

*О.И. Кит, Е.М. Франциянц, Л.С. Козлова, И.В. Каплиева, В.А. Бандовкина,
Ю.А. Погорелова, Л.К. Трештаки, В.В. Позднякова, Ю.В. Пржедецкий, Ю.С. Сидоренко*

Урокиназа и ее рецептор в меланоме кожи, воспроизведенной на фоне хронической нейрогенной боли, у мышей обоего пола в сравнительном аспекте

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России,
Ростов-на-Дону

Цель: исследование плазмينا, плазминогена (ПГ), урокиназного активатора ПГ (uPA) и его рецептора (uPAR) в ткани злокачественной опухоли и кожи, не связанной с опухолью, у мышей C57BL/6 обоего пола в сравнительном аспекте при воспроизведении меланомы B16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли (ХНБ).

Методы: использованы 130 мышей и клеточная линия меланомы B16/F10. С помощью иммуноферментного анализа определяли содержание uPA-антигена (uPA-АГ) и uPA-активности (uPA-акт), uPAR, ПГ, PAF (плазмينا в комплексе с $\alpha 2$ -антиплазмином). **Статистика:** программа Statistica 10.

Результаты. Вызванное хронической нейрогенной болью (ХНБ) истощение содержания и активности uPA сохранялось в коже и опухоли после перевивки меланомы. Увеличение uPAR у самок под влиянием ХНБ после перевивки возвращалось к норме только в терминальной стадии; сниженное содержание uPAR у самцов сохранялось в течение всего наблюдения. Увеличение PAF на фоне ХНБ у самок сохранялось после перевивки в коже и опухоли, у самцов было менее выражено. ХНБ влияла на сроки развития перевивной меланомы B16/F10 у самок и самцов мышей линии C57BL/6, изменяла гендерные различия, характерные для традиционной перевивки, сокращала сроки появления метастазов, увеличивала их количество и расширяла локализацию.

Заключение. Доказано участие плазмينا и uPAR в формировании меланомы B16/F10 на фоне ХНБ с изменением гендерных приоритетов по срокам развития и генерализации процесса.

Ключевые слова: мыши, боль, меланома, урокиназа, плазмин

Введение

Хроническая боль — патологический процесс, изменяющий метаболизм всего организ-

ма: снижает сопротивляемость к развитию злокачественных опухолей, является одним из самых постоянных симптомов у онкологических больных [1,2]. Женщины и мужчины переносят боль по-разному, вопрос — участвует ли хроническая боль в прогрессии опухолей — пока остается открытым. Моделью для решения этой задачи является перевивная меланома B16/F10 у мышей линии C57BL/6. Динамика компонентов фибринолиза в злокачественном росте под влиянием хронической нейрогенной боли (ХНБ) ранее описаны [3,4]. Однако гендерные различия уровня активатора плазминогена урокиназного типа (uPA) и его специфического рецептора клеточной поверхности (uPAR) в сравнительном аспекте с традиционной моделью меланомы не рассматривались. В литературе сведения, касающиеся гендерных различий развития злокачественного процесса кожи на фоне хронической боли, практически отсутствуют или встречаются описания исследований на смешанных группах животных [5-9].

Целью работы являлось исследование плазмينا, плазминогена (ПГ), uPA и uPAR в ткани злокачественной опухоли и кожи, не связанной с опухолью, у мышей обоего пола в сравнительном аспекте при воспроизведении меланомы B16/F10 на фоне ХНБ.

Материалы и методы

Все исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями «Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики». Манипуляции с животными производили в боксе с соблюдением общепринятых правил асептики и антисептики.

Работа выполнена на мышцах линии C57BL/6 (n=130 обоего пола), 8-недельного возраста с начальной массой 24-26г. Животные получены из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область)». Модель ХНБ воспроизводили наложением лигатуры на седалищный нерв с двух сторон под наркозом [10]. Наркоз: ксила-золетилловый, за 10 минут до основного наркоза; премедикация: ксилазин (препарат Ксила) внутримышечно, в дозе 0,05 мл/кг массы тела (по инструкции), затем Золетил-50 в дозе 10 мг на 100г массы. После этого

через 2 недели производили стандартную подкожную перевивку меланомы в объеме по 0,5 мл суспензии клеток в разведении 1:10 в физиологическом растворе одновременно всем животным основной группы и группы сравнения [10]. Использовали клеточную линию мышшиной меланомы B16/F10, метастазирующей в легкие, полученную из РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва). При стандартной перевивке опухоль появляется в 100% случаев, достаточно быстро растёт и метастазирует, преимущественно гематогенно, в легкие (60-90%), реже — в печень и селезенку.

Распределение животных: основная группа — 55 животных (28 самок, 27 самцов), у которых меланому B16/F10 воспроизводили после создания модели ХНБ, и контрольная группа — 14 мышшей (7 самок, 7 самцов) с воспроизведенной моделью ХНБ без перевивки опухоли. Группа сравнения со стандартной моделью меланомы: 47 животных (22 самки, 25 самцов) с перевивкой меланомы B16/F10 в тех же дозе и объеме, что и основной группе, но без воспроизведения модели ХНБ. Нормой считали данные, полученные при исследовании кожи 14 интактных мышшей (7 самок, 7 самцов). Методами ИФА на стандартных тест-системах определяли содержание ПГ, PАР, uРА-АГ и uРА-акт, uРАР.

Статистика: программа Statistica 10 с определением среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Соответствие нормальному распределению оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Различия средних значений между группами оценивались с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и t-критерия Стьюдента для малых выборок, при $p < 0,05$ считали значимыми.

Результаты

Как сообщалось ранее, под влиянием ХНБ в коже мышшей C57BL/6 контрольной группы увеличились уровни PАР у самок и самцов (табл. 1), а также uРАР у самок, относительно нормы, у самцов uРАР был подавлен [3, 4]. Очевидно, что прирост PАР у мышшей-самок в 1,8 раза, а содержание uРАР в 2,1 раза выше, чем у самцов. Уровень ПГ снижался только у самцов этой

же группы и был в 3,9 раза ниже, чем у самок. Резкое снижение содержания и активности uРА наблюдали и у самок, и у самцов с ХНБ. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии ХНБ на ключевые компоненты фибринолиза в коже мышшей обоего пола и согласуются с литературными данными [8, 11]. На имеющемся фоне всем животным была перевита меланома B16/F10.

Изменения в коже мышшей после перевивки меланомы

К окончанию 1 недели после перевивки меланомы на фоне ХНБ в коже самок мышшей основной группы содержание и активность uРА после перевивки меланомы на фоне ХНБ нормы не достигали, оставаясь на уровне истощения (табл. 1). В коже самок основной группы количество PАР в 3,1 раза было выше, чем в группе сравнения; у самцов — на этом же уровне в обеих группах. Количество uРАР увеличилось только у самцов в 1,4 раза и практически не изменилось у самок, сравнительно с данными мышшей контрольной группы с ХНБ; в группе сравнения — соответствовало норме. В группе сравнения уровень uРА-акт увеличился только у самцов в 1,5 раза, содержание uРА-АГ — только у самок в 5,2 раза, относительно нормы.

Через 3 недели после перевивки меланомы в коже животных основной группы уровень ПГ у самок оставался стабильно ниже контроля с болью и нормы, у самцов — увеличиваясь, относительно данных контрольной группы, и приближаясь к норме, был ниже, чем у самок.

Таблица 1. Активность и содержание урокиназного активатора плазминогена и его рецептора в коже мышшей с меланомой B16/F10 на фоне нейрогенной хронической боли ($M \pm m$)

Показатели	Интактные животные, кожа (контроль)		1 неделя после перевивки		3 недели после перевивки	
	Без боли, норма	С болью*	Группа сравнения	Основная группа*	Группа сравнения	Основная группа*
Самки						
PАР (нг/г тк)	10,71±0,7	27,13±2,2¹	13,91±0,8 ¹	42,87±3,5^{1,2}	19,91±1,4 ¹	21,97±1,72¹
ПГ (нг/г тк)	10,25±0,8	10,43±0,8	6,32±0,5 ¹	8,55±0,7^{1,2}	13,5±1,1 ^{1,2}	8,64±0,7¹
uРАР (нг/г тк)	56,06±4,5	84,10±7,2¹	56,03±4,7	77,10±6,5¹	65,36±5,6 ²	57,20±4,8
uРА-акт (ед/г тк)	1,611±0,10	0,013±0,0071¹	1,202±0,07 ¹	0,020±0,0017^{1,2}	2,504±0,15 ^{1,2}	0,020±0,0015¹
uРА-АГ(нг/г тк)	31,72±2,1	1,147±0,09¹	164,3±9,8 ¹	4,010±0,3¹	187,5±13,1 ¹	6,301±0,51¹
Самцы						
PАР (нг/г тк)	14,52±0,9	20,06±1,5¹	47,61±3,6 ¹	42,13±3,6^{1,2}	30,70±2,4 ^{1,2}	42,30±3,6^{1,2}
ПГ (нг/г тк)	6,851±0,5	2,70±0,2¹	7,572±0,6	3,301±0,1^{1,2}	14,99±1,1 ¹	6,200±0,5
uРАР (нг/г тк)	110,3±6,5	40,50±3,1¹	103,7±8,9	55,37±4,2^{1,2}	65,13±5,7 ¹	47,27±3,8¹
uРА-акт (ед/г тк)	1,561±0,1	0,029±0,002¹	2,431±0,2 ¹	0,040±0,02^{1,2}	1,650±0,9	0,038±0,02¹
uРА-АГ (нг/г тк)	215,3±16,8	1,667±0,1¹	233,9±17,4	1,483±0,1¹	181,6±14,2 ²	1,503±0,1¹

Примечание: ¹ — различия достоверны, относительно данных интактных животных ($p < 0,05$); ² — различия достоверны, сравнительно с предыдущим сроком исследования ($p < 0,05$). * Жирным шрифтом выделены данные групп мышшей с нейрогенной болью.

Таблица 2. Активность и содержание урокиназного активатора плазминогена и его рецептора в опухоли мышей с меланомой B16/F10 на фоне нейрогенной хронической боли (M±m)

Показатели	Интактные животные, кожа (контроль)		1 неделя после перевивки		3 недели после перевивки	
	Без боли, норма	С болью*	Группа сравнения	Основная группа*	Группа сравнения	Основная группа*
Самки						
РАР (нг/г тк)	10,71±0,7	27,13±2,2¹	Появление опухоли не регистрировалось	60,77±5,02^{1,2}	36,43±1,8 ¹	50,93±4,01^{1,2}
ПГ (нг/г тк)	10,25±0,8	10,43±0,8		16,75±1,4^{1,2}	16,7±1,4 ¹	13,65±1,1^{1,2}
uPAR (пг/г тк)	56,06±4,5	84,10±7,2¹		63,08±5,17^{1,2}	141,8±11,7 ¹	86,09±7,2^{1,2}
uPA-акт (ед/г тк)	1,611±0,10	0,013±0,0071¹		0,033±0,002^{1,2}	2,822±0,16 ¹	0,027±0,002¹
uPA-АГ (нг/г тк)	31,72±2,1	1,147±0,09¹		39,35±3,17^{1,2}	335,5±23,2 ¹	52,49±4,1¹
Самцы						
РАР (нг/г тк)	14,52±0,9	20,06±1,5¹	Регистрировались опухолевые узлы размером 1-2 мм, не исследовались	39,14±2,6^{1,2}	48,80±3,9 ¹	59,93±4,3^{1,2}
ПГ (нг/г тк)	6,851±0,5	2,70±0,2¹		6,440±0,5²	21,60±1,7 ¹	4,950±0,4¹
uPAR (пг/г тк)	110,3±6,5	40,50±3,1¹		51,86±4,7^{1,2}	73,48±5,3 ¹	21,06±1,6^{1,2}
uPA-акт (ед/г тк)	1,561±0,1	0,029±0,002¹		0,050±0,003^{1,2}	2,701±0,2 ¹	0,044±0,002¹
uPA-АГ (нг/г тк)	215,3±16,8	1,667±0,1¹		1,640±0,1¹	300,4±23,5 ¹	1,550±0,1¹

Примечание: ¹ — различия достоверны, относительно данных интактных животных (p<0,05); ² — различия достоверны, сравнительно с предыдущим сроком исследования (p<0,05). * Жирным шрифтом выделены данные групп мышей с нейрогенной болью.

Содержание uPA-АГ в коже самок повышалось, не достигая нормы, у самцов данные uPA не изменились и в целом содержание и активность uPA на фоне ХНБ оставались на 2 порядка ниже, чем в группе сравнения (табл. 1). Содержание uPAR в эти сроки, постепенно понижаясь у самок и оставаясь стабильным у самцов основной группы, достигло нормы у всех животных с ХНБ. Количество РАР на 3 неделе стабилизировалось примерно на одном уровне в коже всех животных, соответственно полу, включая мышей группы сравнения, однако у всех самцов его уровень был значимо выше, чем у самок. Развитие опухоли у самок и самцов мышей групп основной и сравнения происходило неодновременно.

Состояние исследуемых белков в опухоли мышей

Как было показано [3, 4], содержание uPA-АГ повышалось в опухолях обеих групп, но, как и в коже, у мышей группы сравнения обоюга пола его количество было на 2 порядка выше до окончания эксперимента (табл. 2). Уровень uPA-акт в опухолях мышей группы сравнения был выше, чем основной, более чем в 100 раз во все сроки исследования, хотя, согласно М. Schuliga [12], uPA-АГ и uPA-акт при раке могут действовать на матриксные белки и активировать ПГ практически одинаково.

Содержание РАР в опухоли мышей-самок основной группы было выше, чем в группе сравнения во все сроки исследования, у самцов — только к концу 3 недели.

Содержание uPAR в опухоли самцов на фоне ХНБ в 1 неделю практически совпадало с таковым в коже (табл. 1, 2), но далее, через 3 недели, его уровень в опухоли снижался почти вдвое, против данных 1 недели и контроля с болью, а у самок возрастал и к 3 неделе соответствовал контролю с болью (табл. 2).

Таким образом, развитие перевивной меланомы B16/F10 на фоне ХНБ шло быстрее, к тому же изменились приоритеты гендерных различий: опухоли появлялись раньше (у самок через 1 неделю после перевивки, у самцов — через 2), имели 2-фокусный рост у самок и 1-фокусный у самцов. У мышей-самцов группы сравнения опухоли появлялись через 2-3 недели, у самок — через 3-4, а метастазы регистрировались только через 4 недели. На фоне ХНБ наблюдалось 100% синхронное метастазирование (на 1 неделе у самок и на 2 — у самцов), помимо традиционных мишеней (печени и легких), в нетрадиционные — сердце и матку (у самок). Сроки жизни животных с меланомой на фоне ХНБ сокращались: средняя продолжительность жизни для мышей основной группы составляла 19,17±1,35 дней, мышей группы сравнения — 30,25±1,67 дня.

Обсуждение

Участие ферментов, в том числе uPA и uPAR, в развитии опухолей известно [13-15]. Известно также, что после травмы периферического нерва экспрессия uPA в нейронах достигает пика в 1-3 день, а затем снижается [8,9]. Одновременно F. Wu et al. [11] доказано, что нейроны высвобождают uPA в самой ранней фазе восстановления после травмы (1-3 дня), причем uPA не влияет на выживаемость нейронов, а вместе со своим рецептором способствует развитию структурных изменений в окружающей ткани. Такого же мнения придерживаются P. Merino et al. [16]. Увеличение содержания uPA-АГ и уровня uPA-акт в коже всех животных на фоне ХНБ в проведенном эксперименте, как и в исследованиях зарубежных коллег, могли происходить в ранние сроки после перевязки седалищного нерва, в связи с чем, накануне перевязки меланомы B16/F10 наблюдалось их истощение в коже. Возможно, что истощение uPA у всех животных с ХНБ через 2 недели с момента ее моделирования является следствием его экспрессии, связанной с перевязкой седалищных нервов, и эта картина сохранилась после перевязки в опухоли, в процессе ее роста.

Имеются сведения о том, что пол влияет на заболеваемость человека раком и течение процесса [17]. Исследования A. Hald et al. [5] касались изучения воспалительного процесса при раке кожи у плазмин-дефицитных мышей обоего пола, авторы подтвердили, что гендерные различия не отменялись овариэктомией, т.к. женские половые гормоны не опосредовали ускоренное заживление ран кожи у самок мышей с дефицитом плазмينا. Позже В. Rønø et al. [6] также доказано, что пол животных влиял на способность мышей с дефицитом плазмينا к заживлению кожных ран, которая выражалась в ускоренном заживлении ран у самок, по сравнению с самцами.

У мышей-самок не наблюдалось снижения ПГ кожи в модели ХНБ, но увеличивалось содержание PAR, следовательно, происходило пополнение ПГ, т.е. его синтез мог быть стимулирован болью, в отличие от самцов. Количество ПГ у мышей-самок группы сравнения возросло только через 3 недели развития меланомы, у самцов — статистически значимый прирост наблюдался со 2 недели. Повышенное содержание PAR на фоне ХНБ указывает на стимуляцию болью образования не только плазмينا, но и его специфического ингибитора $\alpha 2$ -антиплазмينا. Возможно, истощение uPA в модели ХНБ способствовало проявлению активности других факторов, участвующих в активации ПГ и образовании плазмينا. В обзоре M. Schuliga [12]

рассмотрены функции плазмина, которые оказались различными, в зависимости от того, в какой ткани он образуется и какой активатор этому способствует.

A. Hald et al. [5] доказали, что рост злокачественной опухоли кожи у ПГ-дефицитных мышей-самцов, был замедлен на 52% по сравнению с контролем дикого типа. Гистологические анализы, сделанные авторами, показали, что эффект ограничения роста опухоли при дефиците ПГ был связан с повышенным тромбозом и потерей проходимости сосудистой сети опухоли, что приводило к ее некрозу. Данные A. Hald et al. [5] прямо указывают на то, что плазмин-зависимый фибринолиз облегчает рост опухоли в том числе и путем поддержания проходимости ее сосудистой сети. Очевидно, что при развитии ХНБ у мышей-самок интенсивное освобождение плазмينا в исследованных тканях происходило одновременно с постоянным пополнением его предшественника, а у самцов синтез ПГ мог быть заторможен. Появление опухоли на фоне ХНБ у самок регистрировалось раньше, чем у самцов.

Количество растворимого uPAR через 3 недели после перевязки повысилось у всех мышей, кроме самцов с ХНБ. В эксперименте M.A. Ravón et al. [18] показано, что ингибирование uPAR замедляет рост опухоли и снижает экспрессию генов, ассоциированных с метастазами, а сам uPAR усиливает преобразование плазминогена в плазмин и способствует его накоплению. В опухоли мышей группы сравнения уровень uPAR оставался высоким. Roberta Mazzieri et al. [7] показали, что дефицит uPAR у мышей значительно снижает восприимчивость к классическому воспроизведению канцерогенеза в коже, т.к. uPAR способствует пролиферации клеток и образованию опухолей. Наши наблюдения согласуются с этими сведениями и позволяют предполагать, что при ХНБ и uPA-акт, и uPA-АГ, оба активно связывающиеся с uPAR на клеточной мембране, теряют свойства растворимых белков и не попадают в зону определения их активности и содержания (цитозольная фракция), сохраняя биологические свойства. F. Wu et al. [11] сообщали, что после повреждения нерва взаимодействие uPA с uPAR способствует не только ремоделированию тканей, но и воспалению, хемотаксису, пролиферации клеток, адгезии и миграции. Допустимо предположение о том, что мог иметь место направленный расход uPA-АГ и uPA-акт на восстановительные процессы после повреждения седалищного нерва в модели ХНБ.

Подводя итог результатам эксперимента, можно заключить, что ХНБ влияла на сроки развития перевивной меланомы B16/F10 у самок и самцов мышей линии C57BL/6, на ее размеры и

биологические свойства, а также на сроки появления метастазов, их количество и локализацию. Сроки выхода опухолей и их метастазирование при ХНБ отличались от таковых при классической перевивке:

– опухоли выходили на 1 неделю раньше, чем при традиционной перевивке (в основной группе — на 1 неделе после перевивки у самок, на 2 неделе у самцов; в группе сравнения — на 2-3 неделе у самцов, на 3-4 у самок);

– 100% метастазирование регистрировались в основной группе через 1-2 недели, в большем количестве и с расширением «географии» локализации метастазов, в группе сравнения — через 3-4 недели и только в традиционные органы.

Заключение

Итог эксперимента свидетельствует о важной роли плазмينا и uPAR в формировании ХНБ. Относительно uPA, нами получены лишь косвенные доказательства участия фермента в процессах, сопровождающих ХНБ. Изменения в коже после перевивки меланомы B16/F10 на фоне ХНБ и в растущей опухоли касались всех исследуемых показателей, но в большей степени привлекает внимание динамика плазмينا и uPAR. Результаты доказывают несомненное участие плазмينا и uPAR в развитии меланомы B16/F10 на фоне ХНБ. Однако, как упоминалось, при ХНБ меланома развивалась у самок уже на первой неделе после перевивки, а у самцов — на второй, тогда как в классическом варианте (группа сравнения), самцы заболели первыми и в более поздние сроки, чем самки и самцы основной группы.

Увеличение скорости метастазирования меланомы на болевом фоне в значительной степени может быть связано с изменением состояния отдельных компонентов каскада регуляции плазминогена и их биологических функций в коже животных. Важную роль играл, видимо, плазмин, содержание которого, возрастая в коже под влиянием боли, сохранялось значимо повышенным после перевивки меланомы у мышей-самок в коже и опухоли, в отличие от самцов, где увеличение PAR было менее выраженным, сравнительно с традиционным вариантом. Рецептор урокиназы uPAR, конкурируя с uPA в реализации протеолитической функции, при истощении фермента в модели ХНБ, получал неоспоримое преимущество у всех животных с болью. Наши результаты подтверждают литературные сведения о важной роли регуляторов плазминогена и плазмينا в формировании нейропатической боли и злокачественных новообразований кожи, а также доказывают несомненное участие плазмينا и uPAR в изменении гендерных приори-

тетов, характерных для классической меланомы B16/F10, и сокращении сроков ее развития на фоне ХНБ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яхно Н.Н., Кукушкин М.Л. Хроническая боль: медико-биологические и социально-экономические аспекты. Вестник РАМН. 2012; 9:54-58. [Yakhno N.N., Kukushkin M.L. Khronicheskaya bol: mediko-biologicheskie i sotsialno-ekonomicheskie aspekty [Chronic pain: medicobiologic and sotsio-economic aspects]. Vestnik RAMN. 2012; 9: 54-58 (In Russ).].
2. Leppert W, Zajaczkowska R, Wordliczek J, Dobrogowski J, Woron J, Krzakowski M, Pathophysiology and clinical characteristics of pain in most common locations in cancer patients. J. Physiology and Pharmacology. 2016; 67(6):787-799.
3. 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. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2018-5-2-38-46>. [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. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2018-5-2-38-46> (In Russ).].
4. Франциянц Е.М., Кит О.И., Котиева И.М. и др. Тканевая система регуляции плазминогена в динамике меланомы кожи у мышей-самцов, воспроизведенной на фоне хронической боли. Известия вузов Северо-Кавказского региона. Естественные науки. 2019; 199(1): 112-121. [Frantsiyants E.M., Kit O.I., Kotieva I.M. et al. Tissue system of plasminogen regulation in dynamics of cutaneous melanoma in male mice with chronic pain. Izvestiya vuzov. Severo-Kavkazskii region. Natural science. 2019; 199(1): 112-121. (In Russ).].
5. Hald A, Eickhardt H, Maerkedahl RB, Feldborg CW, Egerod KL, Engelholm LH, Laerum OD, Lund LR, Rønø B. Plasmin-driven fibrinolysis facilitates skin tumor growth in a gender-dependent manner. FASEB J. 2012; 26(11): 4445-57. DOI: 10.1096/fj.12-208025.
6. Rønø Birgitte, Lars Henning Engelholm, Leif Røge Lund, Andreas Hald. Gender Affects Skin Wound Healing in Plasminogen Deficient Mice. PLoS One. 2013; 8(3): e59942. doi:10.1371 / journal.pone.0059942.
7. Mazziere 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): 4895-909. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0378.
8. 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, 132:183-91.
9. Yamanaka H., Kobayashi K., Okubo M. et al. Annexin A2 in primary afferents contributes to neuropathic pain as-

- sociated with tissue type plasminogen activator. *Neuroscience*. 2016, 314: 189-99. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.058.
10. 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).].
 11. 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: 14219-32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5309-13.2014.
 12. Schuliga M. The inflammatory actions of coagulant and fibrinolytic proteases in disease. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015: 4376-95. doi: 10.1155/2015/437695.
 13. Сидоренко Ю.С., Мусиенко Н.В., Франциянц Е.М. Некоторые показатели активности протеолитической системы в ткани злокачественной опухоли и перифокальной зоны при различных локализациях рака. *Вестник Южного научного центра РАН*. 2008; 4(2): 93-8. [Sidorenko Yu.S., Musienko N.V., Frantsiyants E.M. Nekotorye pokazateli aktivnosti proteoliticheskoy sistemy v tkani zlokachestvennoy opukholi i perifokalnoy zony pri razlichnykh lokalizatsiyakh raka [Some indicators of the proteolytic system activity in tissues of malignant tumor and perifocal zone in various cancers]. *Vestnik Yuzhnogo nauchnogo tsentra RAN*. 2008; 4(2): 93-8. (In Russ).].
 14. McMahan B.J., Kwaan H.C. Components of the Plasminogen-Plasmin System as Biologic Markers for Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 867: 145-56. doi:10.1007/978-94-017-7215-0_10.
 15. Mahmood N., Mihalciou C., Rabbani S.A. Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front Oncol*. 2018; 8: 24. doi:10.3389/fonc.2018.00024.
 16. 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): 2741-53. doi: 10.1074/jbc.M116.761650.
 17. Sukocheva O.A., Li B., Due S.L. et al. Androgens and esophageal cancer: What do we know? *World. J. Gastroenterol*. 2015; 21(20): 6146-6156.
 18. Pavón M.A., Arroyo-Solera I., Virtudes Céspedes M. et al. uPA/uPAR and SERPINE1 in head and neck cancer: role in tumor resistance, metastasis, prognosis and therapy. *Oncotarget*. 2016; 35(7): 57351-57366. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10344>.

Поступила в редакцию 01.07.2019 г.

*O.I. Kit, E.M. Frantsiyants, L.S. Kozlova,
I.V. Kaplieva, V.A. Bandovkina, Yu.A. Pogorelova,
L.K. Trepitaki, V.V. Pozdnyakova, Yu.V. Przhedekij,
Yu.S. Sidorenko*

Urokinase and its receptor in cutaneous melanoma reproduced in chronic neurogenic pain in mice of both genders in comparison

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

Aim: comparative analysis of plasmin, plasminogen (PG), urokinase PG activator (uPA) and its receptor (uPAR) in tissues of malignant tumors and intact skin of C57BL/6 mice of both genders in B16/F10 melanoma reproduced in chronic neurogenic pain (CNP).

Methods: The study was performed on 130 mice and B16/F10 melanoma cell line. Levels of uPA-antigen (uPA-AG) and uPA-activity (uPA-act), uPAR, PG, PAP (plasmin- α 2-antiplasmin complex) were determined by ELISA. Statistics: the Statistica 10 program.

Results. CNP-induced depletion of the content and activity of uPA was maintained in the skin and tumors after melanoma transplantation. Elevation of uPAR in females under the influence of CNP after the transplantation normalized at the terminal stage only; decreased levels of uPAR in males were maintained during the whole experiment. Elevation of PAP in females with CNP was maintained in the skin and tumors after the transplantation, and in males it was less marked. CNP affected the time of development of transplantable B16/F10 melanoma in female and male C57BL/6 mice, changed gender differences typical of the standard tumor transplantation, decreased the period prior to the development of metastases, increased their number and extended localization.

Conclusions. The study confirmed involvement of plasmin and uPAR in the formation of B16/F10 melanoma in CNP with changing gender priorities in development and spread of the process.

Key words: mice, pain, melanoma, urokinase, plasmin