имела значимые отличия как от кожи самок мышей через 14 суток от момента перевивки меланомы В16/F10, так и от кожи интактных животных. Уровень плазмينا в меланоме был выше, чем в интактной коже, в 3,4 раза, и выше, чем в коже, не

пораженной злокачественным процессом, почти в 2 раза. Активность и содержание tPA в опухоли превосходили показатели в интактной коже в 4,5 и 36 раз соответственно, а показатели в коже, не пораженной злокачественным процессом, - в 3,9 и 5,5 раза соответственно. Активность и содержание uPA в опухоли превосходили показатели в интактной коже в 1,8 и 11,2 раза соответственно, а показатели в коже, не пораженной злокачественным процессом, - в 1,6 и 1,9 раза соответственно. Активность и содержание PAI-1 в ткани меланомы была выше, чем в интактной коже, в 5,4 и в 16,3 раза соответственно. При этом активность PAI-1 была выше и значений в коже, не пораженной злокачественным процессом, в 1,6 раза, а содержание не имело значимых отличий.

В перифокальной зоне на 14-е сутки с момента перевивки меланомы B16/F10 уровень плазминогена был в 1,9 раза выше, чем в интактной коже, содержание uPA и tPA – выше в 5,8 и 6,3 раза соответственно, на фоне не измененной активности, PAI-I активность и содержание превышали норму в 5,5 и 15,8 раза.

Через 21 день после перевивки меланомы B16/F10 практически все показатели системы активации плазминогена, исключая активность u-PA и активность и содержание PAI-1, в исследуемых тканях самок мышей не имели достоверных отличий от соответствующих значений в предыдущий срок исследования, т.е. на 14-е сутки. Активность uPA в коже и перифокальной зоне возросла в 1,4 раза по сравнению с предыдущим сроком исследования. Активность и содержание PAI-1, напротив, резко снизились во всех образцах: в коже, не затронутой злокачественным процессом, – в 3,5 и 6,1 раза, в ткани опухоли – в 1,8 и 2 раза, в ткани перифокальной зоны – в 1,6 и 2,2 раза соответственно. Следует отметить, что показатели в ткани опухоли и ее перифокальной зоны не имели статистически значимых отличий (табл. 1). Возможно, в этот срок происходит истощение ингибитора PAI-1, принадлежащего к семейству серпинов.

Анализируя полученные результаты, следует заключить, что экспериментальная меланома B16/F10, растущая у самок мышей линии C57BL/6, вне зависимости от объема характеризуется повышенной активностью всех компонентов системы активации плазминогена, приводящей к повышенному содержанию в ней плазминогена. Изменения в экспрессии отдельных компонентов системы активации плазминогена являются практически универсальными для многих типов злокачественных опухолей, экспериментальные результаты только подтвердили этот факт.

Более интересными, на наш взгляд, представляются результаты, полученные при изучении показателей системы активации плазминогена в ткани кожи мышей до появления опухоли, т.е. через 3 и 7 суток после инокуляции клеток опухоли животным. Прежде всего, обращает внимание, что в эти сроки уже отмечается динамическое накопление плазмينا,

обусловленное активацией отдельных компонентов системы активации плазминогена, а именно увеличением активности и уровня tPA и PAI-1. При этом активность uPA снижалась, несмотря на увеличение его уровня. В дальнейшем через 14 суток после появления меланомы в коже животных, не затронутой злокачественным процессом, произошла смена приоритетов между uPA и tPA. Активность первого резко увеличилась, а активность второго, напротив, снизилась до нормативных величин. При этом содержание обоих активаторов оставалось значительно выше относительно кожи интактных мышей. Такое положение сохранялось в коже, не затронутой злокачественным процессом, в более поздние сроки роста экспериментальной меланомы. И такое же соотношение активаторов плазминогена, а именно высокая активность uPA и нормальная tPA отмечалась в перифокальной зоне опухоли. Учитывая тот факт, что tPA секретируется в основном эндотелиальными клетками, вероятно, первым этапом формирования опухолевого поля является активация неоангиогенеза, возможно, в виде васкулогенной мимикрии, которая характерна для меланомы кожи у людей [7].

Перифокальная или перитуморозная зона злокачественных новообразований имеет важное биологическое значение. Именно к этой зоне относится понятие «опухолевое поле». Изучение изменений тканей, граничащих с опухолью, важно для выявления фоновых процессов, способствующих развитию опухоли, и пониманию механизмов прогрессии уже возникшей опухоли [8]. Гипотеза опухолевого поля заключается в том, что канцерогенный агент вызывает образование поля потенциально неопластических клеток. Злокачественная опухоль может развиваться в результате размножения одной или большого количества клеток внутри этого поля.

Результаты, полученные в настоящем исследовании, позволяют говорить о следующем: «опухолевое поле», характеризующееся особым метаболическим статусом, а именно активацией системы образования плазмина, формируется задолго до «выхода» перевитой экспериментальной меланомы. Сходные показатели системы активации плазминогена в коже, не затронутой злокачественным процессом, и зоне, непосредственно прилегающей к злокачественной опухоли, подтверждают это положение. Вероятно, при росте меланомы B16/F10 нет четких границ зоны «опухолевого поля».

### **Список литературы**

1. Герштейн Е.С. Биологические маркеры как основа персонализированной терапии в клинической онкологии // Молекулярная медицина. - 2015. - № 2. - С. 19-23.
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. 81-84.

3. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Бацев А.Ф., Дворова Е.К., Матякин Е.Г. uPA, tPA и их ингибитор PAI-1 в опухолях больных раком слизистой оболочки полости рта: взаимосвязь с основными клинико-морфологическими факторами // Российский биотерапевтический журнал. - 2009. – Т. 8. - № 4. - С. 29-32.

4. Огнерубов Н.А., Герштейн Е.С., Казьмин А.И., Кушлинский Н.Е. Система активации плазминогена при раке желудка // Успехи современного естествознания. – 2003. – № 8. – С. 25-28.

5. 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.

6. Франциянц Е.М., Комарова Е.Ф., Позднякова В.В., Погорелова Ю.А., Черярина Н.Д., Козлова Л.С., Хохлова О.В. Тканевая система активации плазминогена при меланоме кожи // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 2. - URL: [www.science-education.ru/108-8848](http://www.science-education.ru/108-8848).

7. Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Погорелова Ю.А., Черярина Н.Д. Факторы роста эндотелия сосудов и рецепторов в динамике развития перевиваемой меланомы В16/F10 // Российский онкологический журнал. - 2015. - № 2. - С. 32-37.

8. Черданцева Т.М., Бобров И.П., Климачев В.В., Брюханов В.М., Лазарев А.Ф., Авдалян А.М., Гервальд В.Я., Долгатов А.Ю. Гистологическое строение и некоторые особенности биосинтетических и пролиферативных процессов в перитуморозной зоне рака почки в зависимости от плоидности опухоли // Фундаментальные исследования. - 2011. - № 9. - С. 553-557.

9. Gershtein E.S., Batsev A.F., Matyakin E.G., Kushlinskii N.E. Urokinase and tissue plasminogen activators and their PAI-1 inhibitor in tumors of patients with oral mucosal cancer: relationship with the main clinical morphological factors // Bull. Exp. Biol. Med. - 2010. - Vol. 149, N. 3. - P. 347-350.

#### **Рецензенты:**

Моисеенко Т.И., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отделения опухолей репродуктивной системы ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;

Максимова Н.А., д.м.н., профессор, руководитель радиоизотопной лаборатории с группой

УЗИ диагностики ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»  
Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.