

ДИНАМИКА ТКАНЕВОЙ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛИ У САМОК МЫШЕЙ

Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М., Каплиева И.В.,
Трепитаки Л.К., Бандовкина В.А., Козлова Л.С.,
Погорелова Ю.А., Розенко Л.Я., Черярина Н.Д.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Ростов-на-Дону, Россия

Контактная информация:
Козлова Лариса Степановна
ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России
14-я линия, д.63,
Ростов-на-Дону, Россия, 344037
E-mail: super.gormon@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 10.04.2018
и принята к печати 10.05.2018.

Резюме

Хроническая боль – патологический процесс, изменяющий метаболизм всего организма. Цель: определение регуляторов плазминогена в ткани меланомы кожи и участков кожи, не связанных с опухолью, мышцей-самкой в динамике роста экспериментальной меланомы, воспроизведенной на фоне хронической нейрогенной боли. Материалы и методы. Меланома B16/F10 воспроизведена на фоне модели хронической нейрогенной боли на самках мышей C57BL/6. Определяли содержание плазмина, связанного с α -2-антиплазмином (РАР), урокиназного (pro-uPA и uPA) и тканевого (pro-tPA и tPA) активаторов плазминогена, рецептор uPA (uPAR), серпин-1 (PAI-1) методами ИФА на стандартных тест-системах. Статистика: программа Statistica 10. Результаты. При хронизации нейрогенного болевого синдрома установлены значимые изменения компонентов фибринолиза в коже самок мышей C57BL/6. После перевивки меланомы B16/F10 (1-3 недели), в коже и опухоли найдены: достоверно более высокое содержание РАР, рецептора uPAR ($p < 0,05$), достоверно пониженное содержание pro-uPA и uPA, pro-tPA и tPA, PAI-1 ($p < 0,05$), относительно данных группы сравнения (стандартная модель меланомы). Заключение. Результаты определения состояния тканевого фибринолиза в коже и опухоли самок мышей C57BL/6 свидетельствуют о том, что, при формировании опухоли на фоне хронической нейрогенной боли, плазмин, tPA, uPA, uPAR и PAI-1 играют ведущую роль в быстром росте и повышении злокачественности меланомы. Изучение предлагаемой модели позволит прояснить многие вопросы канцерогенеза и генерализации злокачественного процесса.

Ключевые слова: боль, меланома кожи, метастазирование, активаторы плазминогена, PAI-1

Для цитирования: Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Бандовкина В.А., Козлова Л.С., Погорелова Ю.А., Розенко Л.Я., Черярина Н.Д. Динамика тканевой системы регуляторов плазминогена при меланоме кожи на фоне хронической боли у самок мышей. Трансляционная медицина. 2018; 5 (2): 38–46.

DYNAMICS OF THE TISSUE SYSTEM OF PLASMINOGEN REGULATORS IN CUTANEOUS MELANOMA WITH CHRONIC PAIN IN FEMALE MICE

Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kotieva I.M., Kaplieva I.V.,
Trepitaki L.K., Bandovkina V.A., Kozlova L.S., Pogorelova Yu.A.,
Rozenko L.Ya., Cheryarina N.D.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Corresponding author:

Larisa S. Kozlova
Rostov Research Institute of Oncology
14 line, 63,
Rostov-on-Don, Russia, 344037
E-mail: super.gormon@yandex.ru

Received 10 April 2018; accepted 10 May 2018.

Abstract

Background. Chronic pain is a pathologic process changing the whole body metabolism. **Objective:** determination of plasminogen regulators in tissues of cutaneous melanoma and in the skin tissues not associated with the tumor in female mice in the dynamics of the growth of experimental melanoma with chronic neurogenic pain. **Design and methods.** B16/F10 melanoma with chronic pain was reproduced in female C57BL/6 mice. Plasmin-alpha2-antiplasmin complex (PAP), urokinase (pro-uPA and uPA) and tissue (pro-tPA and tPA) plasminogen activators, the uPA (uPAR) receptor and serpin-1 (PAI-1) were determined by ELISA using standard test systems. Results were analyzed using the Statistica 10 program. **Results.** Chronic neurogenic pain was accompanied by significant changes in the fibrinolysis components in the skin of female C57BL/6 mice. After the B16/F10 melanoma transplantation (1-3 weeks), skin and tumor tissues showed higher levels of PAP and the uPAR receptor ($p < 0.05$), decreased levels of pro-uPA and uPA, pro-tPA and tPA, and PAI-1 ($p < 0.05$), compared to the comparison group (standard melanoma model). **Conclusion.** Analysis of the state of the tissue fibrinolysis in the skin and tumors of female C57BL/6 mice demonstrated that during the tumor formation with chronic neurogenic pain, plasmin, tPA, uPA, uPAR and PAI-1 play a leading role in the rapid growth and increased malignancy of melanoma. The study of the proposed model will make it possible to clarify many questions of carcinogenesis and the generalization of the malignant process. Studying the model can clarify many issues of the carcinogenesis and progression of the malignant process.

Key words: pain, cutaneous melanoma, metastasis, plasminogen activators, PAI-1

For citation: Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kotieva I.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Bandovkina V.A., Kozlova L.S., Pogorelova Yu.A., Rozenko L.Ya., Cheryarina N.D. Dynamics of the tissue system of plasminogen regulators in cutaneous melanoma with chronic pain in female mice. Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2018; 5 (2): 38–46pages. (In Russ.)

Список сокращений:

мРНК – матричная РНК
PAI-1 – активность серпина-1 (ингибитора-1 активаторов плазминогена)
про-PAI-1 – антигенная форма серпина-1
про-tPA – профермент активатора плазминогена тканевого типа

про-uPA – профермент урокиназы
tPA – активатор плазминогена тканевого типа
uPA – активатор плазминогена урокиназного типа
uPAR – рецептор урокиназы
РАР – плазмин, связанный с α -2-антиплазмином

Введение

Хроническая боль перестраивает деятельность всех отделов центральной нервной системы, ухудшая работу афферентных путей и их корковых центров, поскольку является длительно существующим доминантным очагом возбуждения [1-5]. В основе болевого синдрома и деструктивных процессов лежит активация аутолиза, обусловленная накоплением в цитоплазме клеток лизосомальных ферментов [1,6]. Известно, что внеклеточный ферментативный каскад активаторов плазминогена регулирует пластичность нейронов и модификацию внеклеточного матрикса, а также является важным фактором долгосрочной регуляции метаболизма ЦНС [7]. Ферменты и ингибиторы каскада регуляции плазминогена, регулирующие реципрокно, непосредственно участвуют как в санации, так и разрушении межклеточного матрикса, базальной и клеточных мембран, в том числе при онкологических заболеваниях [8-10]. Образование плазмина происходит под действием активаторов плазминогена урокиназного (uPA) и тканевого (tPA) типов, с участием рецептора урокиназы uPAR, активность последних подавляется серпинами PAI-1 и PAI-2 [9,10]. Регуляторы плазминогена могут действовать аутокринно, модулируя внеклеточную протеолитическую активность после повреждения нерва [3,7], что имеет решающее значение в развитии злокачественной трансформации и миграции клеток. Пока нет ответа на вопрос: участвует ли хроническая боль в прогрессии экспериментальных опухолей. Идеальной моделью для решения этой задачи является меланома B16/F10, спонтанно возникающая у основания уха мышей линии C57BL/6. Некоторые механизмы повышения злокачественности этой меланомы, динамика ряда ферментов, задействованных в злокачественном росте, под влиянием хронической нейрогенной боли, уже были описаны [11,12], однако состояние каскада регуляции плазминогена в сравнительном аспекте с традиционной моделью еще не исследовалось.

Цель исследования: определение компонентов каскада регуляции плазминогена в ткани меланомы кожи и участков кожи, не связанных с опухолью, мышей-самок в динамике роста экспериментальной меланомы B16/F10, воспроизведенной на фоне хронической нейрогенной боли.

Материалы и методы

Работа выполнена на самках мышей линии C57BL/6 (n=64), 8-недельного возраста с начальной массой 24-26 г. Животные получены из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область)». В работе использовали клеточную линию мышины,

метастазирующей в легкие, меланомы B16/F10, полученную из РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва). Все исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Распределение животных: основная группа – 28 мышей, которым меланому B16/F10 воспроизводили после создания модели хронической боли, и контрольная группа – 7 мышей с воспроизведенной моделью хронической нейрогенной боли без перевивки опухоли (контроль). В группу сравнения (стандартная модель меланомы) вошли 22 мыши с перевивкой меланомы B16/F10 в тех же дозе и объеме, что и в основной группе, но без воспроизведения хронической боли. Результаты сравнивали с данными исследования кожи 7 самок интактных мышей (нормой). Постановка эксперимента по перевивке меланомы на фоне хронической нейрогенной боли подробно описана ранее [11,12]. При стандартной перевивке опухоль появляется в 100% случаев, достаточно быстро растёт и на 12-16 сутки роста метастазирует, преимущественно гематогенно, в легкие (60-90%), реже – в печень и селезенку [13].

В цитозольной фракции кожи и опухоли определяли содержание PAR, pro-uPA и uPA, pro-tPA и tPA, uPAR, PAI-1 методами ИФА на стандартных тест-системах. Статистика: программа Statistica 10 с определением среднего и стандартного отклонения ($M \pm m$). Различия между средними оценивались с помощью критерия суммы рангов Вилкоксона и при $p < 0,05$ считали значимыми.

Результаты

При исследовании цитозольной фракции интактной кожи (норма) у всех самок мышей установлено наличие PAR, uPAR, tPA, uPA, PAI-1 (табл. 1,2). Под влиянием нейрогенной хронической боли количество PAR увеличилось в 2,5 раза, относительно нормы; pro-uPA и uPA снизились практически до полного истощения. Количество uPAR в коже увеличилось в 1,5 раза, сравнительно с интактными животными. Уровень pro-tPA увеличился в 3,8 раза, а tPA снизился в 2,0 раза. Одновременно возрастало количество pro-PAI-1 в 1,3 раза и уменьшалось PAI-1 в 2,7 раза.

ТАБЛ. 1

К окончанию 1 недели после перевивки меланомы на фоне хронической нейрогенной боли в коже мышей основной группы возрастал уровень PAR – в 1,6 раза, pro-uPA – в 3,5 раза, uPA – в 2,0 раза (табл.

Таблица 1. Активность и содержание компонентов фибринолитической системы в коже у самок мышей с меланомой B16/F10 на фоне нейрогенной хронической боли (M±m)

Показатели	Интактные животные, кожа		1 неделя, кожа		2 недели, кожа		3 недели, кожа	
	Без боли, норма	С болью*	Группа сравнения	Основная группа*	Группа сравнения	Основная группа*	Группа сравнения	Основная группа*
РАР (нг/г тк)	10,71±0,7	27,13±2,2¹	13,91±0,8 ¹	42,87±3,5¹	19,03±1,07 ^{1,2}	21,78±1,71¹	19,91±1,4 ¹	21,97±1,72¹
uPAR (пг/г тк)	56,06±4,5	84,10±7,2¹	56,03±4,7	77,10±6,5	43,75±3,7 ¹	63,08±4,9	65,36±5,6	57,20±4,8
uPA (ед/г тк)	1,611±0,10	0,013±0,0071¹	1,202±0,07 ¹	0,020±0,0017^{1,2}	1,814±0,11	0,021±0,0016¹	2,504±0,15 ^{1,2}	0,020±0,0015¹
pro-uPA (нг/г тк)	31,72±2,1	1,147±0,09¹	164,3±9,8 ¹	4,010±0,3¹	185,4±13,9 ¹	6,961±0,58^{1,2}	187,5±13,1 ¹	6,301±0,51¹
tPA (ед/г тк)	0,603±0,05	0,337±0,02¹	1,021±0,06 ¹	0,378±0,030	0,711±0,07	0,320±0,026	0,709±0,06	0,289±0,021
pro-tPA (нг/г тк)	0,404±0,02	1,457±0,1¹	4,106±0,3	1,401±0,11	2,622±0,18 ^{1,2}	1,722±0,1^{1,2}	2,014±0,13 ^{1,2}	2,214±0,15^{1,2}
PAI-1 (ед/г тк)	24,01±0,16	8,803±0,6¹	98,51±7,4 ¹	4,460±0,35¹	83,12±5,3 ¹	5,856±0,47^{1,2}	24,06±1,4 ²	10,61±0,8^{1,2}
pro-PAI-1 (нг/г тк)	9,911±0,4	12,67±0,9¹	68,52±5,2 ¹	12,70±0,98	150,1±7,6 ^{1,2}	12,16±0,96	24,51±1,8 ^{1,2}	12,39±0,94

Примечание: ¹ – различия достоверны, относительно данных соответствующих интактных животных (p<0,05); ² – различия достоверны, относительно предыдущего срока исследования (p<0,05). * Жирным шрифтом выделены данные групп мышей с нейрогенной болью.

1), относительно контрольной группы с хронической нейрогенной болью. Содержание обеих форм tPA и уровень pro-PAI-1 не изменились, а PAI-1 уменьшился в 2,0 раза. В коже мышей группы сравнения через 1 неделю после стандартной перевивки меланомы увеличились, относительно показателей кожи интактных мышей без боли (нормы): РАР – в 1,3 раза, что было ниже, чем в основной группе в 3,1 раза; pro-uPA и PAI-1 – в 5,2 и 4,1 раза, что на порядок выше, чем в основной группе; pro-PAI-1 – в 6,9 раза, т.е. в 5,4 раза выше, чем в коже мышей основной группы. Уровень tPA возрос в 1,7 раза и оказался в 2,7 раза выше, чем у мышей основной группы, а pro-tPA увеличился на порядок, относительно нормы и был в 2,9 раза выше, чем в основной группе. Уровень uPA снизился, сравнительно с нормой в 1,3 раза, но был на два порядка выше, чем в основной группе. Количество uPAR не отличалось от значений, найденных в коже интактных мышей.

Через 2 и 3 недели после перевивки только в коже мышей группы сравнения уровень обеих форм uPA оставался высоким (табл. 1). Содержание РАР стабилизировалось примерно на одном уровне в коже всех животных; uPAR, после снижения в двухнедельный срок в группе сравнения, достиг нормы у всех животных; обе формы uPA ста-

билизировались у всех животных. tPA снизился до нормы в группе сравнения и оставался стабильно пониженным в основной группе. Содержание pro-PAI-1 еще повышалось через 2 недели в 2,2 раза и обе формы снижались в конце 3 недели: PAI-1 – до нормы, а pro-PAI-1 – в 6,1 раза, не достигая нормы.

В ткани опухоли меланомы B16/F10 мышей основной группы через 1 неделю после перевивки найдено достоверное увеличение уровня всех показателей, относительно кожи контрольных животных с хронической нейрогенной болью, только уровень растворимого uPAR снижался в 1,3 раза (табл. 2). В группе сравнения в этот срок исследования опухоли еще не регистрировались.

ТАБЛ. 2

Через 2 недели наблюдения содержание РАР в опухоли мышей основной группы превышало таковое во все сроки исследования у мышей обеих групп. Количество растворимого uPAR через 2 недели соответствовало норме в обеих группах, а через 3 недели оказалось самым высоким в опухоли, сформировавшейся на фоне хронической боли. Протеиназа накапливалась в опухолях обеих групп, но у мышей группы сравнения содержание pro-uPA было на порядок выше и через 2, и через 3 недели эксперимента. Активация pro-uPA в uPA в опухолях

мышей группы сравнения происходила интенсивнее, чем основной, более чем в 100 раз во все сроки исследования (табл. 2). Содержание обеих форм tPA было максимальным через 2 недели после перевивки опухоли в обеих группах мышей; через 3 недели наблюдали его снижение, и оно было более выражено при развитии меланомы на фоне хронической боли. Если активация pro-PAI-1 была заторможена при формировании нейрогенной боли, то после перевивки меланомы через 1 и 2 недели наблюдалось резкое увеличение количества обеих форм этого серпина у всех мышей и достоверное снижение через 3 недели, также у всех животных. Однако в опухолях мышей группы сравнения через 2 и 3 недели его количество достоверно превышало таковое в опухолях мышей основной группы.

Анализ наблюдений, полученных в ходе эксперимента, показал, что на фоне хронической боли перевивная меланома B16/F10 развивалась быстрее: опухоли появлялись раньше (через 1 неделю после перевивки), имели двухфазный рост, 100% синхронное метастазирование (на 1 неделе), помимо традиционных мишеней (легких, печени, режы – селезенки), в нетрадиционные органы – сердце и матку. У мышей группы сравнения опухоли появлялись через 2 недели, метастазы регистрировались только через 4 недели (96,3% в легкое, позже – еще 14,8% в печень и селезенку). Сроки жизни животных с меланомой на фоне хронической нейрогенной боли сокращались: средняя продолжительность жизни для мышей основной группы составляла $19,17 \pm 1,35$ дней, мышей группы сравнения – $30,25 \pm 1,67$ дня.

Обсуждение

Метаболические изменения, связанные с хроническими болевыми состояниями изучены мало. Согласно исследованиям Ru-Rong Ji et al. [14], боль стимулирует синтез и освобождение цитокинов, хемокинов, факторов роста и многих других протеиназ из глиальных клеток во внеклеточное пространство. Ранее Yamanaka H. et al. [2] обнаружили увеличение индукции мРНК для tPA и uPA в ганглиях дорзального корешка крысы после перерезки седалищного нерва. После этой манипуляции авторы фиксировали отсутствие иммунореактивности для uPA и отсутствие uPA-опосредованного протеолиза. Иммунореактивность для tPA была увеличена и, что важно, наблюдалось возрастание tPA-зависимой протеолитической активности. Kozai T et al. [4] и Yamanaka H et al. [7] сообщали об экспрессии tPA в астроцитах дорзальных рогов спинного мозга и увеличение в них протеолитической активности после повреждения периферического нерва.

Хроническая нейрогенная боль в нашем экспе-

рименте вызывала существенную перестройку метаболизма фибринолитической системы кожи самок здоровых мышей. После достижения хронизации болевого синдрома (2 недели) наблюдалось истощение обеих форм uPA, повышение содержания uPAR, накопление pro-tPA и pro-PAI-1, сопровождающиеся мощным выбросом плазмина и, как следствие, его специфического ингибитора α -2-антиплазмина с образованием прочного комплекса PAR.

Литературные сведения [2-5,7,9,10,15] и наши результаты свидетельствуют о важной роли плазмина, uPA, uPAR, tPA и PAI-1 в формировании нейропатической боли. Истощение pro-uPA и uPA в коже мышей на болевом фоне, можно объяснить их быстрой активацией с последующим гиперметилированием ее ДНК [15,16]. Wu F et al. [15] сообщали, что после повреждения нерва экспрессия uPA велика, но непродолжительна, а взаимодействие uPA с uPAR способствует не только ремоделированию тканей, но и воспалению, хемотаксису, пролиферации клеток, адгезии и миграции. Авторы доказали, что нейроны высвобождают uPA в самой ранней фазе восстановления после травмы, причем этот uPA не влияет на выживаемость нейронов, а вместе со своим рецептором способствует развитию структурных изменений в окружающей ткани.

Увеличение содержания pro-uPA и активация в uPA на болевом фоне в нашем эксперименте, скорее всего, происходили в ранние сроки после перевязки седалищного нерва, в связи с чем, через 2 недели после моделирования болевого синдрома (перед перевивкой меланомы B16/F10) мы наблюдали их истощение в коже мышей. Тем не менее, даже на фоне истощения pro-uPA и uPA, через 1 неделю после перевивки меланомы B16/F10 наблюдался достоверный прирост pro-uPA и uPA и в коже, и в опухоли (зафиксирован выход опухолей и метастазов), и сохранение его через 2 и 3 недели. Через 1 неделю после стандартной перевивки меланомы B16/F10 наблюдалось значительное накопление pro-uPA в коже мышей, относительно данных интактных животных, и отсутствие его активации в uPA, но наличие опухолей еще не регистрировалось.

Paola Merino et al. [17] проверяя гипотезу о том, что связывание uPA с uPAR способствует регенерации аксонов, установили, что экспрессия uPAR возрастает сразу после травмы аксона, а активация механизмов опосредуемой им сигнализации способствует ремоделированию ткани. В проведенном эксперименте мы также фиксировали повышенное содержание uPAR в коже после хронизации нейрогенной боли, сравнительно с кожей интактных мышей.

Таблица 2. Активность и содержание компонентов фибринолитической системы в опухоли у самок мышей с меланомой B16/F10 на фоне нейрогенной хронической боли (M±m)

Показатели	Интактные животные, кожа		1 неделя, опухоль		2 недели, опухоль		3 недели, опухоль	
	Без боли, норма	С болью*	Группа сравнения	Основная группа*	Группа сравнения	Основная группа*	Группа сравнения	Основная группа*
РАР (нг/г тк)	10,71±0,7	27,13±2,2¹	Появление опухоли еще не регистрировалось	60,77±5,02^{1,2}	36,51±1,2 ¹	75,84±6,1^{1,2}	36,43±1,8 ¹	50,93±4,01^{1,2}
uPAR (пг/г тк)	56,06±4,5	84,10±7,2¹		63,08±5,17^{1,2}	59,50±5,04	53,24±4,3²	141,8±11,7 ^{1,2}	86,09±7,2^{1,2}
uPA (ед/г тк)	1,611±0,1	0,013±0,001¹		0,033±0,002^{1,2}	2,913±0,16 ¹	0,028±0,002¹	2,822±0,16 ¹	0,027±0,002¹
Pro-uPA (нг/г тк)	31,72±2,1	1,147±0,09¹		39,35±3,17^{1,2}	354,9±20,6 ¹	54,18±4,2^{1,2}	335,5±23,2 ¹	52,49±4,1¹
tPA (ед/г тк)	0,603±0,04	0,337±0,02¹		1,083±0,09^{1,2}	2,718±0,16 ¹	0,750±0,06^{1,2}	2,234±0,13 ¹	0,867±0,06¹
Pro-tPA (нг/г тк)	0,404±0,02	1,457±0,1¹		9,90±0,08^{1,2}	14,42±1,05 ¹	10,72±0,85¹	12,33±0,9 ¹	4,789±0,13^{1,2}
PAI-1 (ед/г тк)	24,01±0,16	8,803±0,7¹		22,67±1,8²	129,1±7,7 ¹	24,23±1,9¹	71,12±4,2 ^{1,2}	10,05±0,8²
Pro-PAI-1 (нг/г тк)	9,911±0,4	12,67±0,9¹		27,78±2,2^{1,2}	161,1±9,6 ¹	23,97±1,9¹	79,53±6,3 ^{1,2}	18,01±1,5^{1,2}

Примечание: ¹ – различия достоверны, относительно данных соответствующих интактных животных (p<0,05); ² – различия достоверны, относительно предыдущего срока исследования (p<0,05). * Жирным шрифтом выделены данные групп мышей с нейрогенной хронической болью.

Roberta Mazzieri et al. [18] показали, что дефицит uPAR у мышей значительно снижает восприимчивость к классическому воспроизведению канцерогенеза в коже, т.к. uPAR способствует пролиферации клеток и образованию опухолей. У мышей группы сравнения содержание uPAR в 1 неделю не отличалось от нормы, а на 2 неделе было достоверно ниже. Небольшое повышение uPAR регистрировалось только через 3 недели после перевивки меланомы. У контрольных мышей с нейрогенной болью уровень uPAR в коже был достоверно повышен и в 1 неделю после перевивки меланомы у мышей основной группы оставался таким же, постепенно снижаясь до нормы к концу 3 недели развития опухоли. Есть данные, свидетельствующие о том, что сигнальные пути, активируемые uPAR, способствуют уходу раковых клеток от опухоли в неповрежденную ткань [19], что повышает возможности метастазирования. Мембранный uPAR, регулируя превращение плазминогена в плазмин, активирует клеточные сигнальные пути, опосредующие миграцию, адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток, причем в нейронах и их отростках uPAR диффундирует постоянно [15]. Усиление миграции и инвазии опухолевых клеток осуществляется путем реализации сигнальных пу-

тей uPAR, независимо от ингибирования uPA [19] и PAI-1 [20]. У мышей дефицит uPA может означать его антиапоптозную роль [21], что препятствует гибели клеток, в том числе опухолевых.

Основываясь на литературных данных и наших результатах, правомерно предположение о том, что при хронической нейрогенной боли и uPA, и pro-uPA, оба активно связывающиеся с uPAR на клеточной мембране, теряют свойства растворимых ферментов и не попадают в зону определения их содержания (цитозольную фракцию), сохраняя при этом биологические свойства. Мы также допускаем, что может иметь место направленный расход pro-uPA и uPA в модели хронической боли на восстановительные процессы после повреждения седалищного нерва. Уровень растворимого uPAR в жидкостях здорового организма стабилен, но при раке повышается, т.к. uPAR конкурирует с uPA за участие во многих непротеолитических биологических процессах, таких как миграция, адгезия, ангиогенез и пролиферация клеток [21]. Нельзя исключить, что при моделировании меланомы на фоне хронической нейрогенной боли повреждающие функции uPA выполняются посредством растворимого рецептора uPAR, тем более что его содержание в коже мышей возрастает в модели нейроген-

ной боли, а после перевивки сохраняется в коже и опухоли на достоверно более высоком уровне, чем в группе сравнения, где содержание uPAR возросло только через 3 недели. В эксперименте Miguel Angel Pavón et al. [20] показано, что ингибирование uPAR замедляет рост опухоли и снижает экспрессию генов, ассоциированных с метастазами, таких как MMP-2, MMP-9, VEGF-C, VEGF-D и VEGFR-3, а сам uPAR накапливается и усиливает преобразование плазминогена в плазмин.

В проведенном эксперименте содержание плазмينا в меланоме, растущей на фоне хронической боли, во все сроки исследования достоверно выше, чем при традиционной перевивке, а в коже оно выше только на 1 неделе, которая, тем не менее, оказалась решающей для формирования опухоли и ее метастазов.

Увеличение tPA играет важную роль в развитии нейропатической боли после повреждения периферического нерва [3]. Этот вывод позже подтвержден тем же коллективом [7], причем подчеркивалось, что tPA участвует в процессах изменения пластичности нейронов и метаболических нарушениях в дорсальных рогах спинного мозга в нескольких моделях боли.

В модели нейрогенной хронической боли и далее, после перевивки меланомы, pro-tPA накапливался в коже и опухоли, но его активация в tPA замедлялась. При росте меланомы на фоне нейрогенной хронической боли количество tPA в коже сохранялось на прежнем уровне, соответствуя данным контрольной группы, а pro-tPA постепенно накапливался от 1 к 3 неделе эксперимента. В опухоли активация pro-tPA в tPA осуществлялась, но менее интенсивно, чем в группе сравнения. У мышей группы сравнения в 1-2 недели исследования количество pro-tPA в коже было достоверно выше, и его активация в tPA происходила вдвое активнее. Через 3 недели количество pro-tPA в коже обеих групп мышей было практически одинаковым, а содержание tPA в коже и опухоли стабилизировалось у всех животных.

Yamanaka H. et al., [3,7], изучая динамику uPA, tPA и PAI-1 в развитии нейрогенной боли, выявили, что совместная экспрессия PAI-1 и PAI-2 с tPA и uPA в нейронах достигает пика в 1-3 день после травмы периферического нерва, а затем снижается. Авторы считают, что оба PAI могут действовать аутокринно, модулируя внеклеточную протеолитическую активность после повреждения нерва. Miguel Angel Pavón et al. [20] сообщают, что PAI-1 может действовать как «переключатель» между пролиферацией и миграцией опухолевых клеток. Авторы указывают, что PAI-1 ингибирует апоптоз, одновременно уменьшая пролиферацию опухолевых

клеток, что является необходимым условием их миграции и приобретения свойств стволовых клеток рака. Подтверждена непосредственная связь PAI-1 с эпителиально-мезенхимальным переходом и ключевая роль PAI-1 в индукции инвазивного и мигрирующего фенотипа злокачественных клеток.

Хроническая нейрогенная боль достоверно увеличивала содержание pro-PAI-1 в коже, относительно нормы, и этот уровень стабильно сохранялся в коже после перевивки меланомы с умеренной активацией в PAI-1 и увеличивался в опухоли с усилением активации. Традиционная перевивка меланомы показывала достоверно более высокое содержание pro-PAI-1 в коже и опухоли, но его активация сохранялась на повышенном уровне только на 2 неделе после перевивки, а на 3 неделе снижалась до нормы. Это позволяет предполагать различную роль PAI-1 в развитии опухоли при стандартной перевивке и на фоне хронической нейрогенной боли.

Заключение

В представленном эксперименте меланомы, воспроизведенная на фоне хронической нейрогенной боли, регистрировалась у мышей основной группы раньше, чем у группы сравнения. Мы наблюдали и ранние сроки появления, и более широкую «географию» локализации метастазов. Более высокое содержание в меланоме у мышей с нейрогенной болью плазмينا и uPAR (относительно группы сравнения) подтверждает их ведущую роль в развитии этой опухоли. Урокиназа, вероятно, уже была истощена болью (как и в эксперименте Wu F. et al. [15]) в 2-недельный срок исследования, перед перевивкой, и, несмотря на достоверный прирост, сохранила этот уровень в течение 3 недель после перевивки. Однако, относительно соответствующей контрольной группы с болью, прирост uPA в опухоли и коже в 1-3 недели после перевивки был выше, чем у мышей с традиционной меланомой, данные которых сравнивали с нормой. Учитывая динамику uPAR и PAI-1 в коже животных, велика вероятность того, что хроническая боль, еще до перевивки злокачественной меланомы, активирует в коже мышей факторы, традиционно создающие условия для роста и развития этой злокачественной опухоли. Pro-tPA болью не подавлялся, но замедлялась его активация в tPA во все сроки исследования, из чего можно заключить, что tPA-зависимый протеолиз, зафиксированный многими исследователями при нейрогенной боли, инициируется в большей степени его проферментом, к тому же, функции плазмينا различаются, в зависимости от того, где он образуется, и какой активатор этому способствует [22].

Таким образом, мы показали, что плазмин, tPA,

uPA, uPAR и PAI-1, наряду с матричными металлопротеиназами [23], а также факторами роста [12,24], играют ведущую роль в быстром росте и повышении злокачественности меланомы, развивающейся на фоне хронической нейрогенной боли. Роль PAI-1 в этом случае может заключаться в индукции мигрирующего фенотипа злокачественных клеток.

Наши экспериментальные данные не демонстрируют окончательной причинно-следственной связи между наличием хронической нейрогенной боли и быстрым развитием меланомы с немедленным метастазированием. Мы предлагаем модель, которая позволит при дальнейшем изучении найти ответы на многие вопросы, касающиеся канцерогенеза и генерализации злокачественного процесса.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Kumar A, Kaur H, Singh A. Neuropathic Pain models caused by damage to central or peripheral nervous system. *Pharmacol Rep.* 2018; 70(2): 206-216.
- Yamanaka H, Obata K, Fukuoka T., et al. Tissue plasminogen activator in primary afferents induces dorsal horn excitability and pain response after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci.* 2004; 19: 93-102.
- Yamanaka H, Obata K, Fukuoka T., et al. Induction of plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in dorsal root ganglion neurons after peripheral nerve injury. *Neuroscience.* 2005; 132:183-191.
- Kozai T, Yamanaka H, Dai Y., et al. Tissue type plasminogen activator induced in rat dorsal horn astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity following dorsal root injury. *Glia.* 2007; 55: 595-603.
- Berta T, Liu YC, Xu ZZ, Ji RR. Tissue plasminogen activator contributes to morphine tolerance and induces mechanical allodynia via astrocytic IL-1 β and ERK signaling in the spinal cord of mice. *Neuroscience.* 2013;247:376-385.
- Chlebowski RT, Col N. Bisphosphonates and breast cancer prevention. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2012; 12(2): 144-150.
- Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M., et al. Annexin A2 in primary afferents contributes to neuropathic pain associated with tissue type plasminogen activator. *Neuroscience.* 2016; 314: 189-199.
- Nishioka N, Matsuoka T, Yashiro M., et al. Plasminogen activator inhibitor 1 RNAi suppresses gastric cancer metastasis in vivo. *Cancer Sci.* 2012; 103(2): 228-232.
- Valiente M, Obenaus AC, Jin X., et al. Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell.* 2014; 156(5): 1002-1016.
- Sato M, Kawana K, Adachi K., et al. Decreased expression of the plasminogen activator inhibitor type 1 is involved in degradation of extracellular matrix surrounding cervical cancer stem cells. *Int J Oncol.* 2016; 48(2): 829-835.
- Kit OI, Frantsiyants EM, Kotieva IM., et al. Some mechanisms of increasing malignancy of B16/F10 melanoma in female mice with chronic pain. *Russian Journal of Pain.* 2017; 53 (2): 14-20. In Russian [Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М. и др. Некоторые механизмы повышения злокачественности меланомы. *Российский журнал боли.* 2017; 53 (2): 14-20].
- Kit OI, Frantsiyants EM, Kotieva IM et al. The effect of chronic pain on the dynamics of some growth factors in the intact and pathologically altered skin of female mice with B₁₆/F₁₀ melanoma. *Russian Journal of Pain.* 2017; (3-4): 37-44. In Russian [Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М. и др. Влияние хронической боли на динамику некоторых ростовых факторов в интактной и патологически измененной коже самок мышей с меланомой B₁₆/F₁₀. *Российский журнал боли.* 2017; (3-4): 37-44].
- Dingemane KP. B-16 melanoma metastasis in mouse liver and lung. *Inv. Metast.* 1985; (5): 50-60.
- Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain.* 2013;154 Suppl 1:S10-28.
- Wu F, Catano M, Echeverry R, et al. Urokinase-type plasminogen activator promotes dendritic spine recovery and improves neurological outcome following ischemic stroke. *J Neurosci.* 2014;34(43):14219-14232.
- Mahmood N, Mihalcioiu C, Rabbani SA. Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front Oncol.* 2018;8:24.
- Merino P, Diaz A, Jeanneret V, et al. Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) Binding to the uPA Receptor (uPAR) Promotes Axonal Regeneration in the Central Nervous System. *J Biol Chem.* 2017;292(7):2741-2753.
- Mazzieri R, Pietrogrande G, Gerasi L, et al. Urokinase Receptor Promotes Skin Tumor Formation by Preventing Epithelial Cell Activation of Notch1. *Cancer Res.* 2015; 75(22):4895-4909.
- Gonias SL, Hu J. Urokinase receptor and resistance to targeted anticancer agents. *Front Pharmacol.* 2015; (6): 154.
- Pavón MA, Arroyo-Solera I, Céspedes MV, et al. uPA/uPAR and SERPINE1 in head and neck cancer: role in tumor resistance, metastasis, prognosis and therapy. *Onco-target.* 2016;7(35):57351-57366.
- Chen JS, Chang LC, Wu CZ, et al. Significance of the urokinase-type plasminogen activator and its receptor in the progression of focal segmental glomerulosclerosis in clinical and mouse models. *J Biomed Sci.* 2016; 23: 24.
- Schuliga M. The inflammatory actions of coagulant and fibrinolytic proteases in disease. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 437695.
- Santibanez JF, Obradović H, Kukolj T, Krstić J. Transforming growth factor- β , matrix metalloproteinases, and urokinase-type plasminogen activator interaction in the cancer epithelial to mesenchymal transition. *Dev Dyn.* 2018; 247(3): 382-395.
- Santibanez JF. Transforming growth factor-Beta and urokinase-type plasminogen activator: dangerous partners in tumorigenesis-implications in skin cancer. *ISRN Dermatol.* 2013; 2013: 597927.

Информация об авторах:

Кит Олег Иванович, член-корр. РАН, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, генеральный директор, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Франциянц Елена Михайловна, д.б.н., профессор, зам. генерального директора РНИОИ по науке, рук. «Лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей», ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Котиева Инга Мавликиевна, к.м.н., старший научный сотрудник, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Каплиева Ирина Викторовна, к.м.н., старший научный сотрудник, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Трепитаки Лидия Константиновна, научный сотрудник, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Бандовкина Валерия Ахтямовна, к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Козлова Лариса Степановна, к.б.н., доцент, старший научный сотрудник, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Погорелова Юлия Александровна, к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Розенко Людмила Яковлевна, д.м.н., проф., главный научный сотрудник, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Черярина Наталья Дмитриевна, врач-лаборант, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Author information:

Oleg I. Kit, corresponding member of RAS, Dr.Sci., professor, honored doctor of the Russian Federation, general director, Rostov Research Institute of Oncology;

Elena M. Frantsiyants, Dr.Sci., professor, deputy general director for science, head of laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology;

Inga M. Kotieva, PhD, senior researcher, Rostov Research Institute of Oncology;

Irina V. Kaplieva, PhD, senior researcher, Rostov Research Institute of Oncology;

Lidia K. Trepitaki, researcher, Rostov Research Institute of Oncology;

Valeria A. Bandovkina, PhD, senior researcher, Rostov Research Institute of Oncology;

Larisa S. Kozlova, PhD, Associate Professor, senior researcher, Rostov Research Institute of Oncology;

Yulia A. Pogorelova, PhD, senior researcher, Rostov Research Institute of Oncology;

Lyudmila Ya. Rozenko, Dr.Sci., professor, chief researcher, Rostov Research Institute of Oncology;

Natalia D. Cheryarina, laboratory doctor, Rostov Research Institute of Oncology.