

## СВОБОДНЫЙ И СВЯЗАННЫЙ ПЛАЗМИН В ОПУХОЛИ И ПРИЛЕЖАЩИХ ТКАНЯХ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ПИЩЕВОДА У МУЖЧИН И ЖЕНЩИН

Кит О.И.<sup>1</sup>, Франциянц Е.М.<sup>1</sup>, Козлова Л.С.<sup>1</sup>, Колесников Е.Н.<sup>1</sup>, Кациева Т.Б.<sup>1</sup>, Кожушко М.А.<sup>1</sup>, Чугунова Н.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: super.gormon@yandex.ru

С помощью ИФА изучено содержание плазминогена (ПГ), свободного плазмина (П) и связанного в комплекс с  $\alpha_2$ -антиплазмином (РАР), урокиназного активатора плазминогена (uPA), ингибитора-1 активаторов плазминогена (PAI-1) в тканях плоскоклеточного рака пищевода без метастазов (st II, G2, T<sub>2-3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>) у мужчин и женщин в сравнительном аспекте. В условно здоровой ткани по линии резекции у мужчин и женщин различия практически отсутствуют, кроме uPA-акт, которого у мужчин в 1,3 раза больше, чем у женщин. В ткани опухоли установлены достоверные гендерные различия по ПГ, П, uPA, PAI-1 с преобладанием их в тканях мужчин. В ткани перифокальной зоны опухоли количество П у мужчин и женщин не различалось, но у всех было выше, чем в ткани по линии резекции. PAI-1-АГ в перитуморозной ткани женщин был выше, чем у мужчин, в 2,3 раза при одинаково повышенном PAI-1-акт. Предполагается наличие опухоль-ассоциированных uPA, ПГ и PAI-1 у мужчин, PAI-1 – у женщин.

Ключевые слова: рак пищевода, гендерные различия, плазмин, урокиназа, PAI-1

## FREE AND BOUND PLASMIN IN TUMORS AND ADJACENT TISSUES OF MEN AND WOMEN WITH ESOPHAGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Kit O.I.<sup>1</sup>, Frantsiyants E.M.<sup>1</sup>, Kozlova L.S.<sup>1</sup>, Kolesnikov E.N.<sup>1</sup>, Katsieva T.B.<sup>1</sup>, Kozhushko M.A.<sup>1</sup>, Chugunova N.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: super.gormon@yandex.ru

Levels of plasminogen (PG), free plasmin (P) and plasmin- $\alpha_2$ -antiplasmin complex (PAP), urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) were studied by ELISA in tissues of non-metastatic esophageal squamous cell carcinoma (st II, G2, T<sub>2-3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>) and compared in male and female patients. Gender differences were almost absent in apparently healthy tissues along the resection line, except for the uPA-act that was 1.3 times higher in men than in women. Tumor tissues showed significant gender differences in levels of PG, P, uPA and PAI-1 with their predominance in men. P in the perifocal zone of men and women did not differ and was higher than in the resection line. PAI-1-Ag in peritumoral tissues of females 2.3 times exceeded the value in males, with PAI-1-act being similarly increased. The presence of tumor-associated uPA, PG and PAI-1 in men and PAI-1 in women is supposed.

Keywords: esophageal cancer, gender differences, plasmin, urokinase, PAI-1

По гистологическому строению более 95% форм рака пищевода являются плоскоклеточными. Плоскоклеточный рак пищевода развивается в возрасте 50-70 лет, у мужчин в 3-10 раз чаще, чем у женщин [10]. Резкие колебания в распространенности и соотношении заболеваемости между мужчинами и женщинами чаще всего объясняют неблагоприятными экологическими условиями среды обитания, наличием вредных привычек, характером питания. Частота рака нарастает от проксимального к дистальному отделу пищевода. Возникшие вначале очаговые или диффузные атрофические изменения слизистой оболочки трансформируются на фоне повышенной митотической активности эпителиальных клеток в очаги дисплазии и пролиферации. Неполноценный эпителий в зоне этих очагов в последующем перерождается в ранний рак пищевода.

Для выделения групп пациентов с возможностью рецидива заболевания и/или оценки лекарственной резистентности опухоли широко используется определение в опухолях молекулярно-биологических тканевых маркеров, многие из которых являются протеолитическими ферментами [4; 7]. Роль протеолиза в развитии неоплазии широко изучается, но остаётся много вопросов, связанных с вовлеченностью протеолитических ферментов в канцерогенез.

Ключевые процессы в морфогенезе тканей (миграция и пролиферация клеток) инициируются и опосредуются плазмином, активация плазминзависимого протеолиза обеспечивает стимуляцию ангиогенеза и неоваскуляризацию новообразований, плазминоген является единственным источником ангиостатина [2; 5]. Для многих локализаций рака установлено, что уровень и соотношение компонентов активации плазминогена, экспрессии плазмина и степень его инактивации  $\alpha_2$ -антиплазмином в опухолевой ткани могут служить показателем метастатической и инвазивной активности опухоли [6; 8; 11].

**Цель исследования:** изучение содержания плазминогена (ПГ), свободного плазмина (П) и связанного в комплекс с  $\alpha_2$ -антиплазмином (РАР), урокиназного активатора плазминогена (uРА), ингибитора-1 активаторов плазминогена (РАI-1) в тканях плоскоклеточного рака пищевода у мужчин и женщин в сравнительном аспекте.

**Материалы и методы.** Разрешение этического комитета РНИОИ на использование операционного материала для научных целей, а также информированное согласие пациентов получено до начала работы. Исследована опухолевая ткань плоскоклеточного рака пищевода без метастазов, её перифокальная зона от 40 больных (29 мужчин, 11 женщин в менопаузе, 38-72 лет, st II, G2, T<sub>2-3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>). Результаты сравнивали с гистологически неизменённой тканью из области линии резекции, которую считали условно здоровой. Гистологический контроль проводился во всех случаях. Все компоненты определяли в 10%-ных гомогенатах, приготовленных на стерильном физиологическом растворе, с последующим пересчётом на 1 г влажной ткани.

Методом ИФА со стандартными тест-наборами ELISA определяли плазмин, связанный в комплекс с  $\alpha_2$ -антиплазмином (РАР), урокиназный активатор плазминогена (uРА), ингибитор активаторов плазминогена-1 (РАI-1); плазминоген (ПГ) и свободный плазмин (П) определяли спектрофотометрическим методом. Статистика: обработку полученных цифровых данных осуществляли при помощи пакета сертифицированных прикладных программ Statistica v. 10 и Microsoft Excel XP. Достоверность различий между количественными показателями вычисляли с помощью t-критерия Стьюдента. Уровень  $p < 0,05$  принимали как значимый.

**Результаты и обсуждение.** Система фибринолиза, помимо тромболиза, играет важную физиологическую и патологическую роль в ряде других жизненно важных процессов: деградации внеклеточного матрикса, эмбриогенезе, миграции клеток, ремоделировании тканей, заживлении ран, ангиогенезе, воспалении и миграции опухолевых клеток [2; 9]. Во всех образцах ткани пищевода обнаружены ПГ, П, PАР, uРА и РАI-1 и установлены достоверные гендерные различия.

Содержание ПГ и П в ткани по линии резекции у мужчин и женщин не различалось (табл.). В ткани опухоли содержание ПГ у мужчин было выше, чем у женщин, в 5,0 раз; у женщин, в сравнении с тканью по линии резекции, оно было понижено в 3,3 раза, а у мужчин – повышено в 1,4 раза ( $p < 0,01$ ). В ткани, окружающей опухоль или её перифокальной зоне, содержание ПГ у мужчин было в 2,1 раза выше, чем у женщин. При этом, относительно условно здоровой ткани по линии резекции, содержание плазминогена было понижено у мужчин в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ), у женщин – в 2,3 раза. Активность П в ткани по линии резекции у всех больных была достоверно ниже, чем в остальных образцах, но у мужчин в 1,4 раза выше, чем у женщин (табл.). В ткани опухоли плоскоклеточного рака пищевода и её перифокальной зоне у мужчин активность П была в 3,4 и 2,8 раза выше, чем в ткани по линии резекции. У женщин в ткани опухоли и её перифокальной зоне активность П была выше, чем в ткани по линии резекции в 2,8 и 3,5 раза, соответственно. По активности П в ткани опухоли установлены достоверные различия: у мужчин в 1,7 раза выше, чем у женщин. В перифокальной зоне различия в активности П между тканями мужчин и женщин статистически не подтвердились:  $p = 0,0508$ .

Важную информацию могут дать коэффициенты соотношения «предшественник/фермент», в данном случае – ПГ/П (табл.).

### Фибринолитическая система при раке пищевода без метастазов у женщин и мужчин

Плоскоклеточный рак (T <sub>2-3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ), M±m						
Вид ткани	Линия резекции		Перифокальная зона		Опухоль	
Пол больных	мужчины	женщины	мужчины	женщины	мужчины	женщины
	1	2	3	4	5	
ПГ    КЕ/г	51,15±4,0	46,26±3,3	42,60±3,2 <sup>1</sup>	20,49±1,5 <sup>2,3</sup>	<b>69,41±5,1</b> <sup>1,3</sup>	13,91±1,2 <sup>2,4,5</sup>
П    КЕ/г	28,63±2,2	20,46±1,4	<b>79,98±6,1</b> <sup>1</sup>	<b>72,36±5,8</b> <sup>2</sup>	<b>96,14±7,1</b> <sup>1,3</sup>	56,55±4,5 <sup>2,4,5</sup>
РАР    мкг/г	7,917±0,6	9,760±0,7 <sup>1</sup>	<b>9,550±0,7</b> <sup>1</sup>	10,11±0,9	8,317±0,7	9,160±0,8
uPA-АГ    нг/г	12,24±0,9	13,0±0,9	14,26±1,1 <sup>1(p=0,05)</sup>	13,20±0,9	<b>73,34±5,2</b> <sup>1,3</sup>	56,40±3,9 <sup>2,4,5</sup>
uPA-акт    ед/г	0,202±0,02	0,160±0,01 <sup>1</sup>	<b>0,268±0,02</b> <sup>1</sup>	0,140±0,0 <sup>1,3</sup>	<b>3,350±0,2</b> <sup>1,3</sup>	0,321±0,02 <sup>2,4,5</sup>
РАI-1-АГ    нг/г	108,2±8,1	76,80±5,1 <sup>1</sup>	111,1±8,6	<b>258,6±16,8</b> <sup>2</sup>	<b>1033±71,8</b> <sup>1,3</sup>	<b>592,7±43,1</b> <sup>2,4,5</sup>
РАI-1-акт    ед/г	7,188±0,5	7,10±0,5	<b>9,588±0,7</b> <sup>1</sup>	<b>9,40±0,7</b> <sup>2</sup>	<b>34,24±2,6</b> <sup>1,3</sup>	10,2±0,7 <sup>2,5</sup>
<b>Расчётные коэффициенты соотношений взаимосвязанных показателей</b>						
ПГ/П	1,8±0,1	2,3±0,2 <sup>1</sup>	0,5±0,04	0,3±0,02 <sup>2,3</sup>	<b>0,7±0,05</b> <sup>1,3</sup>	0,3±0,02 <sup>2,4,5</sup>
П/РАР	3,6±0,2	2,1±0,2 <sup>1</sup>	<b>8,4±0,6</b>	<b>7,2±0,5</b> <sup>2,3</sup>	<b>11,6±0,9</b> <sup>1,3</sup>	6,2±0,5 <sup>2,5</sup>
uPA-АГ/uPA-акт	60,6±4,4	81,3±5,5 <sup>1</sup>	53,2±4,1	<b>94,3±6,5</b> <sup>2,3</sup>	<b>21,9±1,7</b> <sup>1,3</sup>	<b>175,7±11,9</b> <sup>2,4,5</sup>
РАI-1-акт/uPA-акт	35,6±2,6	44,1±3,2 <sup>1</sup>	35,8±2,7	<b>67,10±4,8</b> <sup>2,3</sup>	<b>308,4±22,7</b> <sup>1,3</sup>	31,9±2,1 <sup>2,4,5</sup>
РАI-1-АГ/РАI-1-акт	15,1±1,2	10,8±0,8 <sup>1</sup>	11,6±0,8	<b>27,5±1,9</b> <sup>2,3</sup>	<b>30,2±2,3</b> <sup>1,3</sup>	<b>58,1±4,1</b> <sup>2,4,5</sup>

Примечание: индекс достоверности соответствует номеру столбца, с которым сравнивали числовые значения (p<0,05).

При относительном сходстве содержания плазминогена и активности свободного плазмина в условно здоровой ткани по линии резекции мужчин и женщин соотношение ПГ/П достоверно выше у женщин – в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ). В остальных тканях, сравнительно с областью линии резекции, соотношение ПГ/П было резко снижено и у мужчин, и у женщин (табл.). Содержание PАР, относительно области линии резекции, было относительно постоянным во всех тканях. Соотношение свободного и связанного плазмина (П/РАР) в тканях может оказаться решающим фактором в сохранении или нарушении стабильности межклеточного матрикса, особенно при онкологической патологии. В ткани по линии резекции у мужчин соотношение П/РАР в 1,4 раза выше, чем у женщин (табл.). Коэффициент П/РАР был повышен во всех тканях относительно области линии резекции, но в опухоли и её перифокальной зоне у мужчин в 1,4 и 1,2 раза ( $p < 0,05$ ), соответственно, выше, чем в аналогичных тканях женщин.

При изучении содержания урокиназного активатора плазминогена мы определяли две его формы: антигенную, т.е. проурокиназу (uРА-АГ) и активную, т.е. урокиназу (uРА-акт). В условно здоровой ткани при практически одинаковом содержании uРА-АГ наблюдали достоверные различия в количестве uРА-акт – у мужчин в 1,3 раза выше, чем у женщин (табл.). В перифокальной ткани опухоли различия усилились: при сравнимом содержании uРА-АГ, у мужчин в 1,9 раза больше uРА-акт. В ткани опухоли регистрировались не только увеличившаяся разница между содержанием uРА-акт – в 10,4 раза, но повышение количества uРА-АГ у всех больных и у мужчин в 1,3 раза выше, чем у женщин.

Одновременно было установлено, что активная форма специфического ингибитора урокиназы РАI-1-акт в условно здоровой ткани области линии резекции у мужчин и женщин содержится в одинаковом количестве (табл.). Количество его предшественника (антигенной формы) РАI-1-АГ у мужчин в 1,4 раза больше, чем у женщин. В перифокальной зоне РАI-1-акт увеличивается в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза и у мужчин, и у женщин. РАI-1-АГ у мужчин соответствует области линии резекции, у женщин – выше, чем в ткани по линии резекции в 3,4 раза. В опухоли у мужчин содержание РАI-1-акт в 3,4 раза выше, чем у женщин, и в 4,8 раза выше, чем в ткани по линии резекции. В опухолевой ткани регистрировали и наибольшее содержание РАI-1-АГ у мужчин: не только в 9,6 раза выше, чем по линии резекции, но и в 1,7 раза выше, чем у женщин (табл.).

Повышение уровня П, uРА и РАI-1 регистрировалось раке при раке других локализаций [7; 8; 11].

Наши результаты свидетельствуют о более высокой активности П в опухолевых тканях мужчин сравнительно с тканями женщин, следовательно, стабильность межклеточного матрикса нарушается у мужчин в большей мере, чем у женщин. При

неизбежной активации системы фибринолиза в злокачественно трансформированной ткани, заметно, что ПГ в перифокальной ткани мужчин пополняется, а у женщин наблюдается его истощение, сохраняющееся в опухоли. Подтверждением тому служат и повышенное содержание ПГ в ткани опухоли у мужчин, и различия в соотношении ПГ/П (табл.). Это позволяет предполагать продукцию его опухолью, тем более что в перифокальной зоне опухоли у мужчин содержится наименьшее количество ПГ, сравнительно с остальными тканями мужчин. Примерно одинаковое связывание П в комплекс РАР в исследованных тканях (табл.) может быть косвенным свидетельством подавления активности и/или синтеза эндогенного  $\alpha_2$ -антиплазмина в опухоли и её перифокальной зоне.

Почти такая же картина наблюдалась и в отношении uPA (табл.). В условно здоровой ткани пищевода мужчин и женщин было примерно одинаковое содержание uPA-АГ, причём его количество не изменилось и в ткани, окружающей опухоль (табл.). В ткани опухоли мужчин содержалось наивысшее количество uPA, и это, наряду с высоким содержанием ПГ, создавало условия для усиленной его активации и образования П. Распределение PAI-1 по изученным тканям (табл.) потенциально должно было бы сдерживать активность uPA в опухоли и её перифокальной зоне, однако, по всей видимости, этого не происходит, поскольку П в этих областях образуется достаточно активно, что способствует разрушению окружающей опухоль базальной мембраны и внеклеточного матрикса, освобождая место для её роста. Проникая в перифокальную зону опухоли и у мужчин, и у женщин П может способствовать расширению «опухолевого поля». Можно полагать, что в ткани опухоли плоскоклеточного рака пищевода происходит выделение опухоль-ассоциированных ПГ, uPA и PAI-1 клетками опухоли, причём в большей степени у мужчин. Известно, что PAI-1 обладает протуморогенной активностью за счёт реализации антиапоптотических функций [5].

Система фибринолиза участвует в физиологическом и патологическом ангиогенезе. Деградация межклеточного матрикса является ключевым моментом в росте, инвазии и метастазировании опухолей, в ней принимают участие несколько классов протеаз: сериновые протеиназы, включая плазмин, матричные металлопротеиназы, многие из которых активируются плазмином, и др. Учитывая гендерные различия в заболеваемости плоскоклеточным раком пищевода и литературные данные, правомерно предположение о различном влиянии мужских и женских половых гормонов на механизмы активации uPA, ПГ, PAI-1 при развитии этой патологии. Андрогенные рецепторы широко экспрессируются в тканях человека и были определены в тканях рака различной локализации, в том числе пищевода. В обзоре О.А. Sukocheva et al. [10] приведены конкретные результаты исследований, касающиеся влияния андрогенов и эстрогенов на развитие плоскоклеточного

рака пищевода у мужчин и женщин. Авторы пришли к выводу, что экспрессия андрогенов и их рецепторов стимулирует биологическую активность злокачественной опухоли, и в частности плоскоклеточного рака пищевода, а также влияет на прогноз заболевания. Присутствие андрогенных рецепторов в ткани рака пищевода, а также прямая связь между увеличением тестостерона и развитием «пищевода Барретта» позволили М.В. Cook et al. [3] предположить, что андрогены играют значимую роль в развитии плоскоклеточного рака пищевода. В обзоре М. Schuliga et al. [9] освещена связь экспрессии системы регуляции плазминогена, в частности uPA и PAI-1, с инвазией рака, в том числе пищевода.

Таким образом, развитие плоскоклеточного рака пищевода у мужчин и женщин связано, вероятно, с гендерными различиями в изменениях каскада регуляции ПГ, образовании и сохранении свободного П с преобладанием влияния мужских половых гормонов. Найденные нами гендерные различия важнейших белков системы фибринолиза в тканях плоскоклеточного рака пищевода могут способствовать конкретизации имеющихся сведений, однако важно выяснить влияние андрогенов на развитие и прогрессирование этой опухоли. Необходимы дальнейшие исследования для уточнения роли андрогенов и их рецепторов в формировании внутриклеточной сигнализации и каскада регуляции плазминогена в плоскоклеточном раке пищевода. Возможно, это поможет объяснить преобладание мужчин в статистике заболеваемости.

### **Выводы**

1. Установлены достоверные гендерные различия содержания uPA, плазминогена, плазмина и PAI-1 в тканях плоскоклеточного рака пищевода и перитуморальной зоне.
2. В ткани опухоли плоскоклеточного рака пищевода и её перифокальной зоне возможно наличие опухоль-ассоциированных uPA, ПГ и PAI-1 у мужчин, PAI-1 – у женщин.

### **Список литературы**

1. Кит О.И., Франциянц Е.М., Козлова Л.С., Терпугов А.Л. Статус трипсиновых протеиназ и кининовой системы в ткани злокачественных опухолей и полипов толстой кишки // Российский онкологический журнал. – 2013. – № 4. – С. 6-9.
2. Aisina R.B., Mukhametova L.I. Structure and functions of plasminogen/plasmin system // Bioorg. Khim. 2014; 40(6): 642-657. Review. Russian. PMID: 25895360. [PubMed - indexed for MEDLINE].
3. Cook M.B., Wood S.N., Cash B.D. et al. Association between circulating levels of sex steroid hormones and Barrett's esophagus in men: a case-control analysis // Clin. Gastroenterol. Hepatol. - 2015; 13: 673-682.

4. Duffy M.J., McGowan P.M., Harbeck N., Thomssen C., Schmitt M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies // *Breast Cancer Res.* - 2014; 16(4): 428. DOI: 10.1186/s13058-014-0428-4. DOI: 10.1186/s13058-014-0428-4.
5. Fang H., Placencio V.R., DeClerck Y.A. Protumorigenic activity of plasminogen activator inhibitor-1 through an antiapoptotic function // *J Natl Cancer Inst.* - 2012; 104(19): 1470-84. DOI: 10.1093/jnci/djs377.
6. Fuessel S., Erdmann K., Taubert H., Lohse-Fischer A., Zastrow S., Meinhardt M. et al. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator system components in clear cell renal cell carcinoma patients without distant metastasis // *BMC Cancer.* - 2014; 14: 974. DOI: 10.1186/1471-2407-14-974.
7. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Nikipelova E.A., Komarova E.F., Kozlova L.S., Tavaryan I.S. et al. Changes in markers of proliferation, neoangiogenesis and plasminogen activation system in rectal cancer tissue // *Eksp. Klin. Gastroenterol.* - 2015; (2): 40-45. Russian. PMID: 25993872 [PubMed - indexed for MEDLINE]
8. McMahon B.J., Kwaan H.C. Components of the Plasminogen-Plasmin System as Biologic Markers for Cancer // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2015; (867): 145-56. DOI: 10.1007/978-94-017-7215-0\_10.
9. Schuliga M. The inflammatory actions of coagulant and fibrinolytic proteases in disease // *Mediators Inflamm.* - 2015; 2015: 4376-4395. DOI: 10.1155/2015/437695.
10. Sukocheva O.A., Li B., Due S.L., Hussey D.J., Watson D.I. Androgens and esophageal cancer: What do we know? // *World. J. Gastroenterol.* - 2015; 21(20): 6146-6156. DOI: 10.3748/wjg.v21.i20.6146.
11. Witzel I., Milde-Langosch K., Schmidt M., Karn T., Becker S., Wirtz R. et al. Role of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor mRNA expression as prognostic factors in molecular subtypes of breast cancer // *Onco. Targets Ther.* - 2014; (7): 2205-13. DOI: 10.2147/OTT.S65344.