

*О.И. Кит, Е.М. Франциянц, И.В. Каплиева, Е.И. Сурикова, И.В. Нескубина,
В.А. Бандовкина, Л.К. Тренички, Н.Д. Черярина, Л.А. Немайкалова, Ю.С. Сидоренко*

Динамика факторов ангиогенеза у мышей линии C57BL/6-Plautm1.1Bug-This Plau6FDhu/GFDhu при меланоме, развивающейся на фоне хронической нейрогенной боли

ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону

Важным аспектом роста меланомы является васкуляризация опухоли. Система урокиназы и ее рецептора (uPA/uPAR) играет важную роль при метастазировании опухоли, что делает ее привлекательной терапевтической мишенью.

Цель. Изучить динамику уровня ангиогенных факторов роста у самцов и самок мышей линии с нокаутом по гену урокиназы u-PA (линия C57BL/6-Plautm1.1Bug-This Plau6FDhu/GFDhu) в процессе роста экспериментальной меланомы B16/F10, развивающейся на фоне хронической нейрогенной боли (ХНБ).

Материалы и методы. В первую группу вошли мыши линии C57BL/6 обоего пола, n=75. Во вторую группу — мыши линии C57BL/6-Plautm1.1Bug-This Plau6FDhu/GFDhu (нокаут по гену uPA), n=46. ИФА методами определяли концентрацию VEGF-A, VEGF-C, sVEGF-R1, sVEGF-R3 (CUSABIO BIOTECH Co.,Ltd., Китай).

Результаты. У мышей обоего пола линии с нокаутом гена uPA при меланоме на фоне хронической нейрогенной боли (ХНБ) продолжительность жизни не отличалась от продолжительности жизни у животных с нормальным геномом, удлинялся срок выхода опухоли — в среднем в 2,6 раза, объем первичной опухоли был в среднем в 2,2 раза больше у мышей обоего пола линии с нокаутом. При росте экспериментальной меланомы B16/F10 на фоне ХНБ у самцов и самок мышей линии с нокаутом гена uPA концентрация факторов ангиогенеза в образцах кожи и опухоли были ниже, чем у животных без нокаута.

Заключение. Нокаут по урокиназе ингибирует VEGF у самцов, но не у самок, а ХНБ стимулирует образование этого фактора у нокаутированных животных обоего пола, что подтверждает включение не зависящего от урокиназы пути активации ангиогенеза под влиянием ХНБ.

Ключевые слова: мыши, нокаут по uPA, меланома B16/F10, хроническая нейрогенная боль, факторы ангиогенеза; кожа, опухоль

Введение

Меланома кожи является одним из наиболее иммуногенных раковых заболеваний с гетерогенными гистологическими и клиническими признаками и значительным числом мутаций, что объясняет низкий уровень регрессии опухоли, множественную лекарственную устойчивость к таргетной терапии и снижение выживаемости [1, 2]. Агрессивность меланомы может быть объяснена способностью клеток меланомы избегать апоптоза путем избыточной экспрессии генов, ингибирующих апоптоз, или снижением экспрессии генов, стимулирующих апоптоз, что приводит к недостаточности последнего и повышенному риску прогрессирования и метастазирования [3]. Чтобы иметь четкое представление о возникновении, прогрессировании и метастазировании меланомы, необходимо иметь базовые знания об этих стадиях процессов и основных вовлеченных механизмах.

Важным аспектом, который следует иметь в виду, является васкуляризация опухоли. До тех пор, пока опухоль не достигнет размера 2–3 мм, поступление питательных веществ происходит естественным образом путем пассивной диффузии. После того, как опухоль становится больше 2–3 мм, начинается процесс ангиогенеза — образование новых кровеносных сосудов для удовлетворения потребностей клеток меланомы. Как только опухоль полностью васкуляризируется, масса опухоли увеличивается [2].

Модели на мышах, применяемые для изучения меланомы, имеют долгую историю и обладают рядом преимуществ по сравнению с другими моделями на животных, такими как: соответствующие известные данные, касающиеся генетического фона, которые допускают возможность генетического манипулирования; легкое разведение и обработка; возможность исследования молекулярных путей; создание персонализированной антимеланомной терапии [1, 4, 5]. Генно-инженерные модели были выполнены с использованием различных подходов, таких как: генетическое манипулирование эктопической экспрессией онкогенов, инактивация

генов-супрессоров опухолей и введение различных мутаций [6].

Система урокиназы и ее рецептора (система uPA/uPAR) играет важную роль в онкогенезе, что делает ее привлекательной терапевтической мишенью при раке [7]. Митогенными факторами, высвобождаемыми из соединительнотканного матрикса в результате активации плазминогена урокиназой, являются различные факторы роста [8].

В предыдущих исследованиях нами было показано, что хроническая нейрогенная боль меняет течение злокачественной меланомы у мышей линии C57BL/6, при этом имела место существенная перестройка метаболизма как фибринолитической системы, так и систем факторов ангиогенеза [9-11].

Цель: изучить динамику уровня факторов роста у самцов и самок мышей линии с нокаутом гена u-PA (линия C57BL/6-Plautm1.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu) в процессе роста экспериментальной меланомы B16/F10, развивающейся на фоне хронической нейрогенной боли.

Материалы и методы

В экспериментальном исследовании была использована 121 мышь. Животных содержали при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Исследование было проведено в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики».

В первую группу были включены мыши линии C57BL/6 обоего пола, всего 75 животных с начальной массой 21-23 г, полученные из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА» (Московская область).

Во вторую группу были включены мыши линии C57BL/6-Plautm1.IBug — ThisPlauGFDhu/GFDhu (нокаут по гену uPA) обоего пола, всего 46 животных с начальной массой самок — 24-26 г, самцов — 31-33 г, полученные из питомника лабораторных животных «Пушино» Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (Пушино, Московская область). Животные-мутанты могут использоваться в исследованиях хронического воспаления ткани, механизмов фибринолиза, онкогенеза и роста сосудов в опухоли и ткани.

Модель ХНБ создавали путем двусторонней перевязки седалищных нервов [9]. Модель роста меланомы B16/F10 на фоне ХНБ создавали путем стандартной подкожной перевивки одновременно всем животным основных подгрупп суспензии опухолевых клеток через 2 недели после лигирования седалищных нервов [9]. Использовали клеточную линию мышиной меланомы B16/F10, полученную из ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ (Москва).

Всем мышам меланому перевивали в объеме по 0,5 мл суспензии клеток в разведении 1:10 в физиологическом растворе. Животных декапитуировали через 3 недели после перевивки. Опухоль, перифокальную зону и кожу выделяли на льду. Из тканей получали 10% цитозольные фракции, приготовленные на 0,1М калий-фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 0,1% Твин-20 и 1% БСА, в которых ИФА методами определяли концентрацию VEGF-A, VEGF-C,

sVEGF-R1, sVEGF-R3 (CUSABIO BIOTECH Co.,Ltd., Китай).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0. Данные представлены в виде среднего значения±стандартная ошибка среднего. Соответствие распределения нормальному оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Значимость различий между независимыми выборками оценивали с помощью критерия Манна-Уитни, между зависимыми — с помощью критерия Вилкоксона. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Найдено, что рост меланомы, воспроизведенной на фоне ХНБ, у мышей линии C57BL/6-Plautm1.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu характеризовался иным течением, чем у животных линии C57BL/6. Так у самцов линии с нокаутом средняя продолжительность жизни составила $23,3 \pm 3,2$ дня, срок выхода опухоли — $11,7 \pm 0,7$ дней. Средний объем опухоли на 3 неделе канцерогенеза был $5,8 \pm 0,8$ см³. Метастазы регистрировали в легких и печени, отмечались кровоизлияния в лёгких, инволюция тимуса. У самок этой линии средняя продолжительность жизни составила $21,3 \pm 2,2$ день, срок выхода опухоли — $11,7 \pm 0,7$ дней. Средний объем опухоли на 3 неделе канцерогенеза был $5,8 \pm 0,6$ см³. В лёгких регистрировали множественные метастазы и кровоизлияния.

У самцов линии C57BL/6 с меланомой на фоне ХНБ средняя продолжительность жизни составила $17,2 \pm 0,8$ дней, срок выхода опухоли — $4,0 \pm 0,0$ дня. Средний объем опухоли на 3 неделе канцерогенеза был $3,0 \pm 0,6$ см³. Меланома метастазировала в легкие и селезенку, кровоизлияний не было. У самок этой линии средняя продолжительность жизни составила $19,2 \pm 1,4$ дней, срок выхода опухоли — $5,3 \pm 0,2$ дня. Средний объем первичной опухоли на 3 неделе канцерогенеза был $2,5 \pm 0,5$ см³. Меланома метастазировала в легкие, печень, сердце, матку.

Таким образом, у мышей обоего пола с нокаутом гена uPA при росте меланомы на фоне ХНБ продолжительность жизни статистически значимо не отличалась от значений у животных с нормальным геномом. Вместе с тем, при uPA-дефиците удлинялся срок выхода опухоли — в среднем в 2,6 раза и у самок, и у самцов-нокаутов, объем первичной опухоли у мышей обоего пола линии с нокаутом был в среднем в 2,2 раза больше, чем у мышей линии C57BL/6.

Результаты исследования концентрации факторов ангиогенеза в экспериментальных группах мышей линий C57BL/6 и C57BL/6-Plautm1.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu при росте меланомы B16/F10 на фоне ХНБ представлены в табл. 1, 2.

Найдено, что под влиянием ХНБ в интактной коже мышей обоего пола линии C57BL/6

обнаружено значительное увеличение факторов ангиогенеза по сравнению с показателями у интактных животных этой же линии (табл. 1). Так уровень VEGF-A и VEGF-C увеличился у самцов в среднем в 3,2 раза, у самок — VEGF-A вырос в 2,7 раза, VEGF-C — в 6,1 раза. При этом обнаружено разнонаправленное изменение концентрации растворимых форм рецепторов VEGF: у самцов уровень sVEGF-R1 вырос в 3,6 раза, а уровень sVEGF-R3 снизился в 8,0 раз, у самок уровень sVEGF-R1 вырос в 2,7 раза, а уровень sVEGF-R3 снизился в 8,0 раза. В целом изменения были однонаправленными, хотя различались количественно.

После перевивки меланомы B16/F10 на фоне ХНБ в непораженной опухолью коже самцов первой группы уровень VEGF-A и VEGF-C был значимо выше — на 37,2% и в 4,8 раза по сравнению с уровнем в контрольной группе, при этом концентрация sVEGF-R1 была ниже в 3,0 раза, а sVEGF-R3 выше в 1,7 раза. В непораженной опухолью коже самок мышей первой группы было выявлено только значимое изменение концентрации VEGF-A в 12,3 раза и sVEGF-R1 в 1,4 раза по сравнению с уровнем в соответствующем контроле (табл. 1). В перифокальной зоне меланомы у самцов концентрации всех изученных факторов роста статистически значимо возрастали по сравнению с уровнем соответствующего контроля. Максимальное увеличение отмечено для VEGF-A и sVEGF-R1 — в 13,8 и в 59,7 раза соответственно. Значительно вырос уровень VEGF-C — в 5,0 раз, а sVEGF-R3 — в 2,0 раза. У самок первой группы в перифокальной зоне опухоли уровень практически всех изученных факторов роста был максимально увеличен по сравнению с уровнем в непораженной коже: VEGF-A и sVEGF-R1 в 5,4 и 4,1 раза соответственно, VEGF-C и sVEGF-R3 в 6,9 и 1,8 раза соответственно.

В ткани меланомы самцов первой группы концентрация всех изученных факторов роста была ниже, чем в перифокальной зоне опухоли: VEGF-A — в 2,1 раза, а sVEGF-R1 — в 89,6 раза, VEGF-C — в 6,6 раза, sVEGF-R3 — в 2,7 раза. При этом оказалось, что концентрация VEGF-C, sVEGF-R1 и sVEGF-R3 в ткани опухоли была на уровне значений в непораженной опухолью коже мышей-самцов, в то время как в опухоли VEGF-A был в 6,7 раза выше. В ткани меланомы самок мышей первой группы, как и у самцов, концентрация всех факторов роста была ниже, чем в перифокальной зоне. При этом уровень VEGF-A, sVEGF-R1 и VEGF-C был выше в 5,2, 1,8 и в 2,1 раза соответственно, чем уровень в непораженной опухолью коже.

У мышей-самцов, нокаутированных по u-PA (вторая группа), найдено, что в интактной коже

концентрация VEGF-A, sVEGF-R1 и sVEGF-R3 была снижена по сравнению с соответствующим уровнем у самцов линии C57BL/6 в 4,4 раза, 2,9 раза и 10,1 раза соответственно (табл. 2). При этом выявлен значительно более высокий уровень VEGF-C — в 4,3 раза выше уровня в группе интактных животных линии C57BL/6. У интактных самок мышей, нокаутированных по u-PA, был найден более высокий уровень VEGF-C — в 23,8 раза, чем в коже интактных самок первой группы, и более низкий уровень sVEGF-R1, sVEGF-R3 — в 1,7 раза и 4,5 раза ниже, чем у интактных самок (табл. 2). Эти изменения были аналогичны по направленности динамике показателей в группе мышей самцов с нокаутом. Однако, в отличие от них, в коже самок мышей с нокаутом наблюдался более высокий уровень VEGF-A — в 1,8 раза по сравнению с уровнем в группе интактных самок без нокаута. Обращает внимание, что уровень некоторых факторов роста в коже интактных самок и самцов линии с нокаутом по u-PA был различен: в коже самок мышей концентрация VEGF-A, VEGF-C была выше в 6,4 раза и 5,8 раза соответственно.

В коже мышей-самцов второй группы ХНБ вызывала изменения в целом аналогичные по направленности тем, которые наблюдались у самцов линии C57BL/6, но менее выраженные: по сравнению с уровнем у интактных животных-нокаутов была увеличена концентрация VEGF-A в 2,1 раза, VEGF-C в 4,1 раза. Обращает на себя внимание противоположная (в отличие от животных с ХНБ линии C57BL/6) динамика концентрации sVEGF-R3 — увеличение в 1,7 раза по сравнению с уровнем соответствующих интактных животных (табл. 2). Состояние ХНБ оказывало иное воздействие на динамику изученных показателей в коже самок мышей второй группы по сравнению с самками линии без нокаута: концентрация факторов семейства VEGF и их рецепторов значимо не изменялась относительно показателей в группе интактных самок мышей (табл. 2).

При развитии меланомы на фоне ХНБ у самцов мышей-нокаутов в непораженной опухолью коже статистически значимо по сравнению с уровнем в контрольной группе изменялась концентрация только VEGF-A — увеличение в 2,2 раза, а также sVEGF-R3 — снижение в 3,5 раза. При росте меланомы на фоне ХНБ у самок мышей с нокаутом, в отличие от показателей у самок первой группы, в непораженной опухолью коже было выявлено значимое увеличение концентрации VEGF-A — в 1,4 раза по сравнению с уровнем в контрольной группе. Уровень VEGF-C был ниже в 3,1 раза, чем в контрольной группе.

Таблица 1. Концентрация факторов роста в тканях мышей линии C57BL/6 при росте меланомы B16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли

Показатели	Кожа интактных мышей	Кожа мышей с ХНБ (конт-рольная гр.) Непоражен-ная кожа	Мыши с меланомой B16/F10 на фоне ХНБ		
			Перифокальная зона опухоли	Опухоль	
мыши-самцы					
VEGF-A (пг/г тк)	209,1±15,1	635,1±42,3 ¹	871,5±54,6 ^{1,2}	12059,6±987,1 ³	5872,4±569,3 ^{3,4}
VEGF-R1 (нг/г тк)	1,5±0,1	5,4±0,3 ¹	1,8±0,2 ²	107,5±9,9 ³	1,2±0,4 ⁴
VEGF-C (пг/г тк)	6,5±1,3	22,4±2,1 ¹	107,1±12,6 ^{1,2}	535,7±41,4 ³	80,6±2,9 ⁴
VEGF-R3 (нг/г тк)	15,2±1,4	1,9±0,2 ¹	3,3±0,1 ^{1,2}	6,5±0,7 ³	2,4±0,4 ⁴
мыши-самки					
VEGF-A (пг/г тк)	169,4±8,3	452,6±41,3 ¹	5549,5±497,5 ^{1,2}	10365,4±1231,4 ³	10637,5±789,6 ³
sVEGF-R1 (нг/г тк)	0,95±0,1	2,7±0,3 ¹	3,7±0,4 ^{1,2}	15,2±1,5 ³	6,7±0,8 ^{3,4}
VEGF-C (пг/г тк)	6,8±0,5	41,5±4,2 ¹	43,4±3,4 ¹	298,5±22,7 ³	90,5±7,8 ^{3,4}
sVEGF-R3 (нг/г тк)	6,7±0,6	1,1±0,13 ¹	1,2±0,15 ¹	2,1±0,2 ³	1,1±0,2 ⁴

Примечание. Статистически значимые различия по сравнению с показателями: 1 — в коже интактных животных; 2 — в контрольной группе (с хронической болью); 3 — в неповрежденной коже; 4 — в перифокальной зоне опухоли

Таблица 2. Концентрация факторов роста в тканях мышей линии C57DI/6-Plautml.IBug-This Plau6FDhu/GFDhu при росте меланомы B16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли

Показатели	Кожа интактных мышей	Кожа мышей с ХНБ (конт-рольная гр.)	Мыши с меланомой B16/F10 на фоне ХНБ		
			Непоражен-ная кожа	Перифокальная зона опухоли	Опухоль
мыши-самцы					
VEGF-A (пг/г тк)	47,8±3,6 ^N	98,2±7,9 ¹	230,1±27,3 ^{1,2}	721,3±68,7 ³	4041,3±554,1 ^{3,4}
VEGF-R1 (нг/г тк)	0,51±0,03 ^N	0,7±0,05	0,6±0,1	1,1±0,1 ³	0,4±0,03 ⁴
VEGF-C (пг/г тк)	27,9±1,9 ^N	115,1±17,2 ¹	136,6±15,4 ¹	130,8±12,3	33,0±4,1 ^{3,4}
VEGF-R3 (нг/г тк)	1,5±0,1 ^N	2,5±0,4 ¹	0,8±0,1 ^{1,2}	1,3±0,2 ³	0,9±0,1
мыши-самки					
VEGF-A (пг/г тк)	304,2±28,3 ^N	287,7±31,2	406,8±38,1 ²	8764,4±782,3 ³	3855,4±412,3 ^{3,4}
sVEGF-R1 (нг/г тк)	0,55±0,07 ^N	0,6±0,05	0,4±0,02 ²	1,2±0,1 ³	0,6±0,04 ⁴
VEGF-C (пг/г тк)	162,2±13,9 ^N	166,6±15,6	54,1±6,6 ^{1,2}	105,6±9,8 ³	21,1±2,3 ^{3,4}
sVEGF-R3 (нг/г тк)	1,5±0,09 ^N	1,5±0,2	0,9±0,04 ¹	0,7±0,05	0,7±0,04

Примечание. Статистически значимые различия по сравнению с показателями: 1 — в коже интактных животных; 2 — в контрольной группе (с хронической болью); 3 — в неповрежденной коже; 4 — в перифокальной зоне опухоли; N — в коже интактных мышей линии C57BL/6

В перифокальной зоне опухоли самцов второй группы наблюдали увеличение концентрации VEGF-A в 3,1 раза, sVEGF-R1 и sVEGF-R3 на 83,3% и 62,5% соответственно. Обнаруженные изменения были значительно менее выражены, чем у самцов линии C57BL/6. В перифокальной зоне опухоли самок второй группы обнаружен более высокий уровень VEGF-A и sVEGF-R1 — в 21,5 и 3,0 раза соответственно, VEGF-C — в 2,0 раза по сравнению с уровнем в неповрежденной коже. Значимого изменения sVEGF-R3 не выявлено в отличие от показателей в группе самок без нокаута.

В ткани меланомы самцов-нокаутов уровень изученных факторов роста был ниже, чем в перифокальной зоне опухоли (как и у самцов линии C57BL/6): VEGF-C в 4,0 раза, sVEGF-R1 в 2,8 раза, а VEGF-A — выше в 5,6 раза. При этом по сравнению с уровнем в неповрежденной опухоли коже концентрация VEGF-A была выше в 17,6 раза, а концентрация остальных факторов роста — ниже от 3,3 до 5,4 раз. В ткани опухоли самок-нокаутов уровень большинства изученных факторов был значимо ниже, чем в перифокальной зоне, как и у самок мышей линии C57BL/6: VEGF-C — в 5,0 раз, уровень

VEGF-A и sVEGF-R1 был ниже в среднем в 2,2 раза. При этом по сравнению с уровнем в неповрежденной коже концентрация VEGF-A в ткани меланомы была в 9,5 раз выше, а VEGF-C в 2,6 раза ниже.

Таким образом, очевидно, что при росте экспериментальной меланомы B16/F10 на фоне ХНБ у самцов и самок мышей с нокаутом по гену u-PA концентрация изученных факторов ангиогенеза в образцах кожи и опухоли значительно отличалась от соответствующего уровня в образцах у мышей линии C57BL/6: абсолютные значения большинства факторов были ниже, чем у животных без нокаута.

Обсуждение

В отличие от большинства сериновых протеаз млекопитающих, урокиназа имеет, по-видимому, ограниченную специфичность к субстрату, единственным идентифицированным биологическим субстратом является проэнзим плазминоген, который урокиназа превращает в активную сериновую протеазу плазмин. Однако, имеются данные, свидетельствующие о том, что uPA может расщеплять белки, отличные от плазминогена, такие как фибронектин, интегрин, фактор роста гепатоцитов (HGF), рецептор активатора плазминогена урокиназы (uPAR) и сам uPA [12, 13]. Несколько исследований с использованием различных животных моделей показали, что uPA участвует в развитии раковой инвазии и метастазирования, т.к. введение антител к uPA, синтетических низкомолекулярных ингибиторов сериновых протеаз или небольших интерферирующих РНК против uPA снижало прогрессирование рака [14, 15].

Было показано, что система активатора плазминогена урокиназного типа, состоящая из активатора плазминогена урокиназного типа (uPA), его клеточного рецептора uPAR и его ингибитора PAI-1, участвует в реализации VEGF-индуцированных процессов [16]. Факторы роста эндотелия сосудов семейства VEGF являются центральными звеньями гемангио- и лимфангиогенеза, в том числе и в опухоли [17].

В настоящем исследовании установлен более высокий уровень VEGF-A и VEGF-C в коже интактных самок мышей линии C57DI/6-PlautmI.IBug-This Plau6FDhu/GFDhu по сравнению с показателями в коже интактных самок линии C57BL/6, что свидетельствует о функционировании uPA-независимых путей протеолитической активации факторов ангиогенеза. Практически аналогичная картина отмечалась в коже самок мышей линии C57BL/6 с воспроизведенной ХНБ (контрольная группа). Данные о значительном снижении концентрации uPA в коже самок линии C57BL/6 в состоянии ХНБ, свидетель-

ствуют об ингибирующем эффекте хронической боли на уровень урокиназы и uPA-зависимый протеолиз [11]. В коже интактных самцов линии C57DI/6-PlautmI.IBug-This Plau6FDhu/GFDhu как и у самок с нокаутом наблюдалась более высокая концентрация VEGF-C и более низкая sVEGF-R1 и sVEGF-R3, но в отличие от самок уровень VEGF-A у самцов с нокаутом был более низкий по сравнению с уровнем у самцов линии C57BL/6. При этом абсолютные значения концентрации VEGF-A и VEGF-C в коже интактных самцов-нокауты были меньше, чем у самок с нокаутом. Можно предположить, что у самцов uPA-независимые пути протеолитической активации факторов ангиогенеза функционируют менее активно, чем у самок. Видимо поэтому состояние ХНБ у самцов с нокаутом по uPA оказывает более значимое влияние на изменение уровня изученных факторов роста (в отличие от самок).

Обращает на себя внимание то, что несмотря на «полноценность» меланомы по uPA у самок мышей обеих линий, уровень почти всех факторов роста в опухоли у самок-нокауты был ниже, чем в опухоли у самок без дефицита по uPA. В целом аналогичную картину мы наблюдали и у самцов мышей. Это наблюдение подтверждает предположение о том, что состояние фибринолитической системы организма-хозяина и функционирование uPA-независимых протеолитических путей активации факторов роста могут влиять на рост и инвазию опухоли [18].

Заключение

Хроническая нейрогенная боль вызывает подавление активности урокиназы у мышей линии C57DI/6, при этом происходит стимуляция ангиогенеза в интактной и патологически измененной коже животных. Это свидетельствует о включении не зависящего от урокиназы пути активации ангиогенеза. Нокаут по урокиназе ингибирует VEGF у самцов, но не у самок, а хроническая нейрогенная боль стимулирует образование этого фактора у животных-нокауты обоого пола, что подтверждает включение не зависящего от урокиназы пути активации ангиогенеза под влиянием ХНБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bourneuf E. The MeLiM Minipig: An Original Spontaneous Model to Explore Cutaneous Melanoma Genetic Basis. *Front. Genet.* 2017;8:146. doi: 10.3389/fgene.2017.00146.
2. Naves L.B., Dhand C., Venugopal J.R., Rajamani L., Ramakrishna S., Almeida L. Nanotechnology for the treatment of melanoma skin cancer. *Prog. Biomater.* 2017;6:13–26. doi: 10.1007/s40204-017-0064-z.

3. Rigon R.B., Oyafuso M.H., Fujimura A.T. et al. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Melanoma Antitumoral Therapy: A Review. *Biomed. Res. Int.* 2015;841817. doi: 10.1155/2015/841817.
4. Hartsough E.J., Aplin A.E. Of mice and melanoma: PDX System for modeling personalized medicine. *Clin. Cancer Res.* 2016;22:1550–1552. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-3054.
5. Coricovac D., Dehelean C., Moaca E.A. et al. Cutaneous Melanoma-A Long Road from Experimental Models to Clinical Outcome: A Review. *International journal of molecular sciences.* 2018;19(6), 1566. doi:10.3390/ijms19061566.
6. Becker J.C., Houben R., Schrama D. et al. Mouse models for melanoma: A personal perspective. *Exp. Dermatol.* 2010;19:157–164. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00986.x.
7. Su S.C., Lin C.W., Yang W.E. et al. The urokinase-type plasminogen activator (uPA) system as a biomarker and therapeutic target in human malignancies. *Expert Opin Ther Targets.* 2016;20(5):551-566. <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.2016.1113260>.
8. Ulisse S., Baldini E., Sorrenti S., D'Armiento M. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2009;9(1):32–71. <http://dx.doi.org/10.2174/156800909787314002>.
9. Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М. и др. Некоторые механизмы повышения злокачественности меланомы на фоне хронической боли у самок мышей. *Российский журнал боли.* 2017;2(53):14-20. [Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kotieva I.M. et al. Some mechanisms of increasing malignancy of B16/F10 melanoma in female mice with chronic pain. *Russian Journal of Pain.* 2017;2(53):14-20. (In Russ)].
10. Кит О.И., Котиева И.М., Франциянц Е.М. и др. Влияние хронической нейропатической боли на течение злокачественного процесса меланомы B16/F10 у самцов мышей. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки.* 2019;1(201):106-111. [Kit O.I., Kotieva I.M., Frantsiyants E.M. et al. Influence of chronic neuropathic pain on the course of malignant B16/F10 melanoma in male mice. *University news. North-Caucasian region. Natural sciences series.* 2019;1(201):106-111. (In Russ)].
11. Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М. и др. Динамика тканевой системы регуляторов плазминогена при меланоме кожи на фоне хронической боли у самок мышей. *Трансляционная медицина.* 2018;5(2):38-46. [Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kotieva I.M. et al. Dynamics of the tissue system of plasminogen regulators in cutaneous melanoma with chronic pain in female mice. *Translational medicine.* 2018;5(2):38-46. (In Russ)].
12. Schmitt M., Mengele K., Napieralski R. et al. Clinical utility of level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010;10:1051–1067. doi: 10.1586/erm.10.71.
13. Duffy M.J., McGowan P.M., Harbeck N. et al. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast cancer research.* 2014;16(4):428. doi:10.1186/s13058-014-0428-4.
14. Duffy M.J. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr. Pharm. Des.* 2004;10(1):39–49. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612043453559>.
15. Schmitt M., Harbeck N., Brünner N. et al. Cancer therapy trials employing level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011;11:617–634. doi: 10.1586/erm.11.47.
16. Breuss J.M., Uhrin P. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell Adh. Migr.* 2012;6(6):535-540. <https://dx.doi.org/10.4161%2Fcam.22243>.
17. Чехонин В.П., Шейн С.А., Корчагина А.А., Гурина О.И. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2012;67(2):23-34. <https://doi.org/10.15690/vramn.v67i2.119>. [Chekhonin V.P., Shein S.A., Korchagina A.A., Gurina O.I. VEGF in neoplastic angiogenesis. *Annals of the Russian academy of medical sciences.* 2012;67(2):23-34. <https://doi.org/10.15690/vramn.v67i2.119> (In Russ.)].
18. Gutierrez L.S., Schulman A., Brito-Robinson T. et al. Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res.* 2000;60(20):5839–5847.

Поступила в редакцию 05.06.2019 г.

*O.I. Kit, E.M. Frantsiyants, I.V. Kaplieva,
E.I. Surikova, I.V. Neskubina, V.A. Bandovkina,
L.K. Trepitaki, N.D. Cheryarina, L.A. Nemashkalova,
Yu.S. Sidorenko*

The dynamic of angiogenesis factors in C57BL/6-Plautm1.IBug-This Plau6FDhu/GFDhu mice at chronic neurogenic pain and growth of the melanoma

National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don

Tumor vascularisation is an important aspect of melanoma growth. The system of urokinase and its receptor (uPA/uPAR system) plays an important role in tumor metastasis which makes it an attractive therapeutic target. Our purpose was to study the dynamics of angiogenic growth factors in male and female uPA gene-knockout mice (C57BL/6-Plautm1.IBug-This Plau6FDhu/GFDhu strain) during the growth of experimental B16/F10 melanoma developing in animals with chronic neurogenic pain (CNP).

Material and methods. Group 1 included C57BL/6 mice of both genders, n=75; group 2 — C57BL/6-Plautm1.IBug-This Plau6FDhu/GFDhu mice (uPA gene knockout), n=46. Levels of VEGF-A, VEGF-C, sVEGF-R1, and sVEGF-R3 were determined by ELISA (CUSABIO BIOTECH Co.,Ltd., China).

Results. uPA gene-knockout mice of both genders with melanoma and CNP showed survival similar to animals with a normal genome; however, the period to tumor onset was longer in such animals (by 2.6 times on average), and the volume of primary tumors was on average 2.2 times higher. The concentration of angiogenesis factors in skin and tumor samples was lower in male and female uPA gene-knockout mice with experimental B16/F10 melanoma and CNP, compared to animals without the knockout.

Conclusions. uPA gene knockout inhibits VEGF in males, unlike females, and chronic neurogenic pain stimulates the formation of this factor in knockout animals of both genders which confirms triggering of urokinase-independent pathway of angiogenesis activation under the influence of CNP.

Key words: mice; uPA gene-knockout; B16/F10 melanoma; chronic neurogenic pain; angiogenesis factors; skin; tumor