

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

© Е. С. Герштейн, Н. Е. Кушлинский, 1999
УДК 618-19-006.6-07

Е. С. Герштейн, Н. Е. Кушлинский

СИСТЕМА АКТИВАЦИИ ПЛАЗМИНОГЕНА В ОЦЕНКЕ ПРОГНОЗА И ГОРМОНО- ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

НИИ клинической онкологии

Основные компоненты системы активации плазминогена и их взаимодействие

Одним из основных механизмов инвазии злокачественных опухолей является разрушение окружающей опухоль базальной мембраны и внеклеточного матрикса ассоциированными с опухолью протеазами. Протеазы также участвуют в процессах метастазирования [30, 34]. Центральную роль в этих процессах может играть сериновая протеаза — активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) [7]. uPA секретируется в виде ферментативно неактивного одноцепочечного предшественника про-uPA [5], который после связывания со специфическими рецепторами на поверхности клетки превращается под действием плазмина в активную двухцепочечную молекулу [12]. Про-uPA может активироваться также калликреином, катепсином В и некоторыми другими протеолитическими ферментами [25, 29]. Активный uPA в свою очередь катализирует превращение плазминогена в плазмин. Таким образом, весь процесс образования плазмина представляет собой амплификацию, регулируемую по механизму обратной связи (см. схему).

Плазмин разрушает компоненты опухолевой стромы, а также активирует металлопротеазы, в частности коллагеназу IV, которая расщепляет коллаген и другие компоненты базальной мембраны, что и способствует метастазированию и инвазии опухолей [7, 30].

uPA является ключевым звеном этого протеолитического каскада, и его активность регулируется несколькими способами. С одной стороны, связывание uPA с рецептором на поверхности клетки существенно стимулирует весь процесс активации плазминогена и образования плазмина, и в физиологических условиях поверхность клеток, имеющих рецепторы uPA, является основным местом активации плазминогена [11, 12]. С другой стороны, по механизму обратной связи происходит инактивация рецептора в результате его

REVIEWS

E.S.Gershtein, N.E.Kushlinsky

PLASMINOGEN ACTIVATION SYSTEM IN PROGNOSIS OF BREAST CANCER HORMONE SENSITIVITY

Clinical Biochemistry Laboratory, Institute of Clinical Oncology

Plasminogen Activation System Principal Components and Their Interaction

Destruction of basement membrane and extracellular matrix around the tumor under the effect of tumor-associated proteases is a principal mechanism of cancer invasion. The proteases also contribute to cancer metastasis [30,34]. Serin protease, an urokinase plasminogen activator (uPA), may play a central role in these processes [7]. The uPA is secreted as an enzyme-inactive single-chain precursor, pro-uPA [5] which on binding to a cell surface specific receptor changes into an active double-chain molecule under the effect of plasmin [12]. The pro-uPA may also be activated by callicrein, cathepsin B and some other proteolytic enzymes [25,29]. The active uPA catalyses the plasminogen changing into plasmin. Thus, the plasmin production is in fact amplification regulated by the feed-back mechanism (see the scheme).

Plasmin destroys tumor stromal components and activates metalloproteases, in particular collagenase IV which splits collagen and other basement membrane components to promote tumor metastasis and invasion [7,30].

The uPA is a key element of the proteolytic cascade, and its activity is regulated by several ways. On the one hand, the uPA-cell surface receptor binding enhances the entire process of plasminogen activation and plasmin production, and the uPA receptor-positive cell surface is the main site of plasminogen activation in physiological environment [11,12]. On the other hand, the receptor is inactivated by the feed-back mechanism under the effect of plasmin and uPA which results in its ligand-binding domain splitting off [24].

The uPA activity is also blocked by two protein inhibitors belonging to the serpin family, such as PAI-1 and PAI-2 [1] as well as by α_2 -antiplasmin and nexin [48]. The PAI-1 and PAI-2 effectively inhibit the receptor-conjugated uPA [10] while

расщепления плазмином и самим uPA, при этом от рецептора отщепляется его лигандсвязывающий домен [24].

Активность uPA подавляется также двумя белковыми ингибиторами, принадлежащими к семейству серпинов, — PAI-1 и PAI-2 [1], а также α_2 -антиплазмином и нексином [48]. PAI-1 и PAI-2 эффективно ингибируют связанный с рецептором uPA [10], а α_2 -антиплазмин защищает находящийся на поверхности клетки плазмин от ингибирования [22]. 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 [6, 39].

PAI-1 может ингибировать также и свободный, не связанный с рецептором uPA [1]. Данные гистологических исследований, косвенно подтверждаемые клиническими наблюдениями, которые будут описаны ниже, свидетельствуют о том, что роль ингибитора 1-го типа (PAI-1) может сводиться преимущественно к защите опухолевых клеток от разрушающего действия uPA [43]. Таким образом, наличие этого ингибитора может одновременно и подавлять метастазирование и инвазию (торможение активации плазминогена и всего последующего протеолитического каскада), и способствовать распространению опухолевого процесса (защита опухолевых клеток от протеолиза).

Иммуногистохимические исследования и результаты гибридизации *in situ* в биоптатах опухолей молочной железы человека и ксенографтах опухолей человека у бестимусных мышей показали, что uPA экспрессируется преимущественно фибробластоподобными клетками стромы в фокусах инвазии [37, 49]. Клетки, ответственные за секрецию uPA в злокачественных опухолях молочной железы, были идентифицированы как α -гладкомышечные актин- и цитокератинположительные миофибробласты. Эти миофибробласты, составляющие более 80% стромальных клеток при протоковом раке молочной железы, возникают в результате дифференцировки фибробластов и отсутствуют в ткани нормальной молочной железы [47]. Показано, что при совместном культивировании клеток рака молочной железы и актиноотрицательных фибробластов в течение 2 нед эти фибробласты становятся актинположительными, причем наибольшая экспрессия актина наблюдается в клетках, непосредственно прилежащих к опухолевым [46]. Предполагается [51], что опухолевые клетки по некоему паракринному механизму «заставляют» фибробласты продуцировать uPA, и параллельно с этим происходит превращение этих фибробластов в миофибробласты.

В фокусах инвазии протокового рака молочной железы наблюдается также повышенная экспрессия рецептора uPA, однако в большинстве случаев рецепторы выявляются не на самих опухолевых клетках и не на стромальных клетках, а на инфильтрирующих опухоль макрофагах [42]. В связи с этим была высказана гипотеза [37] о том, что опухолевые клетки вовлекают в процессы секреции и активации uPA не только фибробласты, но и макрофаги, и все эти три типа клеток в тесном взаимодействии обеспечивают инвазию. Пока-

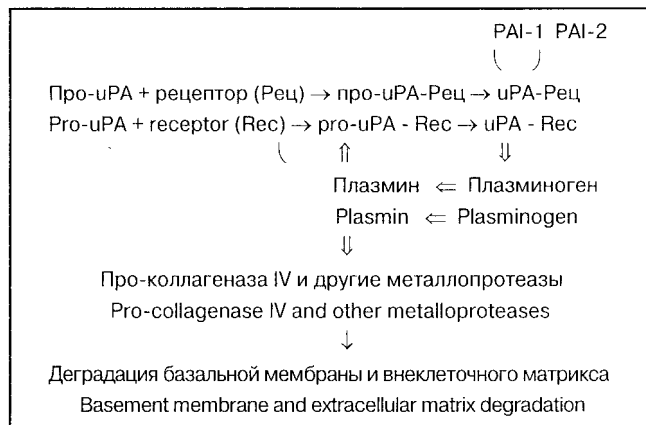


Схема. Регуляция протеолитического каскада активации плазминогена на поверхности клетки, приводящей к разрушению базальной мембраны и внеклеточного матрикса.
⇒ — активация; \ — ингибирование (расщепление)

Scheme. Regulation of plasminogen activation proteolytic cascade on cell surface leading to destruction of basement membrane and extracellular matrix.
⇒, activation; \, inhibition (splitting)].

the α_2 -antiplasmin prevents inhibition of the cell surface plasmin [22]. The PAI-1 and PAI-2 binding to the uPA-receptor complex leads to internalization of covalent protease-inhibitor complexes mediated by α_2 -macroglobulin receptor and to splitting of the complexes inside the cell [6,39].

The PAI-1 may also inhibit free, i.e. not receptor-conjugated, uPA [1]. Histological findings which were indirectly confirmed by clinical observations to be described below demonstrated that the type 1 inhibitor (PAI-1) functioned mainly as a tumor cell protector from the uPA destructive activity [43]. Thus, this inhibitor may both inhibit tumor metastasis and invasion (by blocking plasminogen activation and further proteolytic cascade) and promote tumor progression (by protecting tumor cells from proteolysis).

Immunohistochemical findings and results of *in situ* hybridization in human breast tumor bioptic specimens and human tumor xenografts in athymic mice demonstrated the uPA to be expressed mainly by stromal fibroblast-like cells in invasion foci [37,49]. Breast cancer cells responsible for uPA secretion were identified as α -smooth muscle actin- and cytokeratin-positive myofibroblasts. These fibroblasts (which are more than 80% of stromal cells in breast ductal cancer) develop as a result of fibroblast differentiation and are not found in normal breast tissue [47]. It was demonstrated that 2-week cultivation of breast cancer cells and actin-negative fibroblasts led to the fibroblasts changing into actin-positive, the greatest actin expression being observed on cells located in close vicinity to the tumor [46]. The tumor cells are supposed [51] to «make» the fibroblasts produce uPA by a certain paracrine mechanism, the fibroblasts meanwhile turning into myofibroblasts.

There is increased uPA receptor expression in ductal breast cancer invasion foci, however, the receptors are found

зано, что активируемые плазминогеном металлопротеазы также локализованы в опухолевых фибробластах [38, 54].

Механизм паракринной активации плазминогена и других протеаз в опухолях полностью не установлен, однако известно, что синтез рецепторов uPA регулируется трансформирующими факторами роста β_1 и β_2 , эпидермальным фактором роста (ЭФР), а также опухолевым промотором фторбол-12-миристан-13-ацетатом, имитирующим эффект ЭФР [31—33]. О взаимосвязи системы активации плазминогена с процессами, опосредуемыми факторами роста, косвенно свидетельствует и тот факт, что в молекуле uPA имеется ЭФР-подобный домен [35]. Известно также, что плазмин активирует многие факторы роста, расщепляя их неактивные предшественники [34].

Результаты клинических исследований

Активатор плазминогена урокиназного типа (uPA).

В первом предварительном исследовании, опубликованном M. J. Duffy и соавт. в 1988 г. [8] и включавшем 52 наблюдения больных раком молочной железы, было показано, что при повышенной ферментативной активности uPA в первичной опухоли безрецидивный интервал уменьшается. Это была практически единственная работа, в которой оценивалась ферментативная активность uPA, так как в дальнейшем было разработано несколько вариантов иммуноферментного метода определения uPA, и все последующие исследования клинического значения этого показателя базировались на оценке количества соответствующего антигена в экстрактах опухолевых тканей.

Первое такое исследование было опубликовано F. Jänicke и соавт. в 1990 г. [26]. У 50 больных раком молочной железы без метастазов в лимфоузлы и 54 больных с метастазами в лимфоузлы было отмечено, что высокий уровень иммунореактивного uPA является независимым фактором прогноза низкой безрецидивной выживаемости. В последующих исследованиях эти авторы [21, 27, 28], а также другие исследователи [2, 9, 13, 19] подтвердили обнаруженную закономерность.

В частности, в исследовании J. A. Foekens и соавт. [13], включавшем 671 случай первичного операбельного рака молочной железы, было выявлено, что при условной границе положительности по uPA, равной 1,15 нг/мг белка цитозоля, безрецидивная и общая выживаемость больных с uPA-положительными опухолями была достоверно хуже, чем у больных с uPA-отрицательными опухолями. В наибольшей степени различия проявлялись у постменопаузальных больных, у которых относительный риск рецидива (ОРР) равен 2,59, у больных с опухолями, положительными по рецепторам эстрогенов (РЭ) и прогестерона (РП) (ОРР = 2,76), и больных без метастазов в лимфоузлах (ОРР = 2,33). У больных с метастазами в лимфоузлах безрецидивная выживаемость при uPA-положительных опухолях также была достоверно меньше, чем при uPA-отрицательных опухолях, но ОРР составил всего лишь 1,95.

В последующих исследованиях значение uPA для прогнозирования рецидивов и метастазов у больных с ранними стадиями рака молочной железы было подтверждено при анализе результатов, полученных у 2003 больных [17]. Таким

образом, на опухоль инфильтрируют макрофаги, а не сами опухолевые клетки или стромальные клетки [42]. Это открытие предполагает [37], что как фибробласты, так и макрофаги участвуют в секреции и активации uPA, и все эти клетки способствуют инвазии. Плазминоген-активированные металлопротеазы также обнаружены на опухолевых фибробластах [38, 54].

Механизм паракринной активации плазминогена и других протеаз в опухолях неизвестен, хотя uPA-рецепторный синтез регулируется трансформирующими факторами b1 и b2, эпидермальным фактором роста (EGF) и опухолевым промотором фторбол-12-миристан-13-ацетатом, имитирующим эффект EGF [31—33]. Наличие в uPA молекуле EGF-подобного домена является косвенным доказательством взаимосвязи между системой активации плазминогена и фактор-опосредованными процессами [35]. Плазмин также известен тем, что активирует многие факторы роста, расщепляя их неактивные предшественники [34].

Клинические находки

Урокиназный активатор плазминогена (uPA). Первое промежуточное исследование M. J. Duffy et al. (1988) [8] проведено в 52 случаях рака молочной железы, продемонстрировав, что повышенная ферментативная активность uPA коррелировала с более коротким безрецидивным интервалом. Это было практически единственным исследованием uPA, так как в дальнейшем были разработаны несколько вариантов иммуноферментных анализов, и все последующие исследования клинического значения этого показателя базировались на оценке количества соответствующего антигена в экстрактах опухолевых тканей.

Первое исследование этого типа было опубликовано F. Jänicke et al. в 1990 г. [26]. Оно было проведено в 50 случаях рака молочной железы без метастазов и 54 случаях с метастазами в лимфоузлы, продемонстрировав, что иммунореактивный uPA является независимым фактором прогноза низкой безрецидивной выживаемости. Это открытие было подтверждено в дальнейших исследованиях тех же авторов [21, 27, 28] и других [2, 9, 13, 19].

Например, J. A. Foekens et al. [13] исследовали 671 случай первичного операбельного рака молочной железы, чтобы выяснить, что безрецидивная и общая выживаемость были значительно хуже в uPA-положительных случаях, чем в uPA-отрицательных случаях, uPA-положительность определяемая как 1.15 нг на мг или больше цитозольного белка. Различия были наиболее выражены у постменопаузальных женщин (относительный риск рецидива, RRR=2.59), у женщин с положительными рецепторами эстрогенов (RRR=2.76) и у женщин без метастазов в лимфоузлах (RRR=2.33). У больных с метастазами в лимфоузлах безрецидивная выживаемость при uPA-положительных опухолях также была достоверно хуже, чем при uPA-отрицательных опухолях, но RRR составил всего лишь 1.95.

Урокиназный активатор плазминогена (uPA) в раннем раке молочной железы был подтвержден анализом 2003 пациентов [17]. Таким образом, uPA является важным дополнительным фактором прогноза в раке молочной железы, поскольку он может идентифицировать подгруппы с высоким риском рецидива или метастазирования, требующие более интенсивного лечения.

uPA Inhibitor Type 1 (PAI-1). F. Jänicke et al. [27] были первыми, кто продемонстрировал в 1991 г. корреляцию высокого уровня PAI-1 с плохим прогнозом в раке молочной железы. Эти находки были подтверждены в дальнейших исследованиях [2, 14, 19, 28].

Наиболее репрезентативные исследования были опубликованы в [14, 17]. Среди 657 случаев первичного операбельного рака молочной железы 44% были PAI-1-положительными, uPA-положительность определяемая как 17 нг

образом, uPA оказался важным дополнительным фактором прогноза в прогностически относительно благоприятных группах больных раком молочной железы, что указывает на его потенциальное значение для выявления среди этих больных подгрупп с повышенным риском рецидивирования и/или метастазирования, требующих более интенсивного лечения.

Ингибитор uPA типа 1 (PAI-1). Впервые в 1991 г. F. Jänicke и соавт. [27] было показано, что высокий уровень PAI-1 в опухолевой ткани является показателем плохого прогноза при раке молочной железы. Эти результаты подтвердились и в дальнейших исследованиях [2, 14, 19, 28].

Наиболее репрезентативные исследования были проведены J. A. Foekens и соавт. [14, 17]. У 657 больных первичным операбельным раком молочной железы PAI-1-положительными при границе, равной 17 нг/мг белка (установленной с помощью изотонического регрессионного анализа), оказались 44% опухолей. Пятилетняя выживаемость больных с PAI-1-положительными опухолями оказалась при этом на 26% меньше, чем у больных с PAI-1-отрицательными опухолями. Различия в безрецидивной выживаемости сохранялись примерно на том же уровне во всех подгруппах больных (с метастазами и без метастазов в лимфоузлы, в пре- и постменопаузе, с рецепторположительными и рецепторотрицательными опухолями). Частота выявления PAI-1 не зависела от размера опухоли, статуса лимфоузлов и степени дифференцировки рака молочной железы, но PAI-1 реже выявлялся в РЭ/РП-положительных опухолях, чем в рецепторотрицательных опухолях. Уровень PAI-1 положительно коррелировал с уровнями uPA и катепсина D.

При многофакторном анализе безрецидивной и общей выживаемости с учетом не только клинических факторов, но и различных цитозольных маркеров (РЭ, РП, pS2, катепсина D, uPA) PAI-1 оказался наиболее значимым для прогноза безрецидивной выживаемости (ORP = 2,04) и занимал второе место после рецепторного статуса при прогнозе общей выживаемости (относительный риск смерти (ОРС) равен 1,5). Интересно, что в подгруппе больных, не имевших метастазов в лимфоузлах, PAI-1 оказался единственным цитозольным фактором, сохранившим свое прогностическое значение при многофакторном анализе.

Существует несколько гипотез для объяснения видимого противоречия между ингибирующим действием PAI-1 на uPA, являющимся показателем метастатической активности опухоли, и уменьшением безрецидивной выживаемости больных при высоких уровнях этого ингибитора. D. Reilly и соавт. [43] иммуногистохимическими методами продемонстрировали, что PAI-1 локализуется преимущественно в скоплениях эпителиальных опухолевых клеток, в стенках сосудов и в нормальном эпителии протоков в отличие от самого uPA и его рецепторов, локализующихся соответственно в стромальных клетках и на инфильтрирующих опухоль макрофагах. Авторы предположили, что продукция PAI-1 является механизмом самозащиты опухолевых клеток от разрушающего действия uPA. Другие исследователи [41] считают, что уровень PAI-1 в экстрактах опухолей может быть биохимическим показателем степени неоваскуляризации опухолевой ткани, которая,

per mg protein as measured by isotonic regressive assay. The PAI-1-positive patients had a 26% shorter 5-year survival as compared to the PAI-1-negative group. The difference in disease-free survival was practically the same in all patient subgroups (node-positive/negative, pre-/postmenopausal, receptor-positive/negative). The PAI-1 prevalence was not related to tumor size, lymph node status or breast cancer differentiation, though PAI-1 was found less frequently in ER/PR-positive versus negative cases. The PAI-1 level was positively correlated with uPA and cathepsin D.

Multifactorial analysis of disease-free and overall survivals with respect to both clinical factors and various cytosol markers (ER, PR, pS2, cathepsin D, uPA) discovered PAI-1 to demonstrate the highest prognostic significance as to disease-free survival (RRR=2.04) and to be the second significant factor after receptor status as to prognosis of overall survival (relative risk of death, RRD=1.5). Interestingly, that the PAI-1 was the only cytosol factor preserving its prognostic significance in multifactorial analysis in node-negative patients.

There are several hypotheses to explain the apparent contradiction between the PAI-1 inhibiting effect on uPA that is a characteristic of tumor metastasis potential and the reduction in disease-free survival of patients with high inhibitor levels. D. Reilly et al. [43] demonstrated immunohistochemically that the PAI-1 was mainly located in epithelial tumor cells, vessel walls and normal duct epithelium while the uPA and its receptors were mainly found in stromal cells and tumor-infiltrating macrophages, respectively. The authors made the supposition that PAI-1 production was a mechanism of tumor cell self-defense from the uPA destructive effect. Other investigators [41] supported the opinion that PAI-1 in tumor extracts was a biochemical marker of neovascularization since the PAI-1 contributed to angiogenesis [36] which suggested [52,53] poor prognosis. And finally F. Janicke et al. [28] suggested that PAI-1 overproduction might be important for reimplantation of circulating tumor cells since inhibition of uPA-induced extracellular matrix degradation was needed to generate new stroma in metastasis sites.

uPA Inhibitor Type 2 (PAI-2). Prognostic role of PAI-2 in breast tumors is studied much less as compared to PAI-1. C. Bouchet et al. [2] examined 314 patients to demonstrate a favorable prognostic role of increased PAI-2 concentrations. This finding is in conformity with the theoretical supposition that inhibition of uPA must reduce tumor metastatic potential and proves PAI-2 to be a true inhibitor of the uPA principal function, i.e. plasminogen activation.

Unfortunately the discovered [2] prognostic value of PAI-2 in a common group of breast cancer patients (as well as in subgroups with respect to menopausal, lymph node and receptor statuses) was not confirmed by a rather representative (1012 cases) study [15]. The authors discovered a statistically significant increase in relapse-free, metastasis-free and overall survivals in relation with high PAI-2 concentrations only in cases with elevated primary tumor uPA. The PAI-2 contents showed no correlation with node status,

как известно [52, 53], отрицательно влияет на прогноз, так как PAI-1 участвует в процессах ангиогенеза [36]. И, наконец, еще одна гипотеза предложена F. Jänicke и соавт. [28]: они считают, что избыточная продукция PAI-1 может иметь значение для реимплантации циркулирующих опухолевых клеток, поскольку для образования новой стромы в участках метастазирования необходимо подавление uPA-индуцированной деградации внеклеточного матрикса.

Ингибитор uPA типа 2 (PAI-2). Прогностическое значение PAI-2 в опухолях молочной железы исследовано в значительно меньшей степени, чем значение PAI-1. При этом C. Bouchet и соавт. [2], обследовавшие 314 больных, отметили благоприятную прогностическую роль повышенного уровня PAI-2, что согласуется с теоретическими представлениями о том, что ингибирование uPA должно снижать метастатический потенциал опухоли, и свидетельствует о том, что PAI-2 является истинным ингибитором основной функции uPA — активации плазминогена.

К сожалению, обнаруженное [2] прогностическое значение PAI-2 в общей группе больных раком молочной железы (а также в подгруппах больных, различающихся по менопаузному и рецепторному статусу, статусу лимфоузлов) не было подтверждено в весьма репрезентативном (включавшем 1012 больных) исследовании [15]. Авторы выявили достоверное увеличение безрецидивной, безметастатической и общей выживаемости при высоких уровнях PAI-2 только у больных раком молочной железы с повышенным содержанием uPA в первичной опухоли. Уровень PAI-2 не коррелировал со статусом лимфоузлов, степенью дифференцировки опухоли, содержанием рецепторов стероидных гормонов. Это наблюдение, с одной стороны, свидетельствует о более низкой прогностической значимости PAI-2 по сравнению с uPA и PAI-1, а с другой стороны, еще раз подтверждает тот факт, что именно PAI-2 является истинным ингибитором uPA, подавляющим его «инвазивную» активность.

В целом методическая база исследования PAI-2 в опухолях человека, по-видимому, еще недостаточно разработана, и наблюдаются существенные многократные различия в уровнях этого ингибитора, выявляемых разными группами исследователей, даже если они используют одни и те же коммерческие наборы [2, 50].

Рецептор uPA. Рецептор uPA (Рц-uPA) — наименее изученный в клиническом плане компонент системы активации плазминогена. Лишь в 1994—1995 гг. после разработки группой датских ученых [44, 45] метода иммуноферментного определения Рц-uPA стала возможной оценка клинического значения этого показателя, которая была проведена одним из авторов метода в содружестве с учеными из Dr. Daniel den Hoed Cancer Center в Роттердаме [20]. В исследование было включено 505 больных операбельным первичным раком молочной железы различной стадии, но без отдаленных метастазов. Для определения использовали ранее замороженные и хранившиеся в жидком азоте опухоли, таким образом срок наблюдения за больными составил от 12 до 125 мес.

tumor differentiation, steroid hormone receptor content. This finding, on the one hand, suggested that PAI-2 had a lower prognostic value as compared with uPA and PAI-1, and, on the other hand, confirmed once more that PAI-2 was a true uPA inhibitor suppressing its invasive activity.

The study methods of human tumor PAI-2 require improvement because there is a considerable difference between the inhibitor measurements as performed by different investigators even when using the same commercial test kits [2,50].

uPA Receptor. The uPA receptor (uPA-R) is the least clinically studied component of the plasminogen activation system. Clinical evaluation of this parameter became possible only after development of an uPA-R immunoezymometric assay by Danish scientists in 1994-1995 [44,45] and was performed by an author of the method together with investigators from Dr Daniel den Hoed Cancer Center [20]. The study was performed in 505 patients with operable primary breast cancer free from distant metastases. The tests were carried out in frozen tumors stored in liquid nitrogen, the time of observation thus being 12 to 125 months.

The uPA-R content showed no correlation with most clinical, morphological and cytosol prognostic factors; there was a weak though significant positive correlation with other elements of the plasminogen activation system such as uPA and PAI-1 as well as with cathepsin D. After the patients were stratified into subgroups with high (above the median) and low (below the median) uPA-R level a decrease in overall survival in cases with elevated tumor uPA-R was the only significant regularity discovered.

The only category of cases in which high uPA-R showed statistical significance as to both overall and disease-free survivals was 201 postmenopausal women with lymph node metastases (respective RRD and RRR in cases with high versus low uPA-R were 2.39 and 1.91). Multifactorial analysis of these cases including both classical parameters and all components of the plasminogen activation system discovered that the uPA-R preserved significance as to prognosis of overall survival and was the most indicative among cytosol factors including uPA and PAI-1.

Interestingly that uPA-R content in homogenate triton extracts was less prognostically significant than cytosol uPA-R [20]. Thus, in spite of the fact that it is membrane-bound (i.e. detergent-extracted) receptor that is most functionally active, its soluble (most likely, partially degraded) form has a greater clinical value. To explain this apparent contradiction the authors put forward the supposition that soluble uPA-R resulted from splitting of the membrane-bound receptor by plasmin (see the scheme) and therefore its content may be a measure of activity of the whole uPA-dependent complex.

Plasminogen Activation System Components and Efficacy of Adjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. As mentioned above, high uPA levels correlate with shorter disease-free survival of patients having steroid receptor-positive breast cancer. The supposition may therefore be made that uPA expression neutralizes the ER-positivity effect in hormone-

Уровень Рц-uPA не коррелировал с большинством из клинико-морфологических и цитозольных факторов прогноза, наблюдалась лишь слабая, хотя и достоверная, положительная корреляция с другими компонентами системы активации плазминогена — uPA и PAI-1, а также с катепсином D. При разделении всех больных на группы с высоким (выше медианы) и низким (ниже медианы) уровнем Рц-uPA единственной достоверной закономерностью было лишь уменьшение общей выживаемости у больных с высоким уровнем Рц-uPA. Безрецидивная выживаемость больных не была связана с уровнем Рц-uPA в опухоли.

При учете различных клинических факторов удалось выявить одну единственную подгруппу больных, в которой высокий уровень Рц-uPA достоверно снижал как общую, так и безрецидивную выживаемость, — это 201 постменопаузная больная с метастазами в лимфоузлах (ОРС и ОРР при высоком уровне Рц-uPA по отношению к группе с низким уровнем Рц-uPA составили соответственно 2,39 и 1,91). При многофакторном анализе данной группы больных, включавшем наряду с классическими показателями все компоненты системы активации плазминогена, вклад Рц-uPA в прогноз общей выживаемости сохранил свое значение и оказался наибольшим из всех цитозольных факторов, включая uPA и PAI-1.

Интересным представляется тот факт [20], что исследовавшийся параллельно с цитозольным уровнем Рц-uPA в тритоновом экстракте гомогената оказался менее значимым для прогноза, чем соответствующий цитозольный показатель. Таким образом, несмотря на то что функционально активным является именно мембранно-связанный (экстрагируемый детергентом) рецептор, большее клиническое значение имеет его растворимая (по-видимому, частично деградированная) форма. В качестве рабочей гипотезы для объяснения этого кажущегося противоречия авторы выдвигают предположение о том, что растворимый Рц-uPA образуется в результате расщепления нативного мембранно-связанного рецептора плазмином (см. схему) и, таким образом, его количество является мерой активности всего uPA-зависимого процесса.

Взаимосвязь компонентов системы активации плазминогена с эффективностью адъювантной терапии рака молочной железы. Как уже отмечалось, высокие уровни uPA приводят к уменьшению безрецидивной выживаемости больных раком молочной железы с опухолями, положительными по рецепторам стероидных гормонов. Этот факт позволяет предположить, что экспрессия uPA может нивелировать положительный эффект РЭ в потенциально гормоночувствительной группе больных. В связи с этим теоретически можно предположить, что определение uPA, а также, возможно, и других компонентов системы активации плазминогена могло бы помочь в выявлении гормонорезистентной подгруппы среди рецепторположительных больных (составляющей, как известно, от 30 до 50% всех РЭ⁺ и/или РП⁺ больных).

Детально такая возможность была исследована в лаборатории Фукенса в Нидерландах. В первое исследование [16] были включены 235 больных с рецидивом рака молочной

сensitive cases. It then follows that measurement of uPA and possibly of other components of the plasminogen activation system may distinguish a hormone-resistant subgroup among receptor-positive patients (which is 30 to 50% of all ER⁺ or PR⁺ cases).

This supposition was first tested in a Dutch study [16] in 235 patients with recurrent breast cancer who did not receive tamoxifen previously. On relapsing the patients started tamoxifen therapy. Primary tumor cytosol uPA and PAI-1 were measured together with steroid hormone receptors. The patients demonstrating partial or complete response or stable disease for more than 6 months were considered responders to tamoxifen. They were stratified into three subgroups with respect to tumor steroid receptor content, as follows. Group 1 (receptor-negative) was defined as cases with ER and/or PR ≤ 10 fmol per mg protein; patients from group 3 (high receptor concentration) had ER and PR > 75 fmol per mg protein; group 2 comprised all the remaining cases.

It appeared that increased uPA expression reduced significantly the response to tamoxifen only in the patients with medium tumor receptor levels (group 2: 16% responders in the uPA-positive vs 60% in the uPA-negative subgroups). This tendency in the receptor-negative cases was not statistically significant while in the cases with high receptor contents the response to tamoxifen therapy was not related to uPA concentration. PAI-1 failed to produce any significant effect on tamoxifen responsiveness of recurrent breast cancer.

In a study performed in 1996 [18] with 534 patients having recurrent breast cancer and previously receiving first-line therapy with tamoxifen high levels of uPA, PAI-1 and uPA-R reduced in a statistically significant manner the response to tamoxifen (relative risk of disease progression being 1.23 to 1.35) while high PAI-2 content increased the probability of response (RR=0.8).

Thus, measurement of components of the plasminogen activation system may be useful to select patients with the highest hormone-sensitivity, more so in the cases with medium steroid hormone receptor concentrations. Besides, plasminogen activation inhibition at different stages (activator inhibition, receptor binding inhibition) may itself provide a new therapeutic approach [3]: as demonstrated *in vitro* [4,23] as well as in experiments with human tumor xenografts in athymic mice [40] monoclonal antibodies to uPA-R ligand-binding domain reduced invasive potential of tumor cells and transplanted tumors.

In summary, the literature on the contribution of the plasminogen activation system to tumor metastatic and invasive potentials and on the clinical significance of the system components clearly shows that study of the system is a promising approach and uPA and PAI-1 seem to be the most useful parameters in this respect.

железы, не получавших ранее тамоксифен. После возникновения рецидива всех этих больных лечили тамоксифеном. Содержание uPA и PAI-1 определяли в цитозоле первичной опухоли одновременно с содержанием рецепторов стероидных гормонов. Больных считали прореагировавшими на тамоксифен, если у них наблюдался частичный или полный эффект от лечения, а также при стабилизации заболевания на срок более 6 мес. Они были разделены на три подгруппы в соответствии с содержанием рецепторов стероидных гормонов в опухоли: группа 1 (рецепторотрицательная) — РЭ и/или РП ≤ 10 фмоль/мг белка; группа 3 (с высоким содержанием рецепторов) — РЭ и РП > 75 фмоль/мг белка; группа 2 — все остальные больные.

Оказалось, что повышенная экспрессия uPA достоверно ухудшает реакцию на тамоксифен только у больных с промежуточным содержанием рецепторов стероидных гормонов в опухоли (группа 2: 16% прореагировавших больных в uPA-положительной подгруппе и 60% — в uPA-отрицательной). Аналогичная тенденция в рецепторотрицательной подгруппе была статистически недостоверна, а в группе с высоким содержанием рецепторов зависимость реакции на тамоксифен от уровня uPA полностью отсутствовала. Уровень PAI-1 не оказывал достоверного влияния на чувствительность рецидивного рака молочной железы к тамоксифену.

В исследовании 1996 г. [18], включавшем 534 больных рецидивным раком молочной железы, получавших тамоксифен в качестве первоочередной терапии, было показано, что высокие уровни uPA, PAI-1 и Рц-uPA достоверно снижают чувствительность больных к тамоксифену (относительный риск прогрессирования от 1,23 до 1,35), а высокий уровень PAI-2, напротив, увеличивает вероятность эффекта (ОР = 0,8).

Таким образом, определение компонентов системы активации плазминогена, с одной стороны, может помочь в отборе наиболее гормоночувствительных больных, особенно в подгруппе с промежуточным содержанием рецепторов стероидных гормонов. С другой стороны, подавление активации плазминогена на различных уровнях (ингибирование активаторов, торможение их связывания с рецепторами) может само по себе стать одним из подходов к разработке новых видов терапии [3]: в исследованиях *in vitro* [4, 23], а также в опытах с ксенотрансплантатами опухолей человека у бестимусных мышей показано [40], что моноклональные антитела к лигандсвязывающему домену Рц-uPA снижают инвазивную способность соответственно опухолевых клеток и трансплантированных опухолей.

Подводя итоги обзора данных литературы о роли системы активации плазминогена в формировании метастатического и инвазивного потенциала опухолей и клиническом значении определения отдельных компонентов этой системы, можно заключить, что ее исследование, безусловно, является весьма перспективным с клинической точки зрения, причем наиболее значимыми показателями являются, по-видимому, uPA и PAI-1.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. *Andreasen P. A., Georg B., Lund L. R. et al. // Mol. Cell. Endocrinol. — 1990. — Vol. 68. — P. 1—19.*
2. *Bouchet C., Spyrtos F., Martin P. M. et al. // Br. J. Cancer. — 1994. — Vol. 69. — P. 398—405.*
3. *Brünnner N., Holst-Hansen C., Pedersen A. N. et al. // Breast Cancer. Advances in Biology and Therapeutics / Eds F. Calvo, M. Crépin, H. Magdelenat — Paris; London, 1996. — P. 201—207.*
4. *Crowley C. W., Cohen R. L., Lucas B. K. et al. // Proc. natl. Acad. Sci. USA. — 1993. — Vol. 90. — P. 5021—5025.*
5. *Cubellis M. V., Nolli M. L., Cassani G. et al. // J. biol. Chem. — 1986. — Vol. 261. — P. 15819—15822.*
6. *Cubellis M. V., Wun T. C., Blasi F. // EMBO J. — 1990. — Vol. 9. — P. 1079—1085.*
7. *Dano K., Andreasen P. A., Grondahl-Hansen J. et al. // Adv. Cancer Res. — 1985. — Vol. 44. — P. 139—266.*
8. *Duffy M. J., O'Grady P., Devaney D. et al. // Cancer. — 1988. — Vol. 62. — P. 531—533.*
9. *Duffy M. J., Reilly D., O'Sullivan C. et al. // Cancer Res. — 1990. — Vol. 50. — P. 6827—6829.*
10. *Ellis V., Wun T. C., Behrendt N. et al. // J. biol. Chem. — 1990. — Vol. 265. — P. 9904—9908.*
11. *Ellis V., Behrendt N., Danu K. // Ibid. — 1991. — Vol. 266. — P. 12752—12758.*
12. *Ellis V., Pyke C., Eriksen J. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1992. — Vol. 667. — P. 13—31.*
13. *Foekens J. A., Schmitt M., van Putten W. L. J. et al. // Cancer Res. — 1992. — Vol. 52. — P. 6102—6105.*
14. *Foekens J. A., Schmitt M., van Putten W. L. J. et al. // J. clin. Oncol. — 1994. — N 12. — P. 1648—1658.*
15. *Foekens J. A., Buessecker F., Peters H. A. et al. // Cancer Res. — 1995. — Vol. 55. — P. 1423—1427.*
16. *Foekens J. A., Look M. P., Peters H. A. et al. // J. natl. Cancer Inst. — 1995. — Vol. 87. — P. 751—756. Vol. 32A, Suppl. 2. — P. 55.*
17. *Foekens J. A., Berns E. M. J. J., Look M. P. et al. // Molecular and Clinical Endocrinology (Vol. 1). / Ed. I. R. Pasqualini. Hormone Dependent Cancer / Eds J. R. Pasqualini, B. S. Katzenellenbogen. — New York, 1996. — P. 217—253.*
18. *Foekens J. A., Look M. P., Meijervan G. M. E. et al. // Eur. J. Cancer. — 1996. — Vol. 32A, Suppl. 2. — P. 55.*
19. *Grundahl-Hansen J., Christensen I. J., Rosenquist C. et al. // Cancer Res. — 1993. — Vol. 53. — P. 2513—2521.*
20. *Grundahl-Hansen J., Peters H. A., van Putten W. L. J. et al. // Clin. Cancer Res. — 1995. — N 1. — P. 1079—1087.*
21. *Graeff H., Harbeck N., Pache L. et al. // Fibrinolysis. — 1992. — N 6, Suppl. 4. — P. 45—53.*
22. *Hall S. W., Humphries J. E., Gonias S. L. // J. biol. Chem. — 1991. — Vol. 266. — P. 12329—12336.*
23. *Holst-Hansen C., Johannessen B., Hoyer-Hansen G. et al. // Clin. exp. Metastasis. — 1996. — Vol. 21. — P. 433—440.*

24. Huyer-Hansen G., Runne E., Solberg H. et al. // J. biol. Chem. — 1992. — Vol. 267. — P. 18224—18229.
25. Ichinose A., Fujikawa K., Suyama T. // Ibid. — 1986. — Vol. 261. — P. 3486—3489.
26. Jänicke F., Schmitt M., Hafter R. et al. // Fibrinolysis. — 1990. — N 4. — P. 69—78.
27. Jänicke F., Graeff H., Schmitt M. // Semin. Thromb. Hemost. — 1991. — Vol. 17. — P. 303—312.
28. Jänicke F., Schmitt M., Pache L. et al. // Breast Cancer Res. Treat. — 1993. — Vol. 24. — P. 195—208.
29. Kobayashi H., Schmitt M., Goretzki L. et al. // J. biol. Chem. — 1991. — Vol. 266. — P. 5147—5152.
30. Liotta L. A., Tryggvason K., Garbisa S. et al. // Nature. — 1980. — Vol. 284. — P. 67—68.
31. Lund L. R., Rumer J., Runne E. et al. // EMBO J. — 1991. — N 10. — P. 3399—3407.
32. Lund L. R., Runne E., Roldan A. L. et al. // J. biol. Chem. — 1991. — Vol. 266. — P. 5177—5181.
33. Lund L. R., Ellis V., Runne E. et al. // Biochem. J. — 1995. — Vol. 310. — P. 345—352.
34. Mignatti P., Rifkin D. B. // Physiol. Rev. — 1993. — Vol. 73. — P. 161—195.
35. Muller L. B. // Fibrinolysis. — 1993. — N 4. — P. 293—303.
36. Montesano R., Pepper M. S., Mohlestein U. et al. // Cell. — 1990. — Vol. 62. — P. 435—445.
37. Nielsen B. S., Sehested M., Timshel S. et al. // Lab. Invest. — 1996. — Vol. 74. — P. 168—177.
38. Okada A., Bellocq J.-P., Rouyer N. et al. // Proc. natl. Acad. Sci. USA. — 1995. — Vol. 92. — P. 2730—2734.
39. Olson D., Pöllänen J., Huyer-Hansen G. et al. // J. Biol. Chem. — 1992. — Vol. 267. — P. 9129—9133.
40. Ossowski L., Russo-Payne H., Wilson E. L. // Cancer Res. — 1991. — Vol. 51. — P. 274—281.
41. Pyke C., Kristensen P., Ralfkiaer E. et al. // Am. J. Pathol. — 1991. — Vol. 138. — P. 1059—1067.
42. Pyke C., Graem N., Ralfkiaer E. et al. // Cancer Res. — 1993. — Vol. 53. — P. 1911—1915.
43. Reilly D., Christensen L., Duch M. et al. // Int. J. Cancer. — 1992. — Vol. 50. — P. 208—214.
44. Ronne E., Behrendt N., Ploug M. et al. // J. Immunol. Methods. — 1994. — Vol. 167. — P. 91—101.
45. Runne E., Huyer-Hansen G., Brünner N. et al. // Breast Cancer Res. Treat. — 1995. — Vol. 33. — P. 199—207.
46. Ronnev-Jessen L., Petersen O. W., Kotliansky V. E. et al. // J. clin. Invest. — 1995. — Vol. 95. — P. 859—873.
47. Sappino A.-P., Skalli O., Jackson W. et al. // Int. J. Cancer. — 1988. — Vol. 41. — P. 707—712.
48. Scott R. W., Bergman B. L., Bajpai A. et al. // J. biol. Chem. — 1985. — Vol. 260. — P. 7029—7034.
49. Setyono-Han B., Klijn J. G. M., Portengen H. et al. // Proc. Am. Assoc. Cancer Res. — 1995. — Vol. 558. — P. 565.
50. Sumiyoshi K., Serizawa K., Urano T. et al. // Int. J. Cancer. — 1992. — Vol. 50. — P. 345—348.
51. Van Rosendaal C. E. P., Klijn J. G. M., Sieuwerts A. M. et al. // Fibrinolysis. — 1996. — N 10, Suppl 2. — P. 79—83.
52. Weidner N., Semple J. P., Welch W. R. et al. // N. Engl. J. Med. — 1991. — Vol. 324. — P. 1—8.
53. Weidner N., Folkman J., Pozza F. et al. // J. natl. Cancer Inst. — 1992. — Vol. 84. — P. 1875—1887.
54. Wolf C., Rouyer N., Lutz Y. et al. // Proc. natl. Acad. Sci. USA. — 1993. — Vol. 90. — P. 1843—1847.

Поступила 27.11.98 / Submitted 27.11.98