
А.В. ГИДРАНОВИЧ

АУТОКРИННЫЙ ФАКТОР ПОДВИЖНОСТИ КЛЕТОК В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

УО «Витебский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь

В данной статье проведен анализ активности аутокринного фактора подвижности (AMF) в сыворотке крови здоровых доноров и больных раком молочной железы на различных стадиях заболевания. Установлено статистически значимое увеличение активности AMF в сыворотке крови больных раком молочной железы по сравнению с донорами. У больных с метастатическим раком молочной железы активность AMF максимальна. Отмечен стабильный повышенный уровень активности AMF в 1-ой, 2-ой, 3-ей стадиях рака молочной железы, в 4-ой стадии рака молочной железы активность AMF значительно увеличена. Значительное увеличение активности AMF в сыворотке крови больных раком молочной железы может быть скрининговым маркером риска раннего гематогенного метастазирования.

Ключевые слова: рак молочной железы, аутокринный фактор подвижности, AMF.

The analysis of autocrine mobility factor (AMF) activity in the blood serum of healthy donors and breast cancer patients on different stages of the disease was performed. Statistically significant increase of AMF activity in serum of the breast cancer patients was determined. The activity of AMF in the metastasis breast cancer patients' serum was maximal. In the 1st, 2nd, 3rd stages of breast cancer the stable elevated level of AMF activity was observed. Stage 4 was characterized by highly elevated activity of AMF. The high increase of AMF in breast cancer patients' serum may be a screening marker of early hematogenic metastasis risk.

Keywords: breast cancer, autocrine factor of mobility, AMF

Аутокринный фактор подвижности раковых клеток (autocrine motility factor (AMF)) представляет собой белок, синтез которого экспрессирован в раковых клетках. При экспрессии он по аутокринному механизму стимулирует подвижность раковых клеток [1].

Аминокислотное секвенирование позволило установить, что аутокринным фактором подвижности раковых клеток является фермент гликолиза глюкозофосфатизомераза (ГФИ), (КФ 5.3.1.9), который катализирует обратимую реакцию превращения глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат, что является вторым этапом гликолитичес-

кого пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса. Реакция протекает по схеме:

глюкозофосфатизомераза

Глюкозо-6-фосфат $\rightleftharpoons$ Фруктозо-6-фосфат

Прямая реакция обеспечивает функционирование гликолиза и неокислительного пентозофосфатного пути, обратная реакция участвует в глюконеогенезе. Глюкозофосфатизомераза открыта в 1933 году, и представляет собой один из наиболее активных ферментов. Молекулярная масса глюкозофосфатизомеразы составляет

63016 Да (132000). Молекулярная активность этого фермента составляет 3330 оборотов в секунду. Динамическое равновесие реакции, катализируемой глюкозофосфатизомеразой, устанавливается при содержании в реакционной среде 68% глюкозо-6-фосфата и 32% фруктозо-6-фосфата в мышечной ткани, 60% глюкозо-6-фосфата и 40% фруктозо-6-фосфата в эритроцитах человека и 68-70% глюкозо-6-фосфата и 30-32% фруктозо-6-фосфата в сыворотке крови. Выделяют 3 изоформы глюкозофосфатизомеразы (А, В и С). По некоторым данным, фермент состоит из двух субъединиц с молекулярной массой около 70000 каждая. Ингибиторами глюкозофосфатизомеразы являются 6-фосфоглюконат и протеин, связывающий инсулиноподобный фактор роста [2]. Реакция, катализируемая глюкозофосфатизомеразой, протекает в 2 этапа. На первом этапе происходит разрушение полуацетальной кольцевой структуры гексозы с образованием глюкозо-6-фосфата с прямой цепью. На втором этапе происходит основная каталитическая функция образования ендиольного интермедиата в результате внутримолекулярного переноса водорода между первым и вторым атомами углерода. Поскольку глюкозофосфатизомераза катализирует раскрытие и закрытие кольца через ендиольный интермедиат, последний должен быть связан с ферментом с образованием фермент-субстратного комплекса.

Глюкозофосфатизомераза, попадая в экстрацеллюлярный матрикс и кровеносное русло, ведет себя как мощный цитокин, вызывающий увеличение подвижности раковых клеток. Кроме того, глюкозофосфатизомераза экстрацеллюлярно обеспечивает рост эмбриональных спинальных сенсорных нейронов [3], является фактором зрелости, участвующим в дифференцировке клеток лейкоза [4]. Пониженная экспрессия глюкозофосфатизомеразы определяет наследственную несфероцитарную гемоли-

тическую анемию [5]. Глюкозофосфатизомераза является маркером артрита, определяемым в сыворотке крови и моче [6].

AMF реализует свое действие, как цитокин, посредством специфического рецептора (autocrine motility factor receptor (AMFR)). Ген AMFR кодирует 323-аминокислотный полипептид, который имеет один трансмембранный домен и несколько гликозилированных участков. В норме AMFR расположен на мембране случайным образом, однако на клетках папилломы AMFR расположен полярно, а на мигрирующей раковой клетке отмечается скопление AMFR преимущественно на переднем и заднем участках по ходу миграции. Повышенная экспрессия AMFR ассоциируется с плохим прогнозом злокачественного заболевания [7].

В ответ на стимуляцию AMF отмечается усиление подвижности всех эпителиальных клеток, в том числе раковых [8]. AMF защищает раковые клетки от развития апоптоза и регулирует рост и развитие клеток путем активации Araf-1 и каспаз [9], а также путем активации системы циклин-зависимых киназ и супрессии p27 Kip-1 [10]. AMF также регулирует адгезию клеток к матриксу путем активации фокальной киназы адгезии [11]. Подвижность клеток, индуцированная AMF, сопровождается потерей E-кадгерина, возможно, через активацию транскрипции супрессора E-кадгерина, белка SNAIL [12]. Отмечено участие липооксигеназы-12 в каскаде ответа на активацию AMF. Активация липооксигеназы-12 приводит к образованию 12-(S)-гидроксиэйкозотетраеновой кислоты (12-(S)-HETE) [13]. 12-(S)-Гидроксиэйкозотетраеновая кислота является мощным эйкозаноидом, который регулирует подвижность раковых клеток [14].

В последнее десятилетие экспрессия AMF и AMFR изучалась при различных видах опухолей: меланоме [15], раке поджелу-

дочной железы, плоскоклеточном раке полости рта и раке печени [16]. Во всех этих исследованиях указывается, что экспрессия AMFR связана с активной инвазией и прогрессированием злокачественного процесса, отдаленным метастазированием.

В исследованиях ортотопических моделей показано, что при экспрессии AMF злокачественные клетки формировали опухоли большего размера и имели больший метастатический потенциал [17]. Таким образом, AMF имеет большое влияние на поведение раковых клеток, включая регуляцию клеточной подвижности, клеточную адгезию и клеточный рост. Действие AMF, опосредованное AMFR, включает большое количество внутриклеточных сигнальных путей.

Установлено, что AMF и AMFR имеют важное прогностическое значение при раке желудка [18], немелкоклеточном раке легкого [19], меланоме [20] и колоректальном раке. Высокий уровень экспрессии AMFR связан с активным лимфогенным метастазированием и плохим прогнозом [21]. Экспрессия AMF подвергается изменениям под действием различных терапевтических агентов, например герцептина [22].

Показана значительная корреляция между AMF и циклооксигеназой-2 (COX-2), которая имеет высокую экспрессию при агрессивном раке молочной железы. Содержание белка COX-2 увеличено в опухолях молочной железы и изменяется пропорционально увеличению размера опухоли и развитию отдаленных метастазов [23]. Аналогично, пациенты с высоким уровнем экспрессии AMF имеют худший прогноз.

Экспрессия AMF регулируется множеством факторов, однако основным является гипоксия. Гипоксия характеризуется сниженным содержанием кислорода в тканях. Уровень гипоксии злокачественных опухолей является важным прогностическим фактором. Гипоксия вызывает снижение чувствительности опухоли к химиотерапевти-

ческому и лучевому методам лечения. [24]. Высокий темп роста агрессивных опухолей и отставание неоваскуляризации требует от них эффективной адаптации к гипоксии. Гипоксия активирует два механизма: гликолиз и апоптоз. Регуляция этих процессов происходит через транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1 α). HIF-1 α регулирует экспрессию генов в ответ на изменения уровня кислорода в клетках. В условиях нормального содержания кислорода HIF-1 α крайне нестабилен и быстро разлагается по убиквитин-протеасомному пути [25]. В условиях гипоксии происходит транслокация HIF-1 α в ядро, где он связывается с промоторными и энхансерными участками генов, содержащими элементы ответа на гипоксию (HRE), что приводит к их транскрипционной активации. Среди промоторов и энхансеров встречаются гены, кодирующие ферменты гликолиза [26]. Гипоксия стимулирует экспрессию переносчика глюкозы Glut-1, гексокиназы, фосфофруктокиназы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и фосфоглицераткиназы. Подобная повышенная экспрессия генов, кодирующих гликолитические ферменты, необходима для адаптации раковых клеток к хронической гипоксии.

Внутриклеточная роль глюкозофосфатизомеразы достаточно хорошо изучена в классических энзимологических исследованиях, однако ее внеклеточная «негликолитическая» роль в качестве цитокина (AMF) открыта недавно и изучена недостаточно, в частности, при раке молочной железы. В связи с вышеизложенным изучение активности AMF в сыворотке крови больных раком молочной железы является актуальным.

Целью нашего исследования явилось изучение активности AMF в сыворотке крови больных раком молочной железы с различной распространенностью злокачественного процесса.

Материалы и методы

В проспективном исследовании обследованы 90 больных раком молочной железы, проходивших лечение в Витебском областном онкологическом диспансере в 2006–2007 году и 16 здоровых доноров. Критерием включения в исследование явилось наличие цитологически или гистологически верифицированного рака молочной железы, отсутствие поражения печени метастатическим либо неспецифическим процессом по данным УЗИ, нормальные показатели билирубина, АлАТ, АсАТ при биохимическом исследовании сыворотки крови. В плане исследования выделяли следующие группы больных:

1. Больные с 1 стадией рака молочной железы
2. Больные со 2 стадией рака молочной железы
3. Больные с 3 стадией рака молочной железы
4. Больные с 4 стадией рака молочной железы
5. Критерий N_0 (больные со злокачественным процессом $T_{1-2}N_0M_0$)

6. Критерий N_1 (больные со злокачественным процессом $T_{1-2}N_1M_0$)

7. Критерий N_2 (больные со злокачественным процессом $T_{1-2}N_2M_0$)

8. Критерий N_3 (больные со злокачественным процессом $T_{1-2}N_3M_0$)

Венозную кровь получали при венепункции натошак и переносили в сухую пробирку. После ретракции сгустка проводили центрифугирование при 1500 об/мин в течение 15 мин. Полученную сыворотку, не имеющую признаков гемолиза, делили на аликвоты и замораживали в низкотемпературной холодильной установке при $-16-18^{\circ}\text{C}$, где хранили до исследования. Активность в сыворотке крови глюкозофосфатизомеразы (AMF) определяли по методу Bruns и Hinsberg [27]. Полученные данные обрабатывали статистически. Рассчитывали медиану (M), среднее квадратическое отклонение (σ), верхний и нижний квартили. При оценке достоверности изменений исходили из гипотезы о негауссовом распределении учетного признака в изучаемых группах. Для оценки значимости изменений между группами использовали критерий Манна–Уитни, Краскелла–Уоллеса.

Таблица 1

Зависимость активности аутокринного фактора подвижности от стадии рака молочной железы

	Медиана	Минимум	Максимум	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Стандартное отклонение
Стадия 1	202,5832*†	58,5555	347,5554	169,9999	237,0554	61,3126
Стадия 2	221,9443*†	49,1111	417,4442	174,7221	270,1110	80,3064
Стадия 3	224,3054*†	0,0000	399,4998	180,8610	297,4999	93,4639
Стадия 4	467,4998*	462,7776	472,2220	462,7776	472,2220	6,6782
Доноры	123,7220†	105,7780	162,4440	110,0280	145,9165	18,6630

* – $p < 0,05$ по сравнению с донорами

† – $p < 0,05$ по сравнению с 4-ой стадией

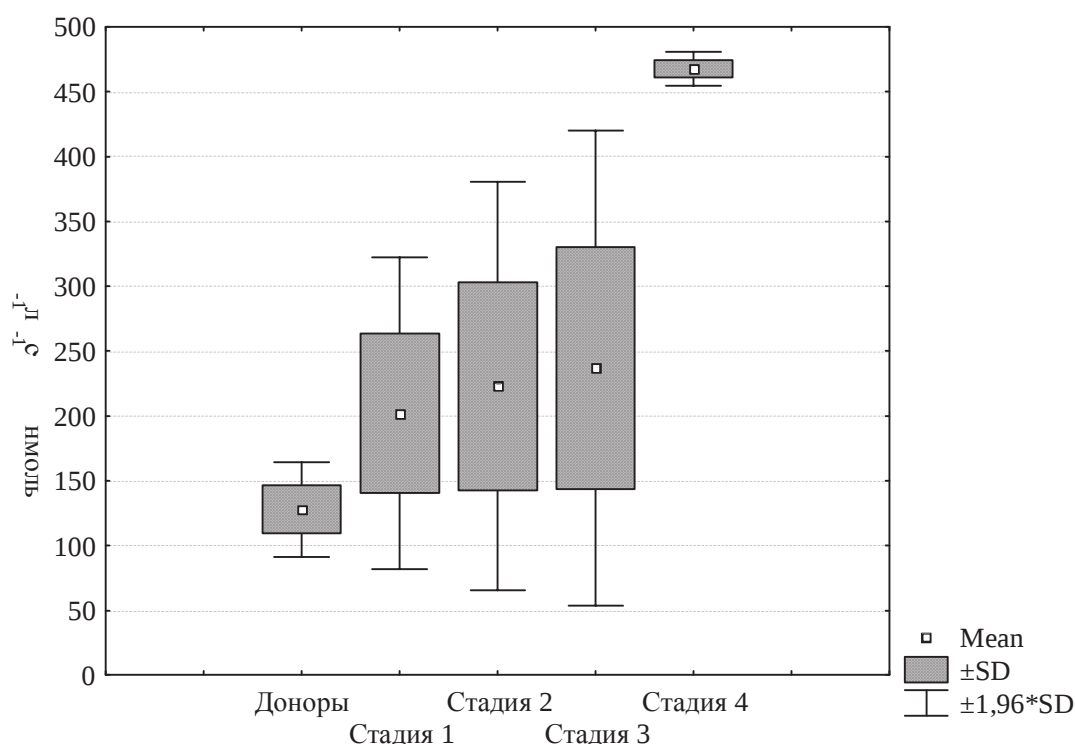


Рис. 1. Активность аутокринного фактора подвижности в сыворотке крови больных раком молочной железы.

Изменения считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Медиана активности AMF в сыворотке крови доноров ($n=16$) составила $123,72 \text{ нмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ ($\sigma=18,66$). У больных с 1-ой стадией рака молочной железы ($n=34$) активность AMF была повышена в 1,64 раза по сравнению с аналогичным показателем у доноров и составила $202,58 \text{ нмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ ($\sigma=61,31$), изменения достоверны, Тест Манна-Уитни $p=0,000015$ (таблица 1).

Отмечалась тенденция к увеличению активности AMF в сыворотке крови больных раком молочной железы параллельно с увеличением стадии заболевания. В группе больных со 2-ой стадией РМЖ ($n=30$) активность ГФИ была выше и составила $221,94 \text{ нмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ ($\sigma=80,30$) тест Манна-Уитни по сравнению с группой больных с

1-ой стадией РМЖ $p=0,32$. Активность AMF у больных с 3-ей стадией РМЖ ($n=24$) наблюдались близкие значения с таковыми в группе больных с 1-ой стадией и 2-ой стадией РМЖ. Медиана составила $224,31 \text{ нмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ ($\sigma=93,46$) тест Манна-Уитни по сравнению с группой со 2-ой стадией РМЖ $p=0,71$. У больных с 4-ой стадией РМЖ наблюдалось более значительное повышение активности AMF до $467,50 \text{ нмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ ($\sigma=6,68$), тест Манна-Уитни по сравнению с больными с 3-ей стадией РМЖ $p=0,02$, изменения достоверны. Следует отметить, что наличие злокачественной опухоли определяло значительное повышение активности AMF, которое оставалось достаточно стабильным в группах больных с 1-, 2-, 3-ей стадиями (рис. 1). У больных с 4-ой стадией РМЖ наблюдалась максимальная активность AMF.

Исследования зависимости активности AMF от степени распространенности

регионарного лимфогенного метастатического процесса показали, что медиана активности AMF у больных РМЖ с показателем N_0 составляла $212,48 \text{ нмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ ($\sigma=88,77$) (таблица 2).

В группе больных со значением N_1 аналогичный показатель активности был несколько выше и составил $225,72 \text{ нмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ ($\sigma=62,24$), при N_2 – $289,00 \text{ нмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ ($\sigma=125,13$), при N_3 – $209,67 \text{ нмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ ($\sigma=90,25$). Тест Краскела-Уоллиса не выявил значимых различий между исследуемыми группами N_0 , N_1 , N_2 , N_3 , из чего следует сделать вывод, что повышенная активность AMF у больных раком молочной железы в малой мере определяет активность лимфогенного метастазирования опухоли или требует для этого включения дополнительных процессов.

Выводы

1. Новые сведения о роли AMF позволяют применить хорошо отработанные методики определения активности AMF в сыворотке крови при раке молочной железы.

2. Определение AMF в сыворотке крови больных раком молочной железы может быть ценным диагностическим методом для выявления групп пациентов с по-

вышенным риском развития гематогенного метастатического процесса, а также критерием, определяющим необходимость более тщательного диагностического поиска у больных с отсутствием клинически выявляемых метастазов на момент исследования.

3. Возникает необходимость изменения клинического подхода к больным раком молочной железы с повышенной активностью AMF в сыворотке крови в сторону более тщательной диагностики гематогенного метастазирования первичной опухоли с применением для этого инвазивных и неинвазивных методов с высокой специфичностью (остеосцинтиграфия, КТ, МРТ и др.)

ЛИТЕРАТУРА

1. Purification of B16-F1 melanoma autocrine motility factor and its receptor / S. Silletti [et al.] // Cancer Res. – 1991. – Vol. 51. – P. 3507–3511.
2. Tsuboi, K. K. Phosphoglucose isomerase from human erythrocyte. Preparation and properties / K. K. Tsuboi, K. Fukunaga, C. H. Chervenka // J. Biol. Chem. – 1971. – Vol. 246, N 24. – P. 7586–7594.
3. Neuroleukin: a lymphokine product of lectin-stimulated T cells / M. E. Gurney [et al.] // Science. – 1986. – Vol. 234. – P. 574–581.
4. The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology

Таблица 2

Зависимость активности аутокринного фактора подвижности от степени лимфогенной диссеминации рака молочной железы

	n	Медиана	Минимум	Максимум	Нижний квартиль	Верхний квартиль	σ
N_1	23	225,7221*	109,5555	384,3887	187,9444	270,1110	62,2422
N_2	5	288,9999*	167,1666	472,2220	170,9444	311,6665	125,1333
N_3	11	209,6666*	0,0000	370,2220	177,5555	235,1666	90,2486
N_0	49	212,4999*	49,1111	462,7776	169,9999	255,9443	88,7670
Доноры	16	123,7220	105,7780	162,4440	110,0280	145,9165	18,6630

* – $p < 0,05$ по сравнению с донорами

- with neuroleukin or phosphoglucose isomerase / W. Xu [et al.] // *Blood*. – 1996. – Vol. 87. – P. 4502–4506.
5. Glucosephosphate isomerase (GPI) deficiency mutations associated with hereditary nonspherocytic hemolytic anemia (HNSHA) / E. Beutler [et al.] // *Blood Cells Mol. Dis.* – 1997. – Vol. 23. – P. 402–409.
 6. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme / I. Matsumoto [et al.] // *Science*. – 1999. – Vol. 286. – P. 1732–1735.
 7. Expression of autocrine motility factor receptor correlates with disease progression in human gastric cancer / Y. Hirono [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 1996. – Vol. 74. – P. 2003–2007.
 8. Autocrine motility factor receptor in human bladder carcinoma: gene expression, loss of cell-contact regulation and chromosomal mapping / S. Silletti [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 1993. – № 3. – P. 801–807.
 9. Autocrine motility factor signaling induces tumour apoptotic resistance by regulations Apaf-1 and Caspase-9 apoptosome expression / A. Haga [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2003. – Vol. 107. – P. 707–714.
 10. Activation of small GTPase Rho is required for autocrine motility factor signaling / S. Tsutsumi [et al.] // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62. – P. 4484–4490.
 11. Tumour autocrine motility factor responses are mediated through cell contact and focal adhesion rearrangement in the absence of new tyrosine phosphorylation in metastatic cells / S. Silletti [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 1996. – Vol. 148. – P. 1649–1660.
 12. Autocrine motility factor signaling enhances pancreatic cancer metastasis / S. Tsutsumi [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – N 10. – P. 7775–7784.
 13. Autocrine motility factor induces differential 12-lipoxygenase expression and activity in high- and low-metastatic K1735 melanoma cell variants / S. Silletti [et al.] // *Cancer Res.* – 1994. – Vol. 54. – P. 5752–5756.
 14. Regulation of tumor cell motility by 12(S)-HETE / S. Silletti [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1997. – Vol. 400B. – P. 683–692.
 15. Expression and function of the AMF receptor by human melanoma in experimental and clinical systems / J. Timar [et al.] // *Clin. Exp. Metastasis*. – 2002. – Vol. 19. – P. 225–232.
 16. Autocrine motility factor enhances hepatoma cell invasion across the basement membrane through activation of beta1 integrins / T. Torimura [et al.] // *Hepatology*. – 2001. – Vol. 34. – P. 62–71.
 17. Autocrine motility factor signaling enhances pancreatic cancer metastasis / S. Tsutsumi [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – N 10. – P. 7775–7784.
 18. Expression of autocrine motility factor receptor correlates with disease progression in human gastric cancer / Y. Hirono [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 1996. – Vol. 74. – P. 2003–2007.
 19. Significance of autocrine motility factor receptor gene expression as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer / I. Takanami [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2001. – Vol. 95. – P. 384–387.
 20. Expression and function of the AMF receptor by human melanoma in experimental and clinical systems / J. Timar [et al.] // *Clin. Exp. Metastasis*. – 2002. – Vol. 19. – P. 225–232.
 21. Significance of autocrine motility factor receptor gene expression as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer / I. Takanami [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2001. – Vol. 95. – P. 384–387.
 22. Antihuman epidermal growth factor receptor 2 antibody herceptin inhibits autocrine motility factor (AMF) expression and potentiates antitumour effects of AMF inhibitors / A. H. Talukder [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2002. – N 8. – P. 3285–3289.
 23. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer / A. Ristimäki [et al.] // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62. – P. 632–635.
 24. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy / G. L. Semenza // *Nat. Rev. Cancer*. – 2003. – N 3. – P. 721–732.
 25. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway / P. J. Kallio // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 6519–6525.

26. Semenza, G. L. Regulation of mammalian homeostasis by hypoxia-inducible factor / G. L. Semenza // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 1999. – Vol. 15. – P. 551–578.

27. Клиническая ферментология / под ред. Э. Щеклика // Польское государственное медицинское издательство. – Варшава, 1966. – 491 с.

Поступила 12.08.2007г.
