

# РАСТВОРИМАЯ ФОРМА ГЛИКОПРОТЕИНОВОГО ЛИГАНДА P-СЕЛЕКТИНА 1 В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

**П. В. Царапаев, Е. А. Короткова, А. А. Алферов, Е. С. Герштейн, М. А. Барышникова, Ю. Г. Паяниди, К. И. Жордания, Н. Е. Кушлинский**

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

**Цель исследования.** Сравнительный анализ содержания растворимой формы гликопротеинового лиганда P-селектина 1 (sPSGL-1) в плазме крови практически здоровых доноров и больных раком яичников.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования послужила плазма крови 64 первичных больных раком яичников в различных стадиях опухолевого процесса и плазма крови 16 здоровых доноров (группа контроля). Количественную оценку содержания sPSGL-1 в плазме крови определяли с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа: RayBio®, Human PSGL-1 (CD162), ELISA Kit (США).

**Результаты.** Выявлено статистически значимое снижение уровня sPSGL-1 в плазме крови у пациенток с серозной аденокарциномой яичников по сравнению с группой контроля, а также статистически значимое увеличение концентрации маркера при эндометриоидной аденокарциноме, чем при серозной.

**Заключение.** Снижение концентрации sPSGL-1 в плазме крови больных серозной аденокарциномой яичников по сравнению с эндометриоидной, вероятно, обусловлено разной степенью миграции лимфоцитов к очагу воспаления в первичной опухоли.

**Ключевые слова:** рак яичников, sPSGL-1, плазма крови.

## SOLUBLE FORM OF P-SELECTIN 1 GLYCOPROTEIN LIGAND IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH OVARIAN CANCER

**P. V. Tsarapaev, E. A. Korotkova, A. A. Alferov, E. S. Gershteyn, M. A. Baryshnikova, Yu. G. Payanidi, K. I. Zhordania, N. E. Kushlinskiy**

Federal State Budgetary Institution "N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

**Objective of the study** is to carry out a comparative analysis of the content of soluble form of P-selectin glycoprotein ligand 1 (sPSGL-1) in blood plasma of practically healthy donors and patients with ovarian cancer.

**Materials and methods.** The material for the research was blood plasma obtained from 64 patients with primary ovarian cancer at different stages of tumor process and blood plasma of 16 healthy donors (a control group). Quantitative assessment of the content of soluble form of P-selectin glycoprotein ligand 1 (sPSGL-1) in the blood plasma was carried out using RayBio® Human PSGL-1 (CD162) ELISA Kit for direct enzyme immunoassay test (USA).

**Results.** Statistically significant decrease of soluble form of P-selectin glycoprotein ligand 1 (sPSGL-1) level in blood plasma of patients with ovarian serous adenocarcinoma compared to the control group, as well as statistically significant increase in the concentration of marker associated rather with endometrioid adenocarcinoma, than with the serous one were revealed.

**Conclusion.** The increase in the concentration of soluble form of P-selectin glycoprotein ligand 1 (sPSGL-1) in blood plasma of patients with ovarian serous adenocarcinoma compared to the endometrioid one is likely due to varying degrees of migration of lymphocytes to an area of inflammation in primary tumor.

**Keywords:** ovarian cancer, soluble form of P-selectin glycoprotein ligand 1 (sPSGL-1), blood plasma.

## Введение

Гликопротеиновый лиганд Р-селектина 1 (PSGL-1) представляет собой трансмембранный белок размером 120 кДа, который, в первую очередь, экспрессируется в виде гомодимера на лимфоидных и миелоидных клетках, включая тромбоциты. PSGL-1 связывает Р-, Е- и L-селектин через N-конец внеклеточного домена с различным сродством [1–5]. Связывание селектина требует соответствующего гликозилирования, которое зависит от последовательного добавления углеводных фрагментов гликозилтрансферазы, образуя структуру сиалил- $\alpha$ -L-ксилозид (sLex); последний в свою очередь опосредует связывание с селектинами. Несмотря на то, что PSGL-1 экспрессируется на покоящихся Т-клетках, способность к связыванию с селектинами приобретается только во время пролиферации/дифференцировки эффекторных Т-клеток [6, 7].

Впервые идентифицировали, что PSGL-1 регулирует связывание нейтрофилов на активированном эндотелии посредством связывания Р-селектина *in vitro*. Последующие исследования подтвердили его функцию в регулировании миграции макрофагов/моноцитов, плазматических В-клеток, дендритных клеток и Т-клеток путем взаимодействия с селектинами [8]. PSGL-1 — ключевой белок для миграции нейтрофилов, CD8<sup>+</sup> Т-клеток и CD4<sup>+</sup> Т-клеток в различные органы и ткани, подчеркивая его фундаментальную роль в регуляции рекрутирования иммунных клеток в места воспаления [9–11].

Так как одними из основных клеток, участвующих в противоопухолевом ответе, являются Т-клетки (особенно CD8<sup>+</sup> Т-клетки), то чрезвычайно важным является механизм миграции Т-клеток в участки воспаления с помощью белка PSGL-1 [12]. Важность этого взаимодействия в управлении эффекторными Т-клетками продемонстрирована с использованием блокирующих антител к PSGL-1, которые снижали рекрутирование Т-хелперов 1 типа (Th1) в модели гиперчувствительности замедленного типа, а также рекрутирование CD8<sup>+</sup> Т-клеток в сосуды головного мозга пациентов с рассеянным склерозом [13, 14]. Хотя все

Т-клетки экспрессируют PSGL-1, не все эффекторы приобретают способность связывать селектины. Например, клетки Th1 и Th2 активируют и экспрессируют аналогичные уровни PSGL-1 *in vitro*, но только клетки Th1 могут взаимодействовать с Р-селектином [13]. В клетках с дефицитом гена, кодирующего PSGL-1, Th1 не смогли проникнуть в толстую кишку в модели колита, тогда как клетки Th17 эффективно мигрировали без экспрессии PSGL-1; это указывает на то, что субпопуляции Т-клеток могут использовать посттрансляционные модификации на PSGL-1 для дальнейшей тонкой настройки взаимодействия [15]. Таким образом, терминальное гликозилирование PSGL-1 на Т-клетках может определять более зрелые и дифференцированные эффекторы, которые перемещаются к участкам воспаления, где они способствуют разрешению инфекций. Однако, очевидно, что связывание селектина на Т-клетках может динамически регулироваться. Например, в модели контактной чувствительности обнаружено, что Tregs также взаимодействуют с Р-селектином на воспаленном эндотелии через PSGL-1, но эта способность была потеряна при последующем заражении [16]. Хотя CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> эффекторы Т-клеток приобретают способность связываться с Р-селектином, позволяя PSGL-1 вовлекаться и привлекаться к участкам воспаления [17]. Известно, что CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки могут затем терять ферментативную активность гликозилирования по мере получения ответа, и это позволяет предположить, что воспалительные процессы могут контролировать связывание Р-селектина с помощью PSGL-1 на Т-лимфоцитах.

Хотя PSGL-1 участвует в рекрутировании эффекторных Т-клеток и, таким образом, способствует адаптивному иммунному ответу, отрицательные регуляторные функции были также продемонстрированы в исследованиях на нокаутных мышах по PSGL-1 гену. Показано, что Т-клетки экспериментальных животных обладают повышенной пролиферацией и повторной экспрессией полноразмерного или внутриклеточного домена PSGL-1 [18]. Это открытие подчеркивает необходимость передачи сигналов через цитоплазматический хвост

PSGL-1 для его функции в регуляции пролиферации Т-клеток. Также продемонстрировано, что CD8 Т-клетки мышей с нокаутом гена PSGL-1 обладают увеличенной выживаемостью и сниженной экспрессией ингибирующих рецепторов [19]. Кроме того, при инъекции опухолевых клеток у таких мышей развивалась опухоль только в 18–20 % случаев, тогда как у мышей дикого типа в 100 %. Более того, у мышей дикого типа отмечен более быстрый рост опухоли по сравнению с заболевшими мышами с нокаутом гена PSGL-1. Исходя из вышеописанных результатов исследований, представляется перспективным изучение роли PSGL-1 при злокачественных опухолях человека.

Цель данного исследования: проведение сравнительного анализа содержания растворимой формы sPSGL-1 в плазме крови здоровых доноров и больных раком яичников с учетом основных клинических и морфологических характеристик заболевания.

**Материал и методы.** В исследование включены 64 первичных больных раком яичников в возрасте от 18 до 78 лет. У 19 пациенток диагностирована I, у 11 — II, у 33 — III стадии рака яичников. По гистологическому строению подавляющее большинство опухолей охарактеризованы как серозная аденокарцинома (степень дифференцировки G1 (n = 7), G2 (n = 16), G3 (n = 21)), муцинозная аденокарцинома (G1 (n = 4), G2 (n = 3)) и эндометриоидная аденокарцинома (G2 (n = 6), G3 (n = 5)).

В группу контроля входили 16 здоровых доноров в возрасте от 18 до 77 лет. Кровь больных раком яичников и здоровых доноров забирали в стерильные пробирки S-Mononvette, содержащие EDTA. Количественную оценку содержания sPSGL-1 в плазме крови определяли с помощью наборов реактивов для конкурентного иммуноферментного анализа: RayBio®, Human PSGL-1 (CD162), ELISA Kit (США) в соответствии с инструкциями производителя. Содержание маркера выражали в нанogramмах (нг) на 1 мл плазмы крови. Аналитическая чувствительность метода составляет 0,21 нг/мл.

Данные обрабатывали в программе Statistica. При сравнении показателей и анализе их взаи-

мосвязей использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия и корреляции считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Наиболее часто sPSGL-1 был выявлен в плазме крови больных раком яичников (у 50/78,1 %), чем у здоровых доноров (у 5/31,2 %). Уровни маркера у больных раком яичников колебались в широких пределах от 0 до 26,3 нг/мл, при этом отмечена тенденция к снижению медианы концентрации маркера в плазме крови больных раком яичников (1,00 нг/мл) по сравнению с контрольной группой (2,04 нг/мл).

У больных раком яичников исходные медианы уровней sPSGL-1 в плазме крови не зависели от гистологического варианта строения опухоли и составили при серозном раке яичников 0,87 нг/мл, при муцинозном 0,59 нг/мл и эндометриоидном 3,42 нг/мл.

Отмечена тенденция к увеличению концентрации sPSGL-1 в плазме крови больных раком яичников при снижении степени дифференцировки опухоли.

Наиболее высокие уровни маркера выявлены при III стадии рака яичников (1,39 нг/мл), по сравнению с I (0,77 нг/мл) и II (0,98 нг/мл) стадиями. Однако, статистически значимых различий в уровне sPSGL-1 в плазме крови у пациенток с разными стадиями рака яичников не выявлено ( $p > 0,05$ ), так же как и при сравнении с группой контроля ( $p > 0,05$ ).

В тоже время концентрация sPSGL-1 была статистически значимо ниже в группе больных раком яичников с серозной аденокарциномой, по сравнению с группой контроля ( $p < 0,01$ ). При этом у пациенток с эндометриоидной аденокарциномой уровень маркера статистически значимо выше, по сравнению с серозной аденокарциномой ( $p < 0,01$ ).

### Заключение

В настоящем исследовании наиболее часто выявляли sPSGL-1 в плазме крови больных раком яичников (у 50/78,1 %), чем у здоровых доноров (у 5/31,2 %). При этом уровни маркера у больных раком яичников колебались

в широких пределах, а также отмечена тенденция к снижению медианы концентрации sPSGL-1 в плазме крови больных раком яичников, по сравнению с контрольной группой. Кроме того, обнаружено статистически значимое различие в уровнях маркера в плазме крови больных раком яичников с разными гисто-

логическими подтипами опухоли. Так, отмечено снижение уровня sPSGL-1 у больных серозной аденокарциномой, по сравнению с эндометриодной, что, вероятно, обусловлено разной степенью миграции лимфоцитов к очагу воспаления в опухоли. Вопрос о клиническом значении sPSGL-1 требует дальнейшего изучения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Asa D., Raycroft L., Ma L., Aeed P. A., Kaytes P. S., Elhammer A. P., Geng J. G.* The P-selectin glycoprotein ligand functions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectins // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270, N 19. P. 11662–11670.
2. *Guyer D. A., Moore K. L., Lynam E. B., Schammel C. M., Rogelj S., McEver R. P., Sklar L. A.* P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) is a ligand for L-selectin in neutrophil aggregation // *Blood.* 1996. Vol. 88, N 7. P. 2415–2421.
3. *Martinez M., Joffraud M., Giraud S., Baisse B., Bernimoulin M. P., Schapira M., Spertini O.* Regulation of PSGL-1 interactions with L-selectin, P-selectin, and E-selectin: role of human fucosyltransferase-IV and -VII // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, N 7. P. 5378–5390.
4. *Sako D., Comess K. M., Barone K. M., Camphausen R. T., Cumming D. A., Shaw G. D.* A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding // *Cell.* 1995. Vol. 83, N 2. P. 323–331.
5. *Tu L., Chen A., Delahunty M. D., Moore K. L., Watson S. R., McEver R. P., Tedder T. F.* L-selectin binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes: interactions between the lectin, epidermal growth factor, and consensus repeat domains of the selectins determine ligand binding specificity // *J. Immunol.* 1996. Vol. 157, N 9. P. 3995–4004.
6. *Wagers A. J., Kansas G. S.* Potent induction of alpha(1,3)-fucosyltransferase VII in activated CD4+ T cells by TGF-beta 1 through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway // *J. Immunol.* 2000. Vol. 165, N 9. P. 5011–5016.
7. *Carlow D. A., Williams M. J., Ziltener H. J.* Inducing P-selectin ligand formation in CD8 T cells: IL-2 and IL-12 are active in vitro but not required in vivo // *J. Immunol.* 2005. Vol. 174, N 7. P. 3959–3966.
8. *Nunez-Andrade N., Lamana A., Sancho D., Gisbert J. P., Gonzalez-Amaro R., Sanchez-Madrid F., Urzainqui A.* P-selectin glycoprotein ligand-1 modulates immune inflammatory responses in the enteric lamina propria // *J. Pathol.* 2011. Vol. 224, N 2. P. 212–221.
9. *Borges E., Eytner R., Moll T., Steegmaier M., Campbell M. A., Ley K., Mossmann H., Vestweber D.* The P-selectin glycoprotein ligand-1 is important for recruitment of neutrophils into inflamed mouse peritoneum // *Blood.* 1997. Vol. 90, N 5. P. 1934–1942.
10. *Asaduzzaman M., Mihaescu A., Wang Y., Sato T., Thorlacius H.* P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 mediate rolling of activated CD8+ T cells in inflamed colonic venules // *J. Investig. Med.* 2009. Vol. 57, N 7. P. 765–768.
11. *Martin-Fontecha A., Baumjohann D., Guarda G., Reboldi A., Hons M., Lanzavecchia A., Sallusto F.* CD40L+ CD4+ memory T cells migrate in a CD62P-dependent fashion into reactive lymph nodes and license dendritic cells for T cell priming // *J. Exp. Med.* 2008. Vol. 205, N 11. P. 2561–2574.
12. *Sako D., Comess K. M., Barone K. M., Camphausen R. T., Cumming D. A., Shaw G. D.* A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding // *Cell.* 1995. Vol. 83, N 2. P. 323–331.
13. *Borges E., Tietz W., Steegmaier M., Moll T., Hallmann R., Hamann A., Vestweber D.* P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin // *J. Exp. Med.* 1997. Vol. 185, N 3. P. 573–578.
14. *Battistini L., Piccio L., Rossi B., Bach S., Galgani S., Gasperini C., Ottoboni L., Ciabini D., Caramia M. D., Bernardi G., Laudanna C., Scarpini E., McEver R. P., Butcher E. C., Borsellino G., Constantin G.* CD8+ T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: a critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1 // *Blood.* 2003. Vol. 101, N 12. P. 4775–4782.
15. *Brown J. B., Cheresh P., Zhang Z., Ryu H., Managlia E., Barrett T. A.* P-selectin glycoprotein ligand-1 is needed for sequential recruitment of T-helper 1 (Th1) and local generation of Th17 T cells in dextran sodium sulfate (DSS) colitis // *Inflamm. Bowel Dis.* 2012. Vol. 18, N 2. P. 323–332.
16. *Abeynaike L. D., Deane J. A., Westhorpe C. L.V., Chow Z., Alikhan M. A., Kitching A. R., Issekutz A., Hickey M. J.* Regulatory T cells dynamically regulate selectin ligand function during multiple challenge contact hypersensitivity // *J. Immunol.* 2014. Vol. 193, N 10. P. 4934–4944.
17. *Xie H., Lim Y. C., Luscinskas F. W., Lichtman A. H.* Acquisition of selectin binding and peripheral homing properties by CD4(+) and CD8(+) T cells // *J. Exp. Med.* 1999. Vol. 189, N 11. P. 1765–1776.

18. *Matsumoto M., Miyasaka M., Hirata T.* P-selectin glycoprotein ligand-1 negatively regulates T-cell immune responses // *J. Immunol.* 2009. Vol. 183, N 11. P. 7204–7211.

19. *Tinoco R., Carrette F., Barraza M. L., Otero D. C.* PSGL-1 Is an Immune Checkpoint Regulator that Promotes T Cell Exhaustion // *Immunity.* 2016. Vol. 44, N 6. P. 1470.

### АВТОРЫ

*Царапаев Павел Валерьевич*, лаборант-исследователь, лаборатория клинической биохимии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: pcarapaev96@gmail.com

*Tsarapaev Pavel V.*, Research Laboratory Assistant, Laboratory of Clinical Biochemistry of Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: pcarapaev96@gmail.com

*Короткова Екатерина Андреевна*, старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, лаборатории клинической биохимии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: katinka-kor@yandex.ru

*Korotkova Ekaterina A.*, Senior Research Fellow, Ph.D. in Biological Sciences, Laboratory of Clinical Biochemistry of Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: katinka-kor@yandex.ru

*Алферов Александр Андреевич*, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клинической биохимии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, email: aleksandr.alferov@yahoo.com

*Alferov Alexander A.*, Clinical pathologist, Laboratory of Clinical Biochemistry of Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, email: aleksandr.alferov@yahoo.com

*Герштейн Елена Сергеевна*, доктор биологических наук, профессор, лаборатория клинической биохимии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: esgershtein@gmail.com

*Gershtein Elena S.*, M.D., Ph.D. in Biological Sciences, Prof., Laboratory of Clinical Biochemistry of Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: esgershtein@gmail.com

*Барышниковая Мария Анатольевна*, заведующая лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, кандидат фармацевтических наук, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: ma\_ba@mail.ru

*Baryshnikova Maria A.*, Ph.D. in Pharmaceutical Sciences, Head of Laboratory of experimental diagnostics and biotherapy of tumors of Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: ma\_ba@mail.ru

*Паяниди Юлия Геннадиевна*, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник онкологического отделения хирургических методов лечения № 8 (онкогинекология) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: paian-u@yandex.ru

*Payanidi Ulia G.*, M.D., Ph.D. in Medical Sciences, Department of Gynecologic oncology of Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: paian-u@yandex.ru

*Жордания Кирилл Иосифович*, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник онкологического отделения хирургических методов лечения № 8 (онкогинекология) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: kiazoz2@yandex.ru

*Zhordania Kirill I.*, M. D., Ph.D. in Medical Sciences, Prof., Department of Gynecologic oncology of Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: kiazoz2@yandex.ru

*Кушлинский Николай Евгеньевич*, доктор медицинских наук, профессор, Академик РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: kne3108@gmail.com

*Kushlinskii Nikolay E.*, M. D., Ph.D. in Medical Sciences, Prof., Member of Russian Academy of Sciences, Head of Laboratory of Clinical Biochemistry of Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: kne3108@gmail.com