УДК (616-009.7: 616.5-006.81): 616.092.9 [575.224.22: 577.151.6: 612.115.3]
DOI: 10.15372/SSMJ20190408

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ПО ГЕНУ УРОКИНАЗЫ НА РОСТ МЕЛАНОМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Елена Михайловна ФРАНЦИЯНЦ, Ирина Викторовна КАПЛИЕВА, Екатерина Игоревна СУРИКОВА, Ирина Валерьевна НЕСКУБИНА, Валерия Ахтямовна БАНДОВКИНА, Лидия Константиновна ТРЕПИТАКИ, Наталья Сергеевна ЛЕСОВАЯ, Наталья Дмитриевна ЧЕРЯРИНА, Юлия Александровна ПОГОРЕЛОВА, Людмила Анатольевна НЕМАШКАЛОВА

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России
344037, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63, корп. 8

Цель исследования – изучить особенности роста меланомы B16/F10 у мышей с нокаутом по гену урокиназы (uPA) без хронической нейрогенной боли (ХНБ) и на ее фоне. **Материал и методы.** Исследование проведено на разнополых мышах линии C57BL/6 (n = 102) и линии C57BL/6-Plautm1.1BugThisPlauGFDhu/GFDhu с нокаутом по гену *uPA* (n = 48). Мышам основных подгрупп меланому B16/F10 перевивали подкожно через 2 недели после двустороннего лигирования седалищных нервов (модель ХНБ), контролем служили мыши соответствующей линии со стандартной перевивкой меланомы. **Результаты и их обсуждение.** Продолжительность жизни мышей с нокаутом по гену *uPA* на фоне роста меланомы не отличалась от обычной – самки жили в 1,5 раза ($p < 0,05$) дольше самцов, при этом меланома у всех нокаутных мышей появлялась на неделю раньше; динамика роста опухоли имела резко выраженную гендерную зависимость: у самок опухоль фактически не росла и перед гибелью животных ее объем не превышал 1,0 см^3, тогда как у самцов опухоль характеризовались активным ростом с двумя пиками увеличения объема (2 и 4 недели); меланома метастазировала слабо – единичные метастазы в легких (у самок) или не метастазировала, но в легких и сердце отмечались кровоизлияния (у самцов). ХНБ уменьшала продолжительность жизни самок с нокаутом по гену *uPA*, как и в случае с нормальным геномом, но не влияла на продолжительность жизни самцов; первичные опухоли у нокаутных мышей пальпировались на несколько дней позже, чем в контроле, но росли более интенсивно, при этом сглаживались гендерные различия; усиление метастазирования проявлялось в инициации метастатического поражения легких и печени у самцов, при этом кровоизлияния в легких сохранялись, и в увеличении количества метастатических очагов в легких на фоне появления кровоизлияний в них у самок. **Заключение.** Нокаут по гену *uPA* по-разному изменяет течение меланомы B16/F10 у самцов и самок мышей. ХНБ усиливает злокачественный рост опухоли, стирая гендерные различия, и активизирует метастазирование меланомы.

Ключевые слова: нокаут по гену *uPA*, меланома, хроническая нейрогенная боль, половые особенности, мыши.

Конфликт интересов. Авторы отрицают наличие конфликта интересов.
Автор для переписки: Нескубина И.В., e-mail: neskubina.irina@mail.ru
Для цитирования: Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Сурикова Е.И., Нескубина И.В., Бандовкина В.А., Трепитаки Л.К., Лесовая Н.С., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А., Немашкалова Л.А. Влияние нокаута по гену урокиназы на рост меланомы в эксперименте. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2019; 39 (4): 62–70. doi: 10.15372/SSMJ20190408.

EFFECT OF UROKINASE GENE-KNOCKOUT ON GROWTH OF MELANOMA IN EXPERIMENT

Elena Mikhaylovna FRANTSIYANTS, Irina Viktorovna KAPLIEVA, Ekaterina Igorevna SURIKOVA, Irina Valerievna NESKUBINA, Valeria Akhtyamovna BANDOVKINA, Lidiya Konstantinovna TREPITAKI, Nataliya Sergeevna LESOVAYA, Nataliya Dmitrievna CHERYARINA, Yuliya Aleksandrovna POGORELOVA, Lyudmila Anatol'evna NEMASHKALOVA

Rostov Research Institute of Oncology of Minzdrav of Russia
344037, Rostov-on-Don, 14th line, 63, bldg. 8

The purpose of the study was to reveal special features of the B16/F10 melanoma growth in urokinase (uPA) gene knockout mice with and without chronic neurogenic pain (CNP). **Material and methods.** The study included male and female C57BL/6 mice (n = 102) and C57BL/6-Plautm1.1BugThisPlauGFDhu/GFDhu mice with *uPA* gene knockout (n = 48). Mice of the main subgroups underwent subcutaneous transplantation of B16/F10 melanoma 2 weeks after bilateral ligation of sciatic nerves (CNP model); mice of the same strain with standard melanoma transplantation served as controls. **Results and discussion.** Survival of *uPA* gene knockout mice did not differ from that of normal animals – 1.5 times higher in females than in males ($p < 0.05$), with melanoma onset in gene-deficient mice a week earlier. The dynamics of tumor growth had pronounced gender differences: in females, the tumor did not grow and its maximal volume prior to death was 1.0 cm^3, while tumors in males were characterized by an active growth with two peaks of volume increase (weeks 2 and 4). Melanoma was weakly metastatic – solitary metastases to the lungs (in females) or no metastases, but pulmonary and heart hemorrhages were noted (in males). CNP decreased the survival of *uPA* gene knockout females, as well as of normal animals, but did not influence the survival of males; primary tumors in gene-deficient mice appeared a few days later than in controls but their growth was more intense, with diminished gender differences. Increased metastasis was manifested by the initiation of metastatic lesions to the lungs and liver in males, with maintained pulmonary hemorrhages, and by increased number of metastatic foci in the lungs together with the appearance of pulmonary hemorrhages in females. **Conclusions**. The influence of *uPA* gene knockout on the course of B16/F10 melanoma differs in male and female mice. CNP enhances malignant tumor growth, diminishing gender differences, and activates melanoma metastasis.

Key words: *uPA* gene knockout, melanoma, chronic neurogenic pain, gender differences, mice.

Conflict of interests. Authors deny conflict of interest.
Correspondence author: Neskubina I.V., e-mail: neskubina.irina@mail.ru
Citation: Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Surikova E.I., Neskubina I.V., Bandovkina V.A., Trepitaki L.K., Lesovaya N.S., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A., Nemashkalova L.A. Effect of urokinase gene-knockout on growth of melanoma in experiment. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 62–70. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190408.

Мышь как модель оказалась полезной для исследования рака в человеческой популяции из-за относительно близких геномных и физиологических характеристик биологии опухолей мышей и людей. У мышей есть достаточно много сходных с людьми анатомических, клеточных и молекулярных признаков злокачественного перерождения [12]. Доля генов мышей, тождественных человеческим, около 80 %, что позволяет использовать этих животных в качестве инструмента изучения основных механизмов канцерогенеза, а также как превосходную экспериментальную модель для исследования ответа организма на разработанное противоопухолевое лечение [16]. Хотя традиционные экспериментальные модели мышей остаются ценным инструментом для изучения молекулярных механизмов неопластического роста, ограничением является низкая степень гетерогенности опухолей у них по сравнению с высокой степенью гетерогенности опухолей у человека. Был достигнут ряд успехов в моделировании рака у мышей, и новые модели теперь в большей степени способны проецировать рак человека с мутациями, которые контролируются в пространстве и/или во времени. Кроме того, эти модели лучше учитывают гетерогенность опухолей и их изменчивость, характерные для пациентов в клинических условиях [19].

Боль – один из самых распространенных симптомов у онкологических больных, а ее тип и интенсивность зависят от местоположения опухоли и стадии болезни [5]. Многофакторность причин возникновения боли у онкологических больных связана с сопутствующими заболеваниями, побочным действием противоопухолевого лечения. Наиболее часто встречающийся тип хронической боли – нейрогенная, возникающая в результате сдавливания нервного ствола растущей опухолью [15]. Ранее на экспериментальных животных нами показано стимулирующее влияние хронической нейрогенной боли (ХНБ) на злокачественный процесс [1].

Исследования последних нескольких десятилетий показали, что ось активатора плазминогена урокиназного типа (uPA–uPAR) обладает плейотропным эффектом на разных стадиях рака. Нарушения уровней компонентов оси uPA–uPAR часто наблюдаются при ряде злокачественных новообразований; в дальнейшем было определено, что она является путем, способствующим росту опухолей и метастазированию, и дало возможность рассматривать ось uPA–uPAR в качестве мишени прогнозирования рака, диагностики и терапевтических вмешательств. Доклинические данные, полученные из ряда исследований, выявили, что нацеливание на эту ось способствует подавлению

злокачественного роста и уменьшению метастазирования [14].

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей роста меланомы B16/F10 у самцов и самок мышей с нокаутом по гену *uPA* без ХНБ и на ее фоне.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 150 мышах. Животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Все исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и Приказе Минздрава РФ № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Мыши линии C57BL/6 обоего пола (n = 102) с начальной массой 21–23 г, полученные из филиала «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, составили 1-ю группу. Мыши линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu обоего пола (n = 48) с начальной массой у самок и самцов соответственно 24–26 и 31–33 г были получены из питомника лабораторных животных «Пущино» Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Московская область). Характеристика животных линии C57BL/6-Plautm1.1BugThisPlauGFDhu/GFDhu: окраска шерсти – черная, метод модификации – целевая мутация (нокаут) с получением белка (uPA), не способного связываться с рецептором активатора плазминогена урокиназного типа. Животные-мутанты могут использоваться в исследованиях хронического воспаления ткани, механизмов фибринолиза, онкогенеза и роста сосудов в тканях. Эти мыши составили 2-ю группу.

Животные каждой группы были разделены на две подгруппы: контроль – со стандартным ростом меланомы B16/F10, перевитой подкожно в правую подлопаточную область, и основные подгруппы, в которых перевивка меланомы B16/F10 осуществлялась на фоне предварительно воспроизведенной модели ХНБ. Количество мышей в контрольных подгруппах линии C57BL/6 составило: самцов n = 25, самок n = 22, линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu: самцов n = 12, самок n = 12. Число мышей основных подгрупп линии C57BL/6 было следующим: самцов n = 27, самок n = 28, линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu: самцов n = 12, самок n = 12.

В работе использовали клеточную линию мышиной меланомы B16/F10, полученную из ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Всем мышам меланому перевивали подкожно одномоментно по 0,5 мл в разведении 1 : 10 в физиологическом растворе, животным основных подгрупп – через 2 недели после двухстороннего лигирования седалищных нервов [1]. Известно, что при стандартной перевивке опухоль появляется в 100 % случаев и на 12–16 сутки роста метастазирует в легкие, печень и селезенку. Клеточная популяция меланомы B16/F10 гетерогенна, включает как фрагменты с незначительным содержанием меланина, так и выраженные пигментированные участки. Пролиферативный пул опухоли составляет 71,6 %. Модальный класс опухоли насчитывает 40 хромосом. Материал для перевивки меланомы B16/F10 получали от мышей-доноров на 12–16 сутки развития опухолей. Объем опухоли в контрольные сроки наблюдения рассчитывали по формуле: $V = \frac{\pi}{6} \times D1 \times D2 \times D3$, где D1, D2 и D3 – три взаимно-перпендикулярных диаметра опухоли (см), измеренных при помощи штангенциркуля.

Переменные представлены в виде среднего арифметического и среднеквадратического отклонения ($M \pm SD$), для оценки различий между группами использовали критерий Манна – Уитни. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Средняя продолжительность жизни мышей. У контрольных самцов линии C57BL/6 (1-я группа) средняя продолжительность жизни была статистически значимо меньше, чем у самок (в 1,4 раза). Та же тенденция сохранялась и у контрольных мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu (2-я группа) – самцы жили в 1,5 раза ($p < 0,05$) меньше самок, причем продолжительность жизни нокаутных животных обоего пола на фоне роста меланомы была такой же, как и у мышей без генетических изменений из соответствующих подгрупп – контрольной или основной (табл. 1, 2).

У мышей линии C57BL/6 (1-я группа) из основной подгруппы, у которых меланома росла на фоне ХНБ, продолжительность жизни уменьшалась: у самцов – в 1,3 раза ($p < 0,05$) (см. табл. 1), у самок – в 1,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными значениями (см. табл. 2). Продолжительность жизни генно-модифицированных животных (2-я группа) при развитии злокаче-

Таблица 1

Влияние ХНБ на рост меланомы B16 у самцов мышей линии C57BL/6 и C57BL/6-Plautm1.1BugThis PlauGFDhu/GFDhu

Table 1

Effect of chronic neurogenic pain on the growth of B16 melanoma in male C57BL/6 and C57BL/6-Plautm1.1BugThis PlauGFDhu/GFDhu mice

Показатель	C57BL/6		C57BL/6-Plautm1.1BugThisPlauGFDhu/GFDhu	
	Меланома	Меланома + ХНБ	Меланома	Меланома + ХНБ
Продолжительность жизни, сут	22,15 ± 1,82	17,24 ± 0,84*	23,33 ± 3,18	23,33 ± 3,18
Дата появления опухоли, сут	9,80 ± 0,82	4,00 ± 0,00*	7,67 ± 2,67	11,67 ± 0,67^{+}
Объем опухоли, см^3				
1-я неделя	Нет	0,06 ± 0,01	0,017 ± 0,008	Нет
2-я неделя	1,27 ± 0,37	1,36 ± 0,27^{1}	2,72 ± 0,78^{1}	1,57 ± 0,71
3-я неделя	5,91 ± 1,48^{2}	3,00 ± 0,58^{1,2}	2,08 ± 0,64$^{+,1}$	5,80 ± 0,81*$^{,+,2}$
4-я неделя	7,94 ± 2,10^{2}	–	6,52 ± 0,40^{1,2,3}	8,26 ± 0,42*^{,2,3}
Некроз	3–4 недели	3 недели	3 недели	2–3 недели
Метастазы	Легкие	Легкие, селезенка	Нет	Легкие, печень
Кровоизлияние в легкие	Нет	Нет	Есть (+ сердце)	Есть (+ инволюция тимуса)

Примечание. Здесь и в табл. 2 обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – мышей аналогичной линии с меланомой без ХНБ; + – мышей линии C57BL/6 на аналогичном сроке наблюдения; 1, 2, 3 – мышей через 1, 2, 3 недели после прививки опухоли.

Таблица 2

Влияние ХНБ на рост меланомы B16 у самок мышей линии C57BL/6 и C57BL/6-Plautm1.1BugThis PlauGFDhu/GFDhu

Table 2

Effect of chronic neurogenic pain on the growth of B16 melanoma in female C57BL/6 and C57BL/6-Plautm1.1BugThis PlauGFDhu/GFDhu mice

Показатель	C57BL/6		C57BL/6-Plautm1.1BugThisPlauGFDhu/GFDhu	
	Меланома	Меланома + ХНБ	Меланома	Меланома + ХНБ
Продолжительность жизни, сут	30,25 ± 1,67	19,17 ± 1,35*	34,67 ± 0,67	21,33 ± 2,19*
Дата появления опухоли, сут	10,15 ± 0,98	5,29 ± 0,20*	6,67 ± 1,67	11,67 ± 0,67*$^{,+}$
Объем опухоли, см^3				
1-я неделя	Нет	0,70 ± 0,25	0,008 ± 0,008	нет
2-я неделя	0,85 ± 0,12	1,65 ± 0,27*^{,1}	0,33 ± 0,09$^{+,1}$	2,38 ± 0,54*
3-я неделя	2,75 ± 0,73^{2}	2,50^{1} ± 0,49	0,04 ± 0,01*$^{,+,2}$	5,76 ± 0,59*$^{,+}$
4-я неделя	4,69 ± 0,86^{2}	–	1,05± 0,08$^{+,1,2,3}$	9,50 ± 0,98*^{,2,3}
Некроз	3–4 нед.	2–3 нед.	3 нед.	2–3 нед.
Метастазы	Селезенка	Сердце, легкие, печень, матка	Легкие (единичные)	Легкие (множественные)
Кровоизлияние в легкие	Нет	Нет	Нет	Есть

ственного процесса на фоне лигирования седалищных нервов зависела от их гендерной принадлежности: у самок уменьшалась в 1,6 раза ($p < 0,05$), как и у мышей линии C57BL/6 (см. табл. 2), у самцов статистически значимо не отличалась от продолжительности жизни соответствующей контрольной подгруппы мышей (см. табл. 1).

Следовательно, в целом контрольные самки как с интактным геномом, так и имеющие нокаут по гену *uPA* жили дольше контрольных самцов. ХНБ уменьшала продолжительность жизни самцов линии C57BL/6 и всех самок и не влияла на продолжительность жизни самцов мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu.

Время появления первичного опухолевого узла. У контрольных мышей линии C57BL/6 (1-я группа) первичная опухоль пальпировалась на 9–10 сутки от момента перевивки, тогда как у контрольных мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu (2-я группа) – на 5–10 сутки; статистически значимой разницы между группами по этому показателю выявлено не было ни у самцов, ни у самок (см. табл. 1, 2). ХНБ способствовала сокращению сроков появления первичных опухолей у мышей с интактным геномом (1-я группа): у самок – в 1,9 раза ($p < 0,05$), у самцов – в 2,5 раза по сравнению с соответствующей контрольной подгруппой животных. У мышей с измененным геномом (2-я группа) время обнаружения опухолей на фоне ХНБ, напротив, в среднем удлинялась на четыре дня по сравнению с соответствующим контролем. Однако если у самок с нокаутом по гену *uPA* опухолей на фоне ХНБ начинали пальпироваться в 1,7 раза позже, чем у самок соответствующей линии без боли ($p < 0,05$), то у самцов с измененным геномом – практически одновременно (см. табл. 1, 2). Несмотря на это, появление меланомы на фоне ХНБ у мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu происходило позже, чем у мышей линии C57BL/6: у самцов – в 2,9 раза, у самок – в 2,2 раза (см. табл. 1, 2).

Следовательно, у мышей с измененным геномом первичный узел формировался на одну неделю раньше; под влиянием ХНБ появление первичных опухолей у мышей с нормальным генотипом и мышей, имеющих нокаут по гену *uPA*, изменялось разнонаправленно: в первом случае опухоли обнаруживались раньше, чем в соответствующем контроле, во втором – позже.

Динамика роста первичного опухолевого узла. У контрольных мышей линии C57BL/6 (1-я группа) первичная опухоль начинала пальпироваться лишь со 2-й недели канцерогенеза, при этом ее средний объем практически сразу становился равным 1,0 см^3, тогда как у контрольных мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu (2-я группа) первичная опухоль хорошо прощупывалась уже на первой неделе злокачественного роста, но при этом ее размер был не больше размера горошины (см. табл. 1, 2). Наши результаты согласуются с данными ряда авторов [2, 7], свидетельствующими о том, что нокаут по урокиназе приводит к замедлению как роста первичной опухоли, так и процесса метастазирования.

На фоне ХНБ у животных линии C57BL/6 (1-я группа) меланома появлялась на неделю раньше контроля, при этом у самцов ее первоначальные размеры были гораздо меньше (в 11,7 раза), чем у самок, и не достигали объема 1,0 см^3 (см. табл. 1, 2). У нокаутных мышей (2-я группа), меланома на фоне ХНБ, напротив, начинала определяться на неделю позже, чем у контрольной подгруппы, а ее размер был более 1,0 см^3 (см. табл. 1, 2).

В целом, если сравнивать размеры первичных опухолей у всех мышей на 2-й неделе канцерогенеза – сроке, когда опухолевый узел определялся уже у всех животных, то у самцов как без ХНБ, так и на ее фоне не было статистически значимой разницы между обычными животными и мышами с генетическим нокаутом по uPA, при этом средний объем опухолей составлял около 1,5 см^3 (см. табл. 1). Что касается самок как с нормальным, так и измененным геномом, то у мышей без боли размер опухолей был меньше, чем у мышей с развитием злокачественного процесса на фоне ХНБ: у самок линии C57BL/6 – в 1,9 раза ($p < 0,05$), у самок линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu – в 7,2 раза, при этом объем опухолей у контрольных самок без боли с нокаутом по гену *uPA* не превышал 0,5 см^3 и был в 2,6 раза меньше, чем у контрольных самок без боли с нормальным генотипом; самки из основных подгрупп (с ХНБ) по размеру опухолей, который в среднем превышал 1,5 см^3, статистически значимо не отличались друг от друга (см. табл. 2).

В дальнейшем у животных 1-й группы опухоль увеличивалась в объеме вплоть до их гибели: без боли – до четвертой недели злокачественного роста, на фоне ХНБ – до 3-й недели (см. табл. 1, 2). У контрольных генно-модифицированных самцов (2-я группа) без боли опухоль резко увеличивалась в объеме (в 160,0 раз) на 2-й неделе, не изменялась на 3-й неделе и давала повторный скачок роста в 3,1 раза на 4-й неделе канцерогенеза, накануне их гибели (см. табл. 1). У контрольных самок без боли из 2-й группы подкожная опухоль практически не росла и к 4-й неделе канцерогенеза не превышала объем 1,0 см^3

(см. табл. 2). Динамика роста опухолей у мышей с измененным геномом из основной подгруппы, вне зависимости от пола, была одинаковой – такой же, как и в контрольной подгруппе у мышей линии C57BL/6 – увеличение объема со 2-й по 4-ю неделю канцерогенеза. В результате у мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu с ХНБ (2-я группа) размеры первичных опухолей были статистически значимо больше, чем у соответствующего контроля: у самцов на 3-й неделе канцерогенеза – в 2,8 раза, на 4-й неделе – в 1,3 раза ($p < 0,05$), у самок на 3-й неделе канцерогенеза – в 144,0 раза, на 4-й неделе – в 8,8 раза (см. табл. 1, 2).

Следовательно, динамика роста первичного опухолевого узла у мышей линии C57BL/6, за исключением незначительных нюансов, была практически одинаковой как у самцов, так и у самок, при этом мыши с ХНБ на 3-й неделе канцерогенеза имели такой же размер опухолей, как и животные без боли, однако последние оставались живыми на одну неделю больше и погибали при размере опухолевого узла более 5,0 см^3. У мышей с нокаутом по гену *uPA* динамика роста меланомы зависела от половой принадлежности: у самок опухоли практически не росли, а их размер был минимальным, тогда как у самцов опухоли характеризовались достаточно активным ростом, а их размер на 4-й неделе канцерогенеза не отличался от значений нормальных мышей. ХНБ стирала гендерные особенности у мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu, усиливая рост опухолей у всех мышей вне зависимости от их пола, при этом размеры опухолей на 4-й неделе канцерогенеза становились более 7,5 см^3 как у самцов, так и у самок (см. табл. 1, 2).

Наличие кровоизлияний в органах и особенности метастазирования. У мышей линии C57BL/6 кровоизлияний не было, тогда как у мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu они регистрировались: у контрольных самцов – в легких и сердце, у самцов с ХНБ кровоизлияния в легких сочетались с инволюцией тимуса, у самок с ХНБ отмечались только кровоизлияния в легких; исключение – контрольные самки, у которых кровоизлияния во внутренних органах отсутствовали (см. табл. 1, 2).

У мышей с нормальным геномом (1-я группа) локусы метастазирования зависели от гендерной принадлежности: у самцов без боли метастазы определялись в легких, у самок без боли – в селезенке (см. табл. 1, 2). ХНБ способствовала распространению метастатического поражения в другие органы: у самцов – в селезенку, у самок – в сердце, легкие, печень и матку. У мышей с генетическим нокаутом (2-я группа) единичные метастазы в легких отмечались только у самок, у самцов меланома не метастазировала (см. табл. 1, 2). ХНБ, как и в группе нормальных мышей, стимулировала метастазирование, при этом у самцов меланома начинала давать метастатические отсевы в легкие и печень, у самок увеличивалось количество метастатических очагов в легких (см. табл. 1, 2).

Следовательно, у мышей с нокаутом по гену *uPA* меланома метастазировала слабо (единичные метастатические очаги в легких, не сочетающиеся с кровоизлияниями, у самок) или не метастазировала вовсе (у самцов, но при этом в их легких и сердце развивались кровоизлияния); ХНБ, как и в группе нормальных мышей, стимулировала метастазирование, инициируя метастатическое поражение легких и печени у самцов на фоне сохранения кровоизлияний в легких, и увеличивая количество метастатических очагов в легких на фоне появления кровоизлияний в них у самок.

Известно, что uPA находится на поверхности опухолевых клеток и сверхэкспрессируется на конечной стадии трансформации злокачественных клеток, которая ответственна за инвазию и метастазирование [20]. Кроме того, uPA участвует в повреждении базальной мембраны и деградации интерстициального белка во время канцерогенеза и отвечает за прогрессирование заболевания [10]. Следовательно, ингибирование uPA может быть использовано при лечении злокачественного процесса для торможения или регрессии опухоли и предотвращения метастазирования. Ингибирование протеолиза в опухолевой ткани способствует ослаблению инвазии опухоли, ангиогенезу и миграции, которые являются основными свойствами злокачественных опухолей, что заслуживает дальнейшего развития [4].

Исторически одним из первых идентифицированных специфических ингибиторов uPA был амилорид, который ограничивает рост опухоли и ангиогенез, что доказано в опытах *in vitro* и модели *in vivo* [9]. Среди множества новых ингибиторов, разработанных рядом исследователей [3, 11], только небольшое количество было переведено в клиническую практику. Одним из них является WX-UK1, также известный как этил-4-[(2S)-3-[3-[(Z)-N′-гидроксикарбамимидоил]фенил]-2-[[2,4,6-три(пропан-2-ил)фенил]сульфониламино]пропаноил]пиперазин-1-карбоксилат, или месупрон, который является одним из наиболее эффективных ингибиторов uPA и в настоящее время находится в I фазе клинических испытаний в случае рака поджелудочной железы и рака молочной железы, с возможностью применения при раке яичников и раке толстой кишки [18, 21]. Кроме того, проведена оценка эффективности и безопас-

ности упамостата, данный ингибитор uPA и его метаболит WX-UK1 показали свою антиметастатическую и противоопухолевую активность на модели аденокарциномы поджелудочной железы крысы CA20948. Аддитивный эффект комбинированной терапии упамостата с гемцитабином наблюдался и на модели опухоли молочной железы BN472 [8].

Другая возможность ингибирования uPA заключается в использовании антител. Так, показано, что опухолевые клетки способны проникать в хорион-аллантоисную мембрану цыпленка и метастазировать из нее в эмбрион, данная способность снижается для клеток карциномы человека, экспрессирующих большое количество uPA во время лечения антителами, направленными на активный сайт uPA, по сравнению с необработанными клетками [20].

И, наконец, генное моделирование. Генно-инженерные мыши успешно используются на протяжении десятилетий при моделировании опухолевого процесса у человека [6]. Использование лабораторных животных способствует созданию соответствующей платформы для проспективных исследований при изучении конкретных гипотез и причинных ассоциаций при заболеваниях человека. Более того, постоянный прогресс в генной инженерии позволяет более точно осуществлять пространственно-временной контроль экспрессии генов, улучшая способность повторять события в канцерогенезе и прогрессировании заболевания [13, 17]. Существуют определенные типы моделей, использующиеся в исследованиях злокачественного процесса, включающие трансгенных мышей, у которых онкогены могут быть конститутивно или условно экспрессированы. В таких моделях гены-супрессоры опухолей могут быть подавлены с использованием традиционных методов, таких как ретровирусная инфекция, микроинъекция ДНК-конструкций и так называемый «направленный на гены» трансгенный подход. На сегодняшний день трансгенные модели стали традиционными и успешно применяются в исследованиях канцерогенеза [12].

В данном исследовании с использованием линейных мышей и нокаутированных по гену *uPA* продемонстрировано протекание двух патологических процессов в сравнительном аспекте и в зависимости от половой принадлежности животных. Мы получили подтверждение влияния нокаута гена *uPA* на опухолевый процесс, а именно подавление роста опухоли и развития метастазов, и постарались обозначить наиболее интересные патофизиологические характеристики злокачественных процессов, протекающих самостоятельно и на фоне хронической нейрогенной боли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, развитие меланомы у мышей с нокаутом по гену *uPA* отличалось от аналогичного злокачественного процесса у мышей с нормальным геномом более ранним появлением первичных опухолевых узлов у всех мышей и ярко выраженными половыми особенностями: у самцов – «скачкообразной» динамикой роста первичных опухолей с двумя пиками увеличения объема – на второй и четвертой неделях, кровоизлияниями в легких и сердце, отсутствием метастазирования; у самок – отсутствием выраженной динамики роста первичных опухолей (максимум – на четвертой неделе, не более 1,0 см^3), единичными метастазами в легких, отсутствием кровоизлияний во внутренних органах. У мышей с измененным геномом нейрогенная боль, как и у обычных мышей, стимулировала рост первичного опухолевого узла и метастазирование, но, в отличие от них, увеличивала срок появления первичных опухолей, уменьшала продолжительность жизни исключительно у самок, при этом большее количество самцов, по сравнению с нормальными, жили дольше трех недель.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Бандовкина В.А., Розенко Л.Я., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А. Некоторые механизмы повышения злокачественности меланомы на фоне хронической боли у самок мышей. *Рос. журн. боли*. 2017; 53 (2): 14–20.

Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kotieva I.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Bandovkina V.A., Rozenko L Ya., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A. Some mechanisms of increasing malignancy of B16/F10 melanoma in female mice with chronic pain. *Rossiyskiy zhurnal boli = Russian Journal of Pain*. 2017; 53 (2): 14–20. [In Russian].

2. Almholt K., Lund L.R., Rygaard J., Nielsen B.S., Danø K., Rømer J., Johnsen M. Reduced metastasis of transgenic mammary cancer in urokinase-deficient mice. *Int. J. Cancer*. 2005; 113 (4): 525–532. doi 10.1002/ijc.20631.

3. Bruncko M., McClellan W.J., Wendt M.D., Sauer D.R., Geyer A., Dalton C.R., Kaminski M.A., Weitzberg M., Gong J., Dellaria J.F., Mantei R., Zhao X., Nienaber V.L., Stewart K., Klinghofer V., Bouska J., Rockway T.W., Giranda V.L. Naphthamidine urokinase plasminogen activator inhibitors with improved pharmacokinetic properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2005; 15: 93–98. doi 10.1016/j.bmcl.2004.10.026.

4. Cathcart J., Pulkoski-Gross A., Cao J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life

to old ideas. *Genes Dis*. 2015; 2: 26–34. doi 10.1016/j.gendis.2014.12.002.

5. Fernández-Lao C., Cantarero-Villanueva I., Fernández-de-las-Peñas C., Del-Moral-Ávila R., Menjón-Beltrán S., Arroyo-Morales M. Widespread mechanical pain hypersensitivity as a sign of central sensitization after breast cancer surgery: comparison between mastectomy and lumpectomy. *Pain Med*. 2011; 12 (1): 72–78. doi 10.1111/j.1526-4637.2010.01027.

6. Frese K.K., Tuveson D.A. Maximizing mouse cancer models. *Nat. Rev. Cancer*. 2007; 7 (9): 645–58. doi 10.1038/nrc2192.

7. Gutierrez L.S., Schulman A., Brito-Robinson T., Noria F., Ploplis V.A., Castellino F.J. 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.

8. Heinemann V., Ebert M.P., Laubender R.P., Bevan P., Mala C., Boeck S. Phase II randomised proof-of-concept study of the urokinase inhibitor upamostat (WX-671) in combination with gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with non-resectable, locally advanced pancreatic cancer. *Br. J. Cancer*. 2013; 108 (4): 766–770. doi 10.1038/bjc.2013.62.

9. *Jankun J., Keck R.W., Selman S.H*. Epigallocatechin-3-gallate prevents tumor cell implantation/growth in an experimental rat bladder tumor model. *Int. J. Oncol*. 2014; 44: 147–152. doi 10.3892/ijo.2013.2174.

10. *Jankun J., Selman S.H., Aniola J., Skrzypczak-Jankun E*. Nutraceutical inhibitors of urokinase: Potential applications in prostate cancer prevention and treatment. *Oncol. Rep*. 2006; 16: 341–346.

11. Katz B.A., Sprengeler P.A., Luong C., Verner E., Elrod K., Kirtley M., Janc J., Spencer J.R., Breitenbucher J.G., Hui H., McGee D., Allen D., Martelli A., Mackman R.L. Engineering inhibitors highly selective for the S1 sites of Ser190 trypsin-like serine protease drug targets. *Chem. Biol*. 2001; 8: 1107–1121. doi 10.1016/S1074-5521(01)00084-9.

12. Lampreht Tratar U., Horvat S., Cemaza M. Transgenic mouse models in cancer research. *Front. Oncol*. 2018; 8: 268. doi 10.3389/fonc.2018.00268.

13. Lewandoski M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet*. 2001; 2 (10): 743–755.

14. Mahmood N., Mihalcioiu 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.

15. Malfliet A., Leysen L., Pas R., Kuppens K., Nijs J., van Wilgen P., Huysmans E., Goudman L., Ickmans K. Modern pain neuroscience in clinical practice: applied to post-cancer, paediatric and sports-related pain. *Braz. J. Phys. Ther*. 2017; 21 (4): 225–232. doi 10.1016/j.bjpt.2017.05.009.

16. Ogilvie L.A., Kovachev A., Wierling C., Lange B.M., Lehrach H. Models of models: a translational route for cancer treatment and drug development. *Front. Oncol*. 2017; 7: 219. doi: 10.3389/fonc.2017.00219.

17. Pérez-Guijarro E., Day C.P., Merlino G., Zaidi M.R. Genetically engineered mouse models of melanoma. *Cancer*. 2017; 123 (S11): 2089–2103. doi 10.1002/cncr.30684.

18. Schmitt M., Harbeck N., Brünner N., Jänicke F., Meisner C., Mühlenweg B., Jansen H., Dorn J., Nitz U., Kantelhardt E.J., Thomssen C. Cancer therapy trials employing level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1. *Exp. Rev. Mol. Diagn*. 2011; 11: 617–634. doi 10.1586/erm.11.47.

19. Walrath J.C., Hawes J.J., van Dyke T., Reilly K.M. Genetically engineered mouse models in cancer research. *Adv. Cancer Res*. 2010; 106: 113–164. doi 10.1016/S0065-230X(10)06004-5.

20. Wyganowska-Świątkowska M., Tarnowski M., Murtagh D., Skrzypczak-Jankun E., Jankun J. Proteolysis is the most fundamental property of malignancy and its inhibition may be used therapeutically (Review). *Int. J. Mol. Med*. 2018; 43 (1): 15–25. doi 10.3892/ijmm.2018.3983.

21. Zengel P., Ramp D., Mack B., Zahler S., Berghaus A., Muehlenweg B., Gires O., Schmitz S. Multimodal therapy for synergic inhibition of tumour cell invasion and tumour-induced angiogenesis. *BMC Cancer*. 2010; 10: 92. doi 10.1186/1471-2407-10-92.

Сведения об авторах:

Франциянц Е.М., д.б.н., проф., ORCID ID: http://orcid.org/0000-0003-3618-6890, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Каплиева И.В., к.м.н., ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-3972-2452, e-mail: kaplirina@yandex.ru
Сурикова Е.И., к.б.н., ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-4318-7587, e-mail: sunsur2000@mail.ru
Нескубина И.В., к.б.н., ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7395-3086, e-mail: neskubina.irina@mail.ru
Бандовкина В.А., к.б.н., ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-2302-8271, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Трепитаки Л.К., ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-9749-2747, e-mail: legolab69@yandex.ru
Лесовая Н.С., ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-5686-8659, e-mail: n.chugunova@bk.ru
Черярина Н.Д., ORCID ID: http://orcid.org0000-0002-3711-8155, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Погорелова Ю.А., к.б.н., ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-2674-9832, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Немашкалова Л.А., ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2713-8598, e-mail: tilde09@rambler.ru

Information about authors:

Frantsiyants E.M., doctor of biological sciences, professor, ORCID ID: http://orcid.org/0000-0003-3618-6890, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Kaplieva I.V., candidate of medical sciences, ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-3972-2452, e-mail: kaplirina@yandex.ru
Surikova E.I., candidate of biological sciences, ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-4318-7587, e-mail: sunsur2000@mail.ru
Neskubina I.V., candidate of biological sciences, ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7395-3086, e-mail: neskubina.irina@mail.ru
Bandovkina V.A., candidate of biological sciences, ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-2302-8271, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Trepitaki L.K., ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-9749-2747, e-mail: legolab69@yandex.ru
Lesovaya N.S., ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-5686-8659, e-mail: n.chugunova@bk.ru
Cheryarina N.D., ORCID ID: http://orcid.org0000-0002-3711-8155, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Pogorelova Yu.A., candidate of biological sciences, ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-2674-9832, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Nemashkalova L.A., ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2713-8598, e-mail: tilde09@rambler.ru