

Wzrost i inwazja komórek raka piersi związana jest z aktywacją plazminogenu do plazminy, która bezpośrednio lub za pośrednictwem metaloproteinaz degradowuje wiele składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1) może poprzez regulację plazminogenezy wpływać na procesy związane ze wzrostem i progresją nowotworu.

Celem pracy była ocena stężenia PAI-1 w ekstraktach tkanek raka piersi w porównaniu do prawidłowych tkanek gruczołu piersiowego oraz analiza zmiany stężeń PAI-1 w tkankach nowotworowych w zależności od wybranych czynników prognostycznych.

Badaniami objęto 30 kobiet w wieku 39–81 (średnio 58) lat, z rozpoznaniem raka piersi, leczonych w Centrum Onkologii w Bydgoszczy. Fragmenty tkanek pobierano z guza nowotworowego usuniętego podczas zabiegu wraz z marginesem lub całym gruczołem piersiowym. Do porównania stężeń PAI-1 z wyciągów z tkanek raka piersi służyły tkanki makroskopowo prawidłowe położone w odległości ok. 2 cm od guza. Stężenia PAI-1 badano metodą immunoenzymatyczną ELISA przy użyciu komercyjnego zestawu. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono istotnie wyższe stężenia PAI-1 w wyciągach tkankowych raka piersi w porównaniu do prawidłowych tkanek gruczołu piersiowego. Stężenie PAI-1 w tkance nowotworowej było również istotnie wyższe w grupie guzów o gorszym rokowaniu, tj. o zaawansowaniu T2 oraz bez obecnych receptorów estrogenowych w tkance nowotworowej. Na podstawie przeprowadzonych badań potwierdzono udział PAI-1 w patogenezie raka piersi.

Słowa kluczowe: rak piersi, plazminogeneza, inhibitor aktywatorów plazminogenu typu – 1 (PAI-1).

Inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1) w wyciągach tkankowych raka piersi

Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in tissue extracts of breast cancer

Elżbieta Pietrusińska¹, Maria Kotschy², Ewa Ziółkowska¹

¹Dział Radioterapii, Centrum Onkologii w Bydgoszczy

²Katedra i Zakład Patofizjologii, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

WSTĘP

Inhibitor aktywatorów plazminogenu typu-1 (PAI-1) jest glikoproteiną, hamującą tkankowy (t-PA) i urokinazowy aktywatora plazminogenu (u-PA). Syntetyzowany jest przez komórki śródbłonna, fibroblasty, megakariocyty, hepatocyty, płytki krwi oraz przez komórki nowotworowe [1–3]. PAI-1 może wpływać na migrację komórek nowotworowych poprzez blokowanie ich połączenia z witronektyną, jednym ze składników macierzy zewnątrzkomórkowej [1]. PAI-1, inaktywując u-PA, chroni komórki nowotworowe przed proteolizą [4, 5]. Wysokie stężenie PAI-1 często łączy się z niekorzystnym rokowaniem i świadczy o wzroście inwazyjności takich nowotworów, jak rak piersi [6], szyjki macicy [7], żołądka [8] i płuc [9].

CELE PRACY

1. Ocena stężeń PAI-1 w wyciągach tkankowych raka piersi w porównaniu do prawidłowych tkanek gruczołu piersiowego.
2. Analiza stężeń PAI-1 w wyciągach tkankowych raka piersi w zależności od wybranych czynników prognostycznych.

MATERIAŁ I METODYKA

Badaniami objęto 30 kobiet, w wieku 39–81 (średnio 58) lat, chorych na raka piersi. Pacjentki były hospitalizowane i leczone w Centrum Onkologii w Bydgoszczy.

W tab. 1. przedstawiono liczbę badanych chorych w poszczególnych stopniach zaawansowania, opartego na klasyfikacji TNM oraz ocenie zawartości receptorów hormonalnych w tkance nowotworowej.

Fragmenty tkanek uzyskiwano z guza nowotworowego usuniętego wraz z marginesem, względnie

Tab. 1. Charakterystyka badanej grupy chorych na raka piersi
Table 1. Characteristics of examined patients with breast cancer

Parametry	Liczba chorych
stopień T	
T 1	12
T 2	18
stopień N	
N 0	14
N 1	12
N 2	4
receptory ER	
ujemne	12
dodatnie	18
receptory PgR	
ujemne	15
dodatnie	15

The growth and invasion of breast cancer are connected with the activation of plasminogen into plasmin degrading, directly or indirectly, through the metalloproteinases many components of extracellular matrix. Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) may influence processes connected with tumor growth and progression through the regulation of plasmin generation.

The aim of the work was to evaluate the concentration of PAI-1 in tissue extracts of breast cancer and compare it to normal breast tissues. The changes of PAI-1 concentration in cancer tissues depending on selected prognostic factors in breast cancer were also analyzed. The study involved 30 women with breast cancer aged between 39 and 81 (on average 58) treated in the Oncological Centre in Bydgoszcz. The fragments of tissues were taken from malignant tumors extracted during surgery together with the surrounding tissue or the whole breast. The basis of comparison was extracts from breast cancer tissues and macroscopically normal breast tissues located about 2 cm from the tumor. The concentration of PAI-1 in tissue extracts was determined using the enzyme immuno-assay kit (ELISA).

A significantly higher concentration of PAI-1 was noticed in tissue extracts of breast cancer compared to normal breast tissues. The concentration of PAI-1 in cancer tissues was significantly much higher in tumors with worse prognosis, which in a group with advanced tumors is T2 and without estrogen receptors.

Our study confirmed that PAI-1 takes part in the pathogenesis of breast cancer.

Key words: breast cancer, plasminogenesis, plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1).

całym gruczołem piersiowym podczas zabiegu tumorektomii lub mastektomii. Tkanki stanowiące grupę porównawczą uzyskiwano z tkanki makroskopowo prawidłowej położonej w odległości ok. 2 cm od guza.

Pooperacyjne fragmenty zamrażano w temperaturze -40°C i poddano je homogenizacji za pomocą ciekłego azotu. Stężenie antygenu PAI-1 mierzono metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu zestawu Imulyse™ (firmy Biopool, Szwecja). Stężenia PAI-1 przeliczano na miligram białka oznaczonego w ekstraktach z tkanek prawidłowych i nowotworowych gruczołu piersiowego. Zgodę na przeprowadzenie badań, otrzymano od Komisji Etyki Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Bydgoszczy.

Normalność rozkładu stężeń PAI-1 sprawdzono testem W Shapiro-Wilka. Do oceny różnic między grupami użyto testu U Manna-Whit-

neya (dla zmiennych niezależnych) oraz testu Wilcoxon (dla zmiennych zależnych). Do opisu statystycznego zmiennych użyto mediany oraz kwartyła Q1 i Q3. Korelację między badanymi cechami sprawdzono, obliczając współczynnik korelacji Spermmana (r_s) z wyznaczeniem istotności tego współczynnika. Za istotną statystycznie przyjęto wartość $p \leq 0,05$.

WYNIKI

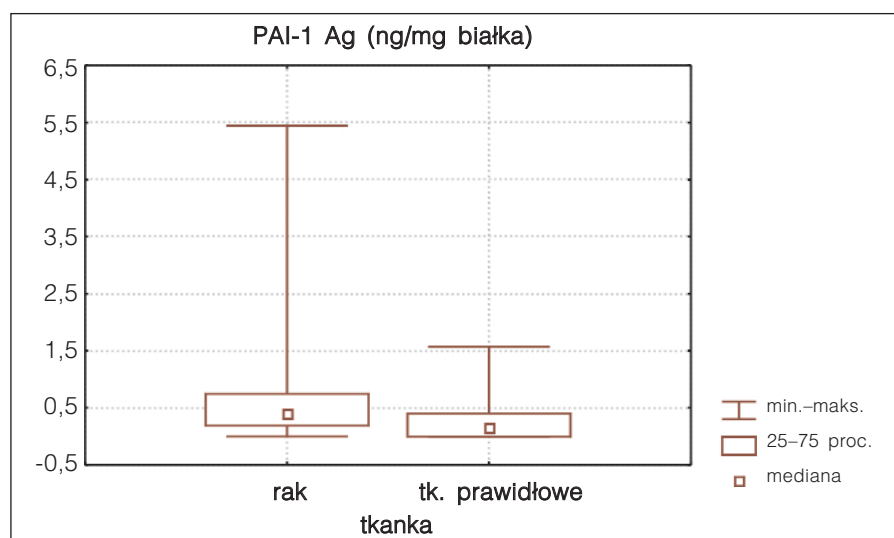
W tab. 2. i na ryc. przedstawiono stężenia PAI-1 w postaci mediany i kwartyła w wyciągach tkankowych raka piersi w porównaniu do prawidłowych tkanek gruczołu piersiowego.

Jak wynika z danych zamieszczonych w tab. 2., stężenie PAI-1 jest istotnie wyższe w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki prawidłowej ($p = 0,01$). Tabelę 2. ilustruje rycina, na której można zauważyć duży rozrzut wartości stę-

Tab. 2. Stężenie PAI-1 Ag [ng/mg białka] w wyciągach z tkanek raka piersi i prawidłowych tkanek gruczołu piersiowego

Table 2. The concentration of PAI-1 Ag [ng/mg of protein] in extracts from breast cancer and normal breast tissues

Parametry		Tkanka raka	Tkanka prawidłowa	p
PAI-1 Ag	N	30	30	
[ng/mg	Me	0,40	0,14	0,0139
białka]	Q1	0,18	0,01	
	Q3	0,73	0,40	



Ryc. Stężenie PAI-1 Ag [ng/mg białka] w wyciągach z tkanek raka piersi i prawidłowych tkanek gruczołu piersiowego

Fig. The concentration of PAI-1 Ag [ng/mg of protein] in extracts from breast cancer and normal breast tissues

zeń oraz wyższą medianę PAI-1 w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki prawidłowej.

Stężenia PAI-1 w tkance nowotworowej poddano analizie w zależności od czynników kliniczno-patologicznych stanowiących podstawę oceny zaawansowania i rokowania w raku piersi. Dane te przedstawiono w tab. 3.

Stężenia PAI-1 nie różniły się statystycznie istotnie w obydwu grupach wiekowych, w grupie bez przerzutów (N-) i z przerzutami do węzłów chłonnych (N+) oraz w grupie bez receptorów (PgR-) i z obecnymi receptorami progesteronowymi (PgR+). Mediana stężenia PAI-1 była natomiast statystycznie istotnie wyższa w grupie guzów o większym zaawansowaniu, tj. T2 w porównaniu do T1 oraz w grupie o gorszym rokowaniu, tzn. bez obecnych receptorów estrogenowych (grupa ER-). Dodatkowo przeprowadzono analizę korelacji między stężeniem PAI-1 a wielkością guza. Wykazano istotną statystycznie, dodatnią korelację między tymi wielkościami ($R_s=0,4$, $p=0,03$).

OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

Na początku lat 90. XX w. rozpoczęto badania nad powiązaniem zmian w poziomach stężeń aktywatorów i inhibitorów fibrylizy w tkankach raka piersi z rokowaniem ocenianym na podstawie całkowitego czasu przeżycia (OS – *overall survival*) i czasu przeżycia wolnego od wznowy (DFS – *disease free survival*) [6, 10, 11].

Mimo że nie uzyskano potwierdzenia przydatności czynników układu fibrylizy jako czynników predykcyjnych [12], to wzrost stężenia niektórych z nich, np. PAI-1 i u-PA, u pacjentek bez zajętych węzłów chłonnych, może być uznany za dodatkowy niepomyślny czynnik rokowniczy. Tę grupę chorych powinno się więc kwalifikować do włączenia agresywnego leczenia uzupełniającego [13–17].

Tab. 3. Stężenie PAI-1 Ag [ng/mg białka] w tkance nowotworowej w zależności od wybranych czynników prognostycznych raka piersi
Table 3. The concentration of PAI-1 Ag [ng/mg of protein] in extracts from breast cancer tissues compared with clinicopathological futures

parametry	Stężenie PAI-1 Ag [ng/mg białka]				p
	N	Me	Q1	Q3	
wiek					
≤55 lat	15	0,38	0,15	0,56	0,4307
>55 lat	15	0,48	0,18	0,76	
wielkość guza					
T1 ≤2 cm	11	0,18	0,10	0,38	0,0098
T2 2–5 cm	19	0,50	0,31	0,76	
węzły chłonne					
bez przerzutów N-	15	0,35	0,13	0,56	0,2134
z przerzutami N+	15	0,48	0,21	1,49	
receptory ER					
nieobecne ER -	12	0,53	0,43	0,81	0,0199
obecne ER +	18	0,26	0,13	0,49	
receptory PgR					
nieobecne PgR -	15	0,50	0,18	0,86	0,0779
obecne PgR +	15	0,31	0,13	0,49	

W pracy przeprowadzono pomiary stężenia PAI-1 w tkance nowotworowej raka piersi i tkance makroskopowo prawidłowej, pobranej z obrzeża guza. Przedstawione w tab. 2. i na ryc. wyniki wykazują znamienne wyższe stężenie tego parametru w guzie w porównaniu do tkanki prawidłowej ($p=0,01$). W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac, omawiających podobne porównania, a uzyskane dane dotyczą jedynie nowotworów innych narządów. Osmak i wsp. stwierdzili w tkankach raka macicy znacznie wyższe stężenie PAI-1 w stosunku do prawidłowych tkanek tego narządu [18]. Podobne zależności obserwowali Salden i wsp. w niedrobnokomórkowym raku płuca oraz Baker i wsp. w raku jelita grubego [9, 19].

W następnym etapie pracy oceniono stężenia PAI-1 w tkankach nowotworowych w zależności od wybranych czynników rokowniczych w raku piersi (tab. 3.).

W kategorii wieku nie uzyskano statystycznie istotnej różnicy między grupą do i powyżej 55. roku życia. Podobnie znamiennej różnicy między grupami wiekowymi nie obserwowano w badaniach Rha i wsp. [20] oraz Knoop i wsp. [21].

Następnym czynnikiem rokowniczym, wziętym pod uwagę, była wielkość guza. Mediany stężeń były istotnie statystycznie wyższe u pacjentek z mniej korzystnym rokowaniem, tj. w grupie z guzami o zaawansowaniu T2 w porównaniu do grupy z guzami T1. Potwierdzeniem wpływu wielkości guza na stężenie PAI-1 jest wykazana przez nas dodatnia, istotna korelacja między rozmiarem guza a stężeniem tego parametru. Nasze wyniki są zgodne z większością danych z piśmiennictwa. W pracy opublikowanej w 1998 r. Knoop i wsp. oceniali zależność stężenia PAI-1 od wielkości guza u 400 pacjentek. Stwierdzili oni dodatnią korelację między obydwojema parametrami [21]. W badaniach prospektywnych Kim i wsp. ocenili grupę pacjentek bez zajętych węzłów chłonnych, u których jedyną cechą wpływającą istotnie na stężenie PAI-1 był rozmiar guza pierwotnego [16].

Następnym czynnikiem w naszych badaniach porównawczych był stan węzłów chłonnych pod względem obecności lub braku przerzutów. W grupie z obecnymi przerzutami obserwowano nieznamienne wyższe stężenia PAI-1. Podobne wyniki uzyskali Rha

i wsp. [20]. Sumiyoshi i wsp. wykazali, że stężenia te są istotnie wyższe u chorych z przerzutami do węzłów [22]. Knoop i wsp. stwierdzili korelację między wzrastającym stężeniem PAI-1 a liczbą zajętych węzłów [21].

W prowadzonych badaniach stwierdzono statystycznie istotnie wyższe stężenie PAI-1 w grupie bez obecnych receptorów estrogenowych w porównaniu do tkanek guza je posiadających. Natomiast nie wykazano tych różnic w zależności od obecności receptorów progesteronowych. Wyniki naszych badań są zgodne z obserwacjami Knoop i wsp. oraz Rha i wsp. [21, 20]. Natomiast Harbeck i wsp. udowodnili ujemną, istotną korelację między stężeniem PAI-1 a stężeniami zarówno receptorów estrogenowych, jak i progesteronowych [14].

Kilku autorów przeprowadziło badania, które polegały na ocenie DFS i OS, zależnie od stężenia PAI-1. Pacjentki z wyższym niż 11 ng/mg białka stężeniem PAI-1 wykazywały wzrost ryzyka wznowy miejscowej i skrócenie całkowitego czasu przeżycia [21, 23].

Harbeck i wsp. także potwierdzili istotny wpływ poziomu PAI-1 na czas do wznowy procesu chorobowego i czas całkowitego przeżycia. U pacjentek z węzłami wolnymi od przerzutów, stężenie PAI-1 było bardzo silnym czynnikiem prognostycznym dla DFS [24].

WNIOSKI

1. W wyciągach tkankowych raka piersi stwierdzono istotnie wyższe stężenie PAI-1 w porównaniu do prawidłowej tkanki gruczołu piersiowego, co potwierdza możliwość udziału tego czynnika w procesie nowotworzenia raka piersi.
2. W zależności od czynników prognostycznych obserwowano istotnie wyższe stężenia PAI-1 w guzach o gorszym rokowaniu, tj. o zaawansowaniu T2 i w grupie bez obecnych receptorów estrogenowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. *The urokinase – type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review*. Int J Cancer 1997; 72: 1-22.
2. Buo L, Bjornland K, Karlsrud TS, et al. *Expression and release of plasminogen activators, their inhibitors and receptor by human tumor cell lines*. Anticancer Res 1994; 14 (6B): 2445-51.
3. De Vries TJ, van Mujien GNP, Ruiters DJ. *The plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis*. Path Res Pract 1996; 192: 718-33.
4. Blasi F, Stoppelli MP. *Proteases and cancer invasion: from belief to certainty AACR meeting on proteases and protease inhibitors in cancer*. Nyborg, Denmark, 14-18 June 1998. Biochem Biophys Acta 1998; 1423: 35-44.
5. Mignatti MP, Rifkin DB. *Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion*. Physiol Rev 1993; 73: 161-95.
6. Groøndahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist Ch, et al. *High levels of urokinase – type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated is poor prognosis*. Cancer Res 1993; 53: 2513-21.
7. Daneri-Navarro A, Macias-Lopez G, Ocegueda Villanueva A, et al. *Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitors (PAI-1 and PAI-2) in extracts of invasive cervical carcinoma and precursor lesions*. Eur J Cancer 1998; 34: 566-9.
8. Ho CH, Chao Y, Lee SD, et al. *Diagnostic and prognostic values of plasma levels of fibrinolytic markers in gastric cancer*. Thromb Res 1998; 91: 23-7.
9. Salden M, Splinter TA, Peters HA, et al. *The urokinase-type activator plasminogen system in resected non small-cell lung cancer*. Rotterdam Oncology Thoracic Study Group. Ann Oncol 2000; 11: 327-32.
10. Harbeck N, Thomssen C, Berger U, et al. *Invasion marker PAI-1 remains a strong prognostic factor after long term follow-up both for primary breast cancer and following first relapse*. Breast Cancer Res Treat 1999; 54: 147-57.
11. Jänicke F, Schmitt M, Pache L, et al. *Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong, independent prognostic factors in node-negative breast cancer*. Breast Cancer Res Treat 1993; 195-208.
12. Pierga JY, Lainé Bidron C, Beuzeboc P, et al. *Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is not related to response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer*. Br J Cancer 1997; 76: 537-40.
13. Billgren AM, Rutqvist LE, Johansson H, et al. *The role of cathepsin D and PAI-1 in primary invasive breast cancer as prognosticators and predictors of treatment benefit with adjuvant tamoxifen*. Eur J Cancer 2000; 36: 1374-80.
14. Harbeck N, Berger U, Kruger A, et al. *Prognostic impact of proteolytic factors (urokinase type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1 and cathepsins D, B and L) in primary breast cancer reflects effects of adjuvant systemic therapy*. Clin Cancer Res 2001; 7: 2757-64.
15. Jänicke F, Prechtel, Thomssen C. *Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1*. J Natl Cancer Inst 2001; 93: 913-20.
16. Kim JS, Shiba E, Kobayashi T, et al. *Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator (PA), PA inhibitor type-1 and tissue type PA antigen levels in node-negative breast cancer: a prospective study on multicenter basis*. Clin Cancer Res 1998; 4: 177-82.
17. Look MP, van-Putten WL, Duffy MJ, et al. *Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients*. J Natl Cancer Inst 2002; 94: 116-28.
18. Osmak M, Babic D, Abramic M, et al. *Plasminogen activator inhibitor type 2: potential prognostic factor for endometrial carcinomas*. Neoplasma 2001; 48: 462-7.
19. Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. *Plasminogen activator system, vascular endothelial growth factor and colorectal cancer progression*. Mol Pathol 2000; 53: 307-12.
20. Rha SY, Yang WI, Gong SJ, et al. *Correlation of tissue and blood plasminogen activation system in breast cancer*. Cancer Lett 2000; 150: 137-45.
21. Knoop AS, Andreasen PA, Andersen JA, et al. *Prognostic significance of UPA and PAI-1 in primary breast cancer*. Br J Cancer 1998; 77: 932-40.
22. Sumiyoshi K, Baba S, Sakaguchi S, et al. *Increase in levels of plasminogen activator and type-1 plasminogen activator inhibitor in human breast cancer: possible roles in tumor progression and metastasis*. Thromb Res 1991; 63: 59-71.
23. Fersis N, Krainick U, Frise H, et al. *Prognostic value of plasminogen activator inhibitor type 1 and 2 in primary breast cancer*. Eur J Cancer 1998; 34: 23-29.
24. Harbeck N, Alt U, Berger U, et al. *Long-term follow-up confirms prognostic impact of PAI-1 and cathepsin D and L in primary breast cancer*. Int J Biol Markers 2000; 15: 79-83.

ADRES DO KORESPONDENCJI

lek. Elżbieta Pietrusińska
Dział Radioterapii
Centrum Onkologii
ul. Romanowskiej 2
85-796 Bydgoszcz