

АКТИВАТОРЫ ПЛАЗМИНОГЕНА УРОКИНАЗНОГО И ТКАНЕВОГО ТИПОВ И ИХ ИНГИБИТОР ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Н.Е.Кушлинский¹, И.А.Казанцева², М.Н.Сандыбаев³,
Т.Ю.Харитиди¹, О.С.Попов⁴, А.Е.Тулеев³, А.П.Калинин²**

*Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва¹
Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. В.Ф.Владимирского²
Западно-Казахстанская государственная медицинская академия
им. М. Оспанова, г. Актюбинск, Республика Казахстан³
Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск⁴*

С помощью иммуноферментного анализа (ELISA) изучено содержание активаторов плазминогена урокиназного (uPA) и тканевого (tPA) типа и одного из их ингибиторов (PAI-1) в цитозольной фракции щитовидной железы 129 больных злокачественными и доброкачественными опухолями, а также различными неонкологическими заболеваниями этого органа. В опухолях больных раком щитовидной железы выявлены самые низкие уровни tPA и наиболее высокие показатели uPA и PAI-1, тогда как для доброкачественных заболеваний щитовидной железы, включая аденому, были характерны высокие показатели tPA и относительно низкие значения uPA и PAI-1 в ткани пораженного органа. При этом наиболее низкие показатели uPA и PAI-1 выявлены у больных диффузным токсическим зобом как с аденоматозом, так и без него. Группы больных узловым коллоидным зобом по уровню uPA и PAI-1 занимали промежуточное положение между диффузным токсическим зобом и аденомой, с одной стороны, и раком щитовидной железы, с другой. Предполагается связь продукции uPA и PAI-1 с механизмами blastomagenesis щитовидной железы.

UROKINASE-AND TISSUE-LIKES PLASMINOGEN ACTIVATORS AND THEIR INHIBITOR IN THYROID DISEASES

**N.E. Kushlinsky¹, I.A. Kazantseva², M.N. Sandybaev³, T.Yu. Kharitidi¹,
O.S. Popov⁴, A.E. Tyleuov³, A.P. Kalinin²**

*N.N. Blokhin Cancer Research Center, RAMS, Moscow¹
V.F. Vladimirsky Regional Research Clinical Institute, Moscow²
M. Ospanov Western-Kazakhstan State Medical Academy, Actyubinsk, Kazakhstan Republic³
Siberian State Medical University, Tomsk⁴*

The levels of urokinase-and tissue-likes plasminogen activators (uPA and tPA) and their inhibitor PAI-1 in cytozol fraction of thyroid gland of 129 patients with malignant and benign tumors as well as with various non-oncological thyroid diseases were studied with the help of immunoenzymatic analysis (ELISA). The lowest tPA levels and the highest uPA and PAI-1 levels were revealed in tumors of thyroid cancer patients, while high levels of tPA and relatively low levels of uPA and PAI-1 were observed in thyroid tissue of patients with benign thyroid tumors including adenoma. The lowest uPA and PAI-1 levels were found in patients having Basedow's disease both with adenomatosis and without it. For the groups of patients with adenomatous goiter, the uPA and PAI-1 levels showed intermediate state between Basedow's disease and adenoma, on the one hand, and thyroid cancer, on the other hand. Levels of uPA and PAI-1 are suspected to correlate with the mechanisms of thyroid blastogenesis.

Одним из основных механизмов инвазии и метастазирования злокачественных опухолей является разрушение окружающей базальной мембраны и внеклеточного матрикса протеазами, ассоциирован-

ными с опухолью [1, 3]. Центральную роль в этих процессах может играть сериновая протеаза - активатор плазминогена урокиназного типа (uPA), являющийся ключевым звеном протеолитического каскада, при-

водящего к образованию плазмина, разрушающего компоненты опухолевой стромы [2]. Система активации плазминогена имеет также непосредственное отношение к процессам неоангиогенеза в опухолях [10]. Известно, что активность uPA регулируется несколькими путями и, в частности, подавляется двумя белковыми ингибиторами, принадлежащими к семейству серпинов (PAI-1 и PAI-2), а также α_2 -антиплазмином и нексином [4]. PAI-1 и PAI-2 эффективно ингибируют связанный с рецептором uPA, а α_2 -антиплазмин защищает находящийся на поверхности клетки плазмин от ингибирования [2,5]. Связывание PAI-1 и PAI-2 с комплексом uPA-рецептор приводит к интернализации ковалентных комплексов протеазы с ингибиторами, происходящей при участии рецептора α_2 -макроглобулина, после чего эти комплексы расщепляются внутри клетки.

Помимо uPA, в активации плазминогена в опухолях участвует также активатор плазминогена тканевого типа (tPA) [2]. В норме оба эти фермента являются компонентами фибринолитической системы, при этом tPA секретируется преимущественно эндотелиальными клетками, а uPA - клетками паренхимы. Оба ингибитора uPA эффективно действуют и на tPA.

Концентрации uPA и PAI-1, как правило, существенно выше в злокачественных опухолях, чем в доброкачественных и в нормальных тканях [6, 7]. Для tPA часто отмечается противоположное соотношение. Показано также, что при некоторых злокачественных новообразованиях, в частности при раке молочной железы, высокие уровни uPA и PAI-1 и низкий уровень tPA являются факторами неблагоприятного прогноза заболевания [5, 6, 9]. Роль системы активации плазминогена при злокачественных и доброкачественных заболеваниях щитовидной железы практически не изучена.

Цель настоящего исследования - сравнительное изучение содержания некоторых основных компонентов системы активации плазминогена, а именно, uPA, tPA и PAI-1 в цитозольной фракции опухолей и у больных с разными неонкологическими заболеваниями этого органа.

Материал и методы

Обследовано 129 пациентов (117 женщин и 12 мужчин, в возрасте от 40 до 52 лет) с заболеванием щитовидной железы. У всех диагноз установлен впервые и подтвержден данными морфологического ис-

следования, что позволило выделить следующие 6 групп пациентов: 1) 19 больных (средний возраст $49,7 \pm 3,2$ года) – узловой коллоидный зоб с аденоматозом или аденомой (УЗК с аденоматозом); 2) 41 ($46,3 \pm 2,5$ года) – узловой коллоидный зоб без аденоматоза (УЗК без аденоматоза); 3) 8 ($46,9 \pm 4,4$ года) – диффузный токсический зоб в сочетании с аденоматозом (ДТЗ с аденоматозом); 4) 12 ($40,7 \pm 3,2$ года) – диффузный токсический зоб без аденоматоза (ДТЗ без аденоматоза); 5) 35 ($52,0 \pm 2,5$ года) – рак щитовидной железы (РЩЖ); 6) 14 ($52,0 \pm 3,4$ года) – аденома щитовидной железы (АЩЖ). Концентрацию uPA, PAI-1 и tPA определяли в цитозолях, полученных по стандартной методике, используемой при определении рецепторов стероидных гормонов и разведенных в 10 раз K,Na-фосфатным буфером (14 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4), содержащим 0,1 % Твин-20 и 1 % БСА. Определение проводили с помощью стандартных наборов реактивов для иммуноферментного анализа, разработанных в Католическом университете г. Наймеген (Нидерланды), как описано авторами [8]. Измерения проводили на автоматическом ридере для микроплашек ELx800 фирмы "Bio-Tek Instruments, Inc." (США) при 492/630 нм. Обработку результатов измерений проводили по формуле $Y = a + bX + cX^2$, где X - концентрация анализируемого белка (нг/мл), Y – оптическая плотность при 492 нм. Концентрации анализируемых белков выражали в нг/мг цитозольного белка.

Результаты и обсуждение

Среди всех обследованных групп больных наиболее низкие показатели tPA были отмечены в цитозольной фракции РЩЖ ($1,51 \pm 0,22$ нг/мг белка), при этом данный показатель был выявлен в 100 % опухолей. Однако следует отметить широкие пределы колебания уровней tPA в злокачественных опухолях щитовидной железы (0,19–5,32 нг/мг белка) (табл. 1).

Среди доброкачественных заболеваний щитовидной железы наиболее высокие значения tPA выявлены в цитозоле при УЗК в сочетании с аденоматозом и ДТЗ без аденоматоза ($3,54 \pm 0,82$ и $3,37 \pm 0,75$ нг/мг белка, соответственно) (табл. 1). Однако в цитозольной фракции образцов ткани при ДТЗ без аденоматоза tPA выявлен только в 92 %. Не отмечено также достоверных отличий в уровне tPA между группами больных АЩЖ, УЗК без аденоматоза и при ДТЗ с аденоматозом.

Таблица 1

Уровни активатора плазминогена тканевого типа (tPA)* в цитозоле при раке и доброкачественных заболеваниях щитовидной железы

Группы обследованных больных	Число наблюдений	tPA выявлен, %	Пределы колебания tPA	Среднее значение tPA	Медиана tPA
1.УКЗ с аденоматозом или аденомой	95	18	0,16–15,30	$3,54 \pm 0,82$	3,09
2.УКЗ без аденоматоза	98	40	0,15–11,12	$2,46 \pm 0,36$	1,97
3.ДТЗ с аденоматозом	100	8	1,46–4,03	$2,73 \pm 0,31$	2,64
4.ДТЗ без аденоматоза	92	11	0,52–9,30	$3,37 \pm 0,75$	2,65
5.РЩЖ	100	35	0,19–5,32	$1,51 \pm 0,22$	1,11
6.АЩЖ	100	14	1,10–4,77	$2,31 \pm 0,30$	1,83

Примечание: * – концентрация tPA выражена в нг/мг белка.

Максимальные значения PAI-1 выявлены в цитозольной фракции при РЩЖ ($0,91 \pm 0,16$ нг/мг белка), а близкими к этим значениям были показатели PAI-1 у больных УКЗ с аденоматозом и без такового ($0,72 \pm 0,18$ и $0,72 \pm 0,15$ нг/мг белка соответственно) и

АЩЖ ($0,68 \pm 0,15$ нг/мг белка). Среди обследованных цитозолей из тканей щитовидной железы PAI-1 выявлялся реже – в 88 % случаев и его самый низкий уровень обнаружен при ДТЗ с аденоматозом – $0,26 \pm 0,08$ нг/мг белка (табл. 2).

Таблица 2

Уровни ингибитора активаторов плазминогена первого типа (PAI-1)* в цитозоле при раке и доброкачественных заболеваниях щитовидной железы

Группы обследованных больных	Число наблюдений	PAI-1 выявлен, %	Пределы колебания PAI-1	Среднее значение PAI-1	Медиана PAI-1
1.УКЗ с аденоматозом или аденомой	7	89	0,13–2,66	$0,72 \pm 0,18$	0,43
2.УКЗ без аденоматоза	40	98	0,06–4,60	$0,72 \pm 0,15$	0,31
3.ДТЗ с аденоматозом	7	88	0,05–0,63	$0,26 \pm 0,08$	0,21
4.ДТЗ без аденоматоза	11	92	0,15–1,551	$0,51 \pm 0,13$	0,26
5.РЩЖ	35	100	0,16–4,99	$0,91 \pm 0,16$	0,61
6.АЩЖ	14	100	0,08–2,20	$0,68 \pm 0,15$	0,52

Следует отметить, что uPA был выявлен не во всех образцах исследованных тканей (от 86 до 95 %) и имел широкие пределы колебания от 0,15 до 15,3 нг/мл белка. Наиболее низкие средние показатели uPA отмечены в цитозольной фракции из тканей щитовидной железы при ДТЗ с аденоматозом ($0,13 \pm 0,02$ нг/мг белка). Значения uPA, выявленные в этой группе больных, приближались к его показателям при ДТЗ без аденоматоза ($0,17 \pm 0,03$ нг/мг белка) и АЩЖ ($0,18 \pm 0,02$ нг/мг белка) и выявлены соответственно в 92 % и 86 % наблюдений. Самый высокий средний уровень uPA обнаружен при РЩЖ ($0,69 \pm 0,15$ нг/мг белка). Не отмечено достоверных различий в показателях uPA при УКЗ с аденоматозом и без него, а также между группами больных ДТЗ без аденоматоза и АЩЖ (табл. 3).

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что в опухолях больных РЩЖ выявлены самые низкие уровни tPA и наиболее высокие показатели uPA и PAI-1. Тогда как при доброкачественных заболеваниях щитовидной железы и для АЩЖ были характерны высокие показатели tPA и относительно низкие значения uPA и PAI-1 в цитозольной фракции пораженного органа. При этом наиболее низкие уровни uPA и PAI-1 выявлены в цитозольной фракции тканей щитовидной железы у больных ДТЗ как с аденоматозом, так и без него. По показателям uPA и PAI-1 УКЗ в сочетании с аденоматозом и без него ближе стоит к группе больных РЩЖ, отличаясь от последней только высокими показателям tPA.

Таблица 3

Уровни активатора плазминогена урокиназного типа (uPA)* в цитозоле при раке и доброкачественных заболеваниях щитовидной железы

Группы обследованных больных	Число наблюдений	Выявленный uPA, %	Пределы колебания uPA	Среднее значение uPA	Медиана UPA
1. УКЗ с аденоматозом или аденомой	17	89	0,16–15,30	0,29 ± 0,08	0,17
2. УКЗ без аденоматоза	39	95	0,15–11,12	0,28 ± 0,05	0,18
3. ДТЗ с аденоматозом	7	88	1,46–4,03	0,13 ± 0,02	0,11
4. ДТЗ без аденоматоза	11	92	0,52–9,30	0,17 ± 0,03	0,13
5. РЩЖ	32	91	0,19–5,32	0,69 ± 0,15	0,32
6. АЩЖ	12	86	1,10–4,77	0,18 ± 0,02	0,19

Примечание: * – концентрация uPA выражена в нг/мг белка.

В последнее время активаторам и ингибиторам активаторов плазминогена уделяется все больше внимания не только как факторам прогноза общей и безрецидивной выживаемости при злокачественных опухолях, их чувствительности к химио-, гормонотерапии, но и как биологически активным соединениям, которые имеют важное значение в патогенетических механизмах blastomagenesis, а именно, инвазии и метастазировании опухолей [1, 2, 11]. В литературе представлены единичные работы о значимости исследуемых компонентов системы активации плазминогена при опухолях щитовидной железы. Полученные нами результаты по изучению некоторых основных компонентов системы активации плазминогена при РЩЖ подтверждаются в работах других авторов, которые указывают на высокий уровень продукции uPA и PAI-1 в цитозольной фракции злокачественных опухолей молочной железы, желудка и неблагоприятный их прогноз [6, 7, 9].

В злокачественных опухолях щитовидной железы также выявлено значительное снижение уровней tPA, по сравнению с АЩЖ, УКЗ и ДТЗ. Группы больных узловым коллоидным зобом по уровню uPA и PAI-1 занимали промежуточное положение между ДТЗ, АЩЖ и РЩЖ, что позволяет предположить большую вероятность малигнизации этих узловых новообразований. Это подтверждают наблюдения ряда авторов о том, что в при РЩЖ фоновым процессом в большинстве наблюдений были узловые образования в органе.

Таким образом, представленные в настоящем исследовании данные позволяют предполагать возмож-

ную связь основных компонентов системы активации плазминогена, а именно uPA, tPA и PAI-1, с процессами blastomagenesis при РЩЖ. Кроме того, эти результаты подтверждают потенциальную возможность использования изученных показателей для оценки риска малигнизации при гиперплазии и доброкачественных опухолях щитовидной железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Молекулярные маркеры прогноза и лекарственной чувствительности рака молочной железы // Новое в терапии рака молочной железы / Под ред. Н.И. Переводчиковой. М., 1998. С. 19–24.
2. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Активаторы плазминогена урокиназного и тканевого типов и их ингибитор PAI-1 в опухолях человека // Бюл. эксп. биол. 2001. Т. 131, № 1. С. 81–87.
3. Кушлинский Н.Е. Возможности, неудачи и перспективы исследования опухолевых маркеров в современной онкологической клинике. Часть 2 (лекция) // Клиническая лабораторная диагностика. 1999. № 3. С. 25–32.
4. Andreasen P.A., Georg B., Lund L.R. et al. Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins // Mol. Cell. Endocrinol. 1990. Vol. 68. P. 1–19.
5. Bouchet C., Spyros F., Martin P. M. et al. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2 in breast carcinomas // Br. J. Cancer. 1994. Vol. 69. P. 398–405.
6. Duffy M.J., Reilly D., O'Sullivan C. et al. Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer // Cancer Res. 1990. Vol. 50. P. 6827–6829.
7. Foekens J.A., Schmitt M., van Putten W.L.J. et al. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients // Cancer Res. 1992. Vol. 52. P. 6107–6105.
8. Grebenshikov N., Geurts-Moespot A., De Witte H. et al. A sensitive and robust assay for urokinase and tissue-type plas-

minogen activators (uPA and tPA) and their inhibitor type I (PAI-1) in breast tumor cytosols // *Int. J. Biol. Markers*. 1997. Vol. 12. P. 6–14.

9. *Janicke F., Schmitt M., Pache L. et al.* Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* 1993. Vol. 24. P. 195–208.

10. *Kaneko T., Konno H., Baba M. et al.* Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer // *Cancer Sci.* 2003. Vol. 94. P. 43–49.

11. *Mignatti P., Rifkin D.B.* Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion // *Physiol. Rev.* 1993. Vol. 73. P. 161–195.

Поступила 31.01.04