

УДК 616.31-002.153-006-091:575.133

*Н.Е. Кушлинский, Е.С. Герштейн, А.Ф. Батцев, Е.К. Дворова, Е.Г. Матякин***АКТИВАТОРЫ ПЛАЗМИНОГЕНА УРОКИНАЗНОГО И ТКАНЕВОГО ТИПОВ И ИХ ИНГИБИТОР PAI-1****В ОПУХОЛЯХ БОЛЬНЫХ РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА: ВЗАИМОСВЯЗЬ С ОСНОВНЫМИ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ**  
РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Москва**Контактная информация:**

Кушлинский Николай Евгеньевич, заведующий лабораторией клинической биохимии РОНЦ

**адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе 24; **тел.** +7(495)324-11-79**e-mail:** [biochimia@mtu-net.ru](mailto:biochimia@mtu-net.ru)

Статья поступила: 26.11.2009, принята к печати: 04.12.2009.

**Резюме**

Иммуноферментными методами показано, что при раке слизистой оболочки полости рта происходит усиление активации плазминогена по урокиназному типу (уровня uPA) с параллельным увеличением уровня ингибитора PAI-1 в опухолях по сравнению с окружающей слизистой.

Статистически значимых ассоциаций уровня исследованных белков в опухолях с такими прогностическими факторами как локализация, форма роста, гистологическое строение и степень дифференцировки первичной опухоли, ее размер и распространенность, степень поражения регионарных лимфатических узлов, стадия заболевания не выявлено.

**Ключевые слова:** активатор плазминогена урокиназного типа, активатор плазминогена тканевого типа, ингибитор активаторов плазминогена 1 типа, рак слизистой оболочки полости рта.

*N.E. Kushlinsky, E.S. Gershtein, A.F. Batsev, E.K. Dvorova, E.G. Matyakin***UROKINASE AND TISSUE TYPE PLASMINOGEN ACTIVATORS AND THEIR INHIBITOR PAI-1****IN THE TUMORS OF PATIENTS WITH ORAL CAVITY CARCINOMAS: ASSOCIATION WITH MAJOR CLINICO-MORPHOLOGIC FACTORS**

Russian N.N. Blokhin Cancer Research Center RAMS, Moscow

**Abstract**

Immunoenzymatic investigation demonstrated elevation of urokinase type plasminogen activation (uPA level) accompanied by an increase of PAI-1 level in oral cavity carcinomas as compared to adjacent mucosa.

No statistically significant associations were revealed between the levels of the proteins studied and such prognostic factors as localization, growth form, histological structure and differentiation grade of primary tumor, its size and spread, lymph node involvement, disease stage.

**Key words:** urokinase type plasminogen activator, tissue type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor I, oral cavity carcinoma.

**Введение**

Плоскоклеточный рак органов полости рта и ротоглотки – одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований головы и шеи и по частоте занимает второе место после рака гортани.

Несмотря на легкую доступность полости рта для визуального осмотра, более 2/3 больных обращаются за специализированной помощью с III или IV стадиями опухолевого процесса, поэтому лечение данной категории пациентов крайне сложно, а часто даже малоэффективно.

Многие исследователи связывают дальнейший прогресс не только с рациональным использованием комбинированных и комплексных методов лечения, но и с разработкой принципиально новых патогенетических методов терапии, основанных на современных достижениях в изучении биохимии и молекулярной биологии опухолей.

К числу фундаментальных свойств злокачественных опухолей, безусловно, относится способность к инвазии в окружающие ткани и метастазированию в отдаленные органы, а одним из основных механизмов этих процессов является разрушение базальной мем-

браны и внеклеточного матрикса ассоциированными с опухолью протеазами, участвующими также в неоангиогенезе, способствуя распространению новых сосудов. В инвазии и метастазировании задействовано несколько классов протеаз, в первую очередь это протеолитический каскад активации плазминогена с образованием плазмина и активируемые им матриксные металлопротеиназы, разрушающие коллаген и другие компоненты опухолевой стромы.

В систему активации плазминогена входят два типа активаторов – урокиназного (uPA) и тканевого (tPA) типов, активность которых подавляется двумя белковыми ингибиторами – PAI-1 и PAI-2 [5]. uPA секретируется в виде ферментативно неактивного одноцепочечного предшественника, который после связывания со специфическими рецепторами (uPAR) на поверхности клетки превращается под действием плазмина и некоторых других протеолитических ферментов в активную двухцепочечную молекулу. Активный uPA, в свою очередь, катализирует превращение плазминогена в плазмин.

Таким образом, весь процесс образования плазмина представляет собой циклическую амплификацию, регулируемую по механизму обратной связи.

Уровень и соотношение экспрессии различных компонентов системы активации плазминогена в опухолевой ткани может служить показателем метастатической и инвазивной активности опухоли, являясь вследствие этого биологически значимым фактором прогноза при различных новообразованиях [2; 6]. В настоящее время определение uPA и PAI-1 используется в некоторых странах в качестве обязательного теста для выявления прогностически неблагоприятных подгрупп среди больных ранними стадиями рака молочной железы [7].

Кроме того, подавление активации плазминогена по урокиназному типу является одним из перспективных подходов к разработке новых схем антиметастатической терапии различных опухолей, в том числе – рака слизистой оболочки полости рта [10; 14-15].

В целом, роль системы активации плазминогена при опухолях слизистой оболочки полости рта изучена недостаточно, хотя в отдельных клинико-лабораторных исследованиях уже продемонстрирована неблагоприятная роль uPA и PAI-1, а также uPAR в прогнозировании результатов лечения различных форм этого заболевания [3; 8-9; 11-13].

В связи с этим, целью данного исследования явилось сравнительное изучение содержания uPA, tPA и PAI-1 в ткани рака и неизменной слизистой полости рта, а также оценка взаимосвязи содержания этих белков в опухолях с клинико-морфологическими особенностями заболевания.

### Материалы и методы

В исследование были включены больные раком слизистой оболочки полости рта, лечившиеся в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 2007-2009 гг.

Всего обследовано 40 человек (30 мужчин и 10 женщин) в возрасте от 32 до 84 лет (медиана – 54 года). У 12 больных диагностирован рак подвижной части, у 5 – корня языка; рак дна полости рта выявлен у 7 пациентов, рак альвеолярного отростка и ретромолярной области – у 6 и 5 больных, соответственно; другие локализации представлены единичными наблюдениями.

У 32 (82%) пациентов были распространенные (III и IV) стадии заболевания. По гистологическому строению большинство опухолей (32) представляли собой плоскоклеточный неороговевающий рак.

У всех больных параллельно исследованы опухоли и гистологически неизменные участки слизистой полости рта. Материал для исследования брали во время операции. Кусочки тканей (100-200 мг) из операционной доставляли на лед в лабораторию и хранили при –70 °С до начала исследования.

Концентрации uPA, PAI-1 и tPA в цитозолях, полученных как описано ранее [1], определяли прямыми иммуноферментными методами с использованием стандартных наборов фирмы Technoclone GmbH (Австрия) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрации анализируемых белков выражали в нг/мг цитозольного белка, который определяли методом Лоури.

При сравнении показателей использовали непараметрические критерии Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса и Вилкоксона, взаимосвязь показателей оценивали с помощью теста корреляции рангов Спирмена (R). Различия и корреляции считали достоверными при  $p < 0,05$ .

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программы Statistica для Windows (версия 7.0).

### Результаты и их обсуждение

В 90% опухолей обнаружены измеримые количества uPA и PAI-1, при этом uPA выявлен только в 3 образцах гистологически неизменной слизистой полости рта (7%), а PAI-1 – в 20 (50%). Концентрации uPA и PAI-1 в опухолевой ткани были достоверно выше, чем в слизистой у 93 и 85% больных соответственно ( $p < 0,0001$ ). Концентрации этих белков в цитозолях опухолей колебались в достаточно широких пределах (табл. 1).

Измеримые, но достаточно низкие уровни tPA обнаружены во всех исследованных образцах опухолевой и неизменной ткани (*ibid.*), при этом у 70% больных содержание этой протеазы в неизменной слизистой было выше, чем в опухоли, а медианные показатели достоверно не отличались.

Отмечена положительная корреляционная взаимосвязь между концентрациями tPA в опухолевой ткани и неизменной слизистой ( $R = 0,40$ ,  $p < 0,01$ ). Концентрация PAI-1 в опухолевой ткани не коррелировала с показателями нормальной слизистой полости рта, а uPA в неизменной слизистой практически отсутствовал. В то же время выявлена высокодостоверная положительная взаимосвязь между уровнями uPA и PAI-1 в опухолевой ткани ( $R = 0,84$ ;  $p < 0,001$ ). Эти закономерности свидетельствуют о том, что усиление экспрессии uPA и PAI-1 в опухолевой ткани не зависит от их исходного уровня в слизистой полости рта, в то время как экспрессия tPA в опухоли напрямую связана с базальным содержанием этого фермента в слизистой данного больного.

Таким образом, в ткани рака слизистой оболочки полости рта наблюдается существенное и коррелированное увеличение концентрации uPA и PAI-1 по сравнению с окружающей слизистой. Уровень tPA в злокачественных опухолях, как правило, заметно снижен по сравнению с нормой. Полученные результаты согласуются с данными литературы по опухолям полости рта [4; 8], также полученными иммуноферментными методами, а также с нашими данными для опухолей различного гистогенеза [2].

Для того чтобы оценить клиническое значение определения исследуемых маркеров в опухолях больных раком слизистой оболочки полости рта, мы проанализировали взаимосвязь этих показателей с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания (табл. 2). Четких статистически значимых ассоциаций уровня исследованных белков в опухолях с такими прогностическими факторами, как локализация, тип роста, гистологическое строение и степень дифференцировки первичной опухоли, ее размер и распространенность (T), степень поражения регионарных лимфатических узлов (N) не выявлено. Можно отметить лишь ряд тенденций, которые могут приобрести не только статистическую, но и биологическую значимость при увеличении обследуемых групп больных. Так, уровни uPA и PAI-1 оказались наиболее высокими при II стадии процесса, причем для uPA отличие от такового III стадии было статистически значимым ( $p < 0,05$ ). Эти данные согласуются с результатами, полученными нами при некоторых других новообразованиях (рак молочной железы, рак легкого, рак яичников) и свидетельствовавшими о том, что наибольшей инвазивностью и метастатическим потенциалом, если судить по уровню изученных компонентов системы активации плазминогена, опухоли обладают на ранних этапах инвазии и метастазирования [1].

Таблица 1

Содержание (нг/мг белка) компонентов системы активации плазминогена в цитозолях опухолей и окружающих гистологически неизмененных тканей больных раком слизистой оболочки полости рта.

| Показатель | Опухоль (Т) |                     | Слизистая (N) |                     | T>N % |
|------------|-------------|---------------------|---------------|---------------------|-------|
|            | Диапазон    | Медиана, 25-75%     | Диапазон      | Медиана, 25-75%     |       |
| uPA        | 0 – 14,6    | 1,6*<br>0,88 – 2,6  | 0 – 1,4       | 0<br>0 – 0          | 93    |
| PAI-1      | 0 – 113,8   | 18,6*<br>4,2 – 50,8 | 0 – 34,7      | 0,05<br>0 – 1,2     | 85    |
| tPA        | 0,14 – 5,0  | 0,30<br>0,23 – 0,41 | 0,13 – 1, 8   | 0,35<br>0,28 – 0,45 | 30    |

\* p<0,0001 по сравнению с неизменной слизистой (парный критерий Вилкоксона)

Таблица 2

Содержание компонентов системы активации плазминогена в цитозолях опухолей и окружающих гистологически неизмененных тканей больных раком слизистой оболочки полости рта в зависимости от основных клинимоρφологических характеристик.

| Критерий                         | Градация        | n* | Концентрация (нг/мг белка) медиана, разброс |                   |                   |
|----------------------------------|-----------------|----|---------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                  |                 |    | uPA                                         | PAI-1             | tPA               |
| Стадия                           | I               | 2  | 1,4<br>0-2,9                                | 30,0<br>0-59,9    | 0,18<br>0,14-0,22 |
|                                  | II              | 5  | 3,2**<br>0,8-14,6                           | 36,0<br>0-63,4    | 0,34<br>0,23-0,43 |
|                                  | III             | 10 | 1,0**<br>0-7,2                              | 7,6<br>0-79,1     | 0,26<br>0,19-1,25 |
|                                  | IV              | 22 | 1,7<br>0-11,5                               | 18,0<br>0-113,8   | 0,32<br>0,14-0,91 |
| T                                | T <sub>1</sub>  | 2  | 1,4<br>0-2,9                                | 30,0<br>0-59,9    | 0,18<br>0,14-0,22 |
|                                  | T <sub>2</sub>  | 9  | 2,6<br>0-14,6                               | 10,6<br>0-63,4    | 0,33<br>0,23-0,43 |
|                                  | T <sub>3</sub>  | 13 | 1,6<br>0-7,2                                | 23,4<br>0-98,3    | 0,26<br>0,14-1,25 |
|                                  | T <sub>4</sub>  | 15 | 1,7<br>0,3-11,5                             | 18,6<br>0-113,8   | 0,31<br>0,16-0,91 |
| N                                | N <sub>0</sub>  | 17 | 1,6<br>0-14,6                               | 23,5<br>0-79,1    | 0,30<br>0,14-1,25 |
|                                  | N <sub>1</sub>  | 9  | 1,5<br>0-2,6                                | 10,6<br>0-108,4   | 0,26<br>0,16-0,64 |
|                                  | N <sub>2</sub>  | 14 | 1,8<br>0-11,5                               | 24,8<br>0-113,8   | 0,32<br>0,14-0,91 |
| Форма роста                      | Экзофитная      | 4  | 4,2<br>0,3-8,4                              | 35,0<br>27,4-79,1 | 0,21<br>0,16-0,43 |
|                                  | Эндофитная      | 7  | 1,8<br>0-3,6                                | 14,0<br>0-98,3    | 0,25<br>0,14-0,62 |
|                                  | Смешанная       | 28 | 1,5<br>0-14,6                               | 14,0<br>0-113,8   | 0,32<br>0,14-1,25 |
| Морфология (плоскоклеточный рак) | Ороговевающий   | 32 | 1,5<br>0-14,6                               | 18,50<br>0-108,4  | 0,28<br>0,14-1,25 |
|                                  | Неороговевающий | 7  | 1,8<br>0-11,5                               | 23,4<br>0-113,8   | 0,33<br>0,22-0,91 |
| Дифференцировка                  | Высокая         | 30 | 1,6<br>0-11,5                               | 18,0<br>0-113,8   | 0,30<br>0,14-1,25 |
|                                  | Умеренная       | 9  | 1,6<br>0,3-14,6                             | 23,4<br>0,3-63,4  | 0,29<br>0,2-0,46  |
| Продолженный рост опухоли        | да              | 13 | 1,4<br>0-11,5                               | 18,6<br>0-113,8   | 0,31<br>0,14-1,25 |
|                                  | нет             | 14 | 1,7<br>0-14,6                               | 9,0<br>0-79,1     | 0,25<br>0,16-0,84 |

\* число больных

\*\* p(II-III)<0,05 (тест Манна-Уитни)

Кроме того, медианные уровни uPA и PAI-1 при экзофитной форме роста рака слизистой оболочки полости рта оказались более чем вдвое выше, чем при эндофитной и смешанной, а уровень PAI-1 был также двукратно увеличен при наличии продолженного роста опухоли (во всех случаях  $p > 0,05$ ).

Таким образом, на примере рака слизистой оболочки полости рта нам удалось подтвердить выявленную ранее [1–2] закономерность, заключающуюся в том, что в большинстве злокачественных опухолей различного гистогенеза происходит значительное и координированное увеличение экспрессии uPA и PAI-1 по сравнению с таковыми в гомологичных нормальных тканях.

Это наблюдение может иметь как теоретическое, так и практическое значение.

С одной стороны, оно свидетельствует о том, что усиление активации плазминогена по уроки-

назному типу, сопровождающееся усилением защиты опухолевых клеток от саморазрушения (за счет увеличения уровня PAI-1), является достаточно универсальным признаком малигнизации.

С другой стороны, повышенная экспрессия uPA в опухоли по сравнению с окружающей тканью делает этот фермент перспективной избирательной мишенью для антиметастатической терапии при раке слизистой полости рта, характеризующемся достаточно низкой чувствительностью к стандартным видам химиотерапии.

Отсутствие четкой взаимосвязи тканевых концентраций uPA и PAI-1 с основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания не исключает их потенциальной роли маркеров в качестве независимого фактора прогноза безрецидивной и общей выживаемости. Это может быть доказано при более длительном наблюдении за больными и увеличении обследованной группы.

### Литература

1. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Активаторы плазминогена урокиназного и тканевого типов и их ингибитор PAI-1 в опухолях человека. // 2001.-Vol. 131 (1). – P. 81–7.
2. Герштейн Е.С., Талаева Ш.Ж., Сандыбаев М.Н., Кушлинский Н.Е. Клиническая роль системы активации плазминогена в опухолях человека. // Молекулярная медицина. – 2007. – Vol. (1). – P. 4-8.
3. Bacchiocchi R., Rubini C., Pierpaoli E. et al. Prognostic value analysis of urokinase-type plasminogen activator receptor in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study // BMC Cancer. – 2008. – Vol. 8. – P. 220.
4. Baker E.A., Leaper D.J., Hayter J.P., Dickenson A.J. Plasminogen activator system in oral squamous cell carcinoma // Br. J. Oral Maxillofac Surg. – 2007. – Vol. 45 (8). – P. 623-7.
5. Duffy M.J. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy // Curr. Pharm. Des. – 2004. – Vol. 10 (1). – P. 39-49.
6. Duffy M.J., Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer // Clin. Biochem. – 2004. – Vol. 37 (7). – P. 541-8.
7. Harbeck N. Use of uPA and PAI-1 to personalise therapy in patients with breast cancer // International Society of Oncology and Biomarkers, 37th Meeting Biomarkers and New Treatment Strategies in Oncology ISOBM 2009 – Amsterdam, The Netherlands, September 27-30, 2009 – P. 114.
8. Hundsdofer B., Zeilhofer H.F., Bock K.P. et al. Tumour-associated urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in normal and neoplastic tissues of patients with squamous cell cancer of the oral cavity - clinical relevance and prognostic value // J. Craniomaxillofac. Surg. – 2005. – Vol. 33 (3). – P. 191–6.
9. Nozaki S., Endo Y., Kawashiri S. et al. Immunohistochemical localization of a urokinase-type plasminogen activator system in squamous cell carcinoma of the oral cavity: association with mode of invasion and lymph node metastasis // Oral Oncol. – 1998. – Vol. 34 (1). – P. 58-62.
10. Nozaki S., Endo Y., Nakahara H. et al. Inhibition of invasion and metastasis in oral cancer by targeting urokinase-type plasminogen activator receptor // Oral Oncol. – 2005. – Vol. 41 (10). – P. 971-7.
11. Shi Z., Stack M.S. Urinary-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) in squamous cell carcinoma of the oral cavity // Biochem J. – 2007. – Vol. 407 (2). – P. 153–9.
12. Speleman L., Kerrebijn J.D., Look M.P. et al. Prognostic value of plasminogen activator inhibitor-1 in head and neck squamous cell carcinoma // Head Neck. – 2007. – Vol. 29 (4). – P. 341–50.
13. Strojan P., Budihna M., Smid L. et al. Urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1 and cathepsin D: analysis of their prognostic significance in squamous cell carcinoma of the head and neck // Anticancer Res. – 2000. – Vol. 20 (5C). – P. 3975-81.
14. Yang S.F., Yang W.E., Kuo W.H. et al. Antimetastatic potentials of flavones on oral cancer cell via an inhibition of matrix-degrading proteases // Arch. Oral Biol. – 2008. – Vol. 53 (3). – P. 287–94.
15. Zhou H., Tang Y., Liang X. et al. RNAi targeting urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits metastasis and progression of oral squamous cell carcinoma in vivo // Int. J. Cancer. – 2009. – Vol. 125 (2). – P. 453–62.