

УДК 557.3.4*24'142
©Коллектив авторов

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ И ИХ ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ: (обзор собственных данных)

Н.И. Соловьева, О.С. Тимошенко, Т.А. Гуреева, Е.В. Кузнецкая*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; тел.: (495)246-5072; факс: (495)245-0857;
эл. почта: Nina.Solovyeva@ibmc.msk.ru

Обобщены результаты собственных многолетних исследований особенностей экспрессии матриксных металлопротеиназ (ММП) и их эндогенных регуляторов в трансформированных онкогеном E7 HPV-16 фибробластах (ТФ), immortalized фибробластах (ИФ), на линиях клеток, ассоциированных с HPV-16 и HPV-18; на клинических образцах опухолевых тканей плоскоклеточной карциномы шейки матки (ПКШМ), ассоциированных с HPV-16 Трансфекция фибробластов онкогеном E7 HPV16, сопровождалась индукцией экспрессии генов коллагеназ – ММП-1, ММП-14 и желатиназы ММП-9 и увеличением их активности; экспрессия желатиназы ММП-2 существенно не изменялась. Экспрессия ММП коррелировала с опухолевым потенциалом трансформированных клонов; экспрессия ММП-9 обнаружена только в ТФ; экспрессия мРНК ингибитора коллагеназ TIMP-1 в ТФ снижалась, а экспрессия ингибитора желатиназ – TIMP-2 увеличивалась. В ИФ незначительно увеличивалась активность коллагеназ и экспрессия мРНК коллагеназы ММП-14, активность желатиназ не изменялась. Деструктивный потенциал ТФ обусловлен индукцией экспрессии коллагеназ, желатиназы ММП-9 и снижением уровня ингибиторов ММП. ММП-9 может служить маркером ТФ. Инвазивный потенциал в линиях HeLa и C4-1, ассоциированных с HPV18, более выражен, чем в линиях SiHa и Caski, ассоциированных с HPV16. Экспрессия мРНК коллагеназ ММП-1, ММП-14, и активатора – uAP в большинстве исследованных линий клеток увеличивалась; экспрессия мРНК желатиназы ММП-2 и ингибиторов существенно не изменялась. Активность ММП-2 в линиях Caski и HeLa увеличивалась, экспрессия ММП-9 в линиях клеток не обнаружена. Увеличение деструктивного потенциала в клеточных линиях обусловлено увеличением экспрессии коллагеназ и низким уровнем экспрессии ингибиторов ММП. Сравнительное исследование экспрессии ММП, проведенное на ассоциированных с E7 HPV16 образцах опухолей ПКШМ в присутствии или отсутствии метастазов, показало, что основной вклад в инвазивный и метастатический потенциалы опухолей вносит увеличение экспрессии коллагеназ ММП-1, ММП-14, желатиназы ММП-9 и снижение экспрессии ингибиторов TIMP-1, TIMP-2, и в меньшей степени – увеличение экспрессии ММП-2. ММП-1 и ММП-9 могут служить маркерами инвазивного и метастатического потенциала опухолей при ПКШМ. В прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани обнаружена существенная экспрессия ММП-1, ММП-2, ММП-9, что вносит свой дополнительный вклад в увеличение деструктивного потенциала опухоли.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы (ММП), тканевые ингибиторы ММП (ТИМП), активатор плазминогена (uAP), вирус папилломы человека (HPV), плоскоклеточная карцинома шейки матки

DOI: 10.18097/PBMC20156106694

ВВЕДЕНИЕ

Матриксные металлопротеиназы (ММП) относятся к семейству цинковых кальций-зависимых металлопротеиназ, функция которых связана с обменом белков соединительнотканного матрикса (СТМ).

Известно 25 ММП, которые, исходя из данных по субстратной специфичности и структурной организации, можно разделить на следующие семейства: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины, мембраносвязанные ММП и неклассифицированные ММП [1-6]. ММП являются

* - адресат для переписки

индуцируемыми протеиназами, большинство из которых относятся к секретируемым ферментам (кроме мембраносвязанных) [3, 5, 6]. В настоящее время ММП обнаружены и внутри клеток [7]. Эти ферменты в совокупности способны гидролизовать все компоненты СТМ. Кроме того, они выполняют важные регуляторные функции, активируя, инактивируя и модифицируя свойства целого ряда биологически активных молекул [6, 8-11]. Особое место отводится ММП в развитии процессов инвазии и метастазирования опухолей [1, 8, 12-15]. Тканевые коллагеназы (ММП-1, ММП-8, ММП-13, ММП-14), наряду с желатиназами (ММП-2, ММП-9), играют решающую роль в развитии этих процессов [1, 2, 4, 6, 8]. Они специфически гидролизуют белки группы коллагена, которые составляют 25% от общего белка организма человека. Коллагеназы гидролизуют фибриллярные коллагены I, II, III, V и IX типов, которые устойчивы к действию протеолитических ферментов. Они специфически расщепляют одну связь, находящуюся на расстоянии одной четвёртой длины полипептидной цепи молекулы коллагена с С-конца [5, 6]. Продукты гидролиза способны денатурировать в физиологических условиях и подвергаться действию широкого спектра протеиназ, тем самым ММП запускают и обеспечивают развитие деструктивного процесса. Желатиназы осуществляют гидролиз коллагена IV типа – основу базальных мембран. Этим двум группам ферментов принадлежит ключевая роль в разрушении соединительно-тканного барьера при развитии инвазивного и метастатического процессов [8, 10-13, 16]. ММП отвечают за образование целого ряда биологически активных молекул, участвующих в регуляции онкологического процесса [9-12]. Основными активаторами про-ММП являются сериновые протеиназы: плазмин (для секретируемых ММП) и фурин (для мембраносвязанных ММП, к которым относится ММП-14) [5, 6]. Активность плазмينا оценивают косвенно по активности тканевого активатора пламиногена – уАП. Фурин активирует про-ММП в аппарате Гольджи. Активность ММП в тканях регулируется специфическими тканевыми ингибиторами – ТИМП-1, ТИМП-2, ТИМП-3 и ТИМП-4. Они обладают избирательной специфичностью, однако могут ингибировать активность всех членов семейств ММП. В крови основным ингибитором ММП является α 2-макроглобулин [6, 9, 13, 17, 18].

Наши исследования были посвящены изучению особенностей экспрессии коллагеназ, желатиназ и их эндогенных регуляторов при плоскоклеточной карциноме шейки матки (ПКШМ). Этиологическим фактором возникновения рака шейки матки являются вирусы папиллом (HPV) высокого риска [20, 21]. По статистике распределение основных генотипов HPV в России таково: HPV-16 – 64,4%, HPV-18 – 9,6%, HPV-45 – 7,9%. На долю остальных онкогенных типов HPV приходится порядка 17% [19]. Рак шейки матки занимает второе место, после рака молочной железы, по частоте заболеваемости и смертности

от рака у женщин [17, 20, 21]. Установлено, что основными трансформирующими генами вирусов папиллом человека являются гены E6 и E7. У 90% больных раком шейки матки транскрипты генов E6 и E7 обнаруживаются в биопсийном материале. Продукты этих генов полифункциональны. Они могут взаимодействовать с белками клеточных генов-супрессоров: p53 и продуктом гена ретинобластомы (Rb105) [21-26]. Однако их функциональный потенциал недостаточно изучен, тогда как изменение протеолитического потенциала при трансформации клеток этим вирусом может служить важным маркером злокачественности [20-26]. Исследование особенностей экспрессии ММП при ПКШМ проводятся в основном на клеточных линиях и связаны с изучением инвазивного и метастатического потенциала клеток, в то время как работы на клиническом материале достаточно малочисленны, несмотря на то, что они позволяют оценить деструктивный потенциал опухолевой ткани, что может иметь прогностическое значение [27-30].

Наши основные исследования были направлены на изучение особенностей экспрессии коллагеназ (ММП-1, ММП-14), желатиназ (ММП-2, ММП-9), их тканевых ингибиторов – ТИМП-1 и ТИМП-2, а также активатора – уАП. С учётом многочисленных данных, свидетельствующих о существенном различии результатов, получаемых на клетках и клиническом материале [20, 21, 26], работа проведена: (1) на фибробластах, трансформированных путём трансфекции гена E7 HPV-16 в интактные клетки; (2) на коммерчески доступных линиях клеток, ассоциированных с HPV-16 и HPV-18; (3) на клинических образцах ПКШМ, ассоциированных с геном E7 HPV-16.

Подобный подход позволил оценить влияние E7 HPV-16 на трансформацию и потенциал ММП на уровне ТФ, клеточных линий ПКШМ и на уровне организма при использовании клинического материала.

1. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОНКОГЕНА E7 HPV-16 НА ЭКСПРЕССИЮ КОЛЛАГЕНАЗ, ЖЕЛАТИНАЗ И ИХ ЭНДОГЕННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ПРИ ТРАНСФОРМАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ

Исследование проведено на модели эмбриональных фибробластов крысы линии Фишер, разработанной в лаборатории молекулярной биологии вирусов ОНЦ имени Н.Н. Блохина. Модель включала стадии immortalization и трансформации. Immortalized клетки (ИФ) получены в результате трансфекции гена LT – большого антигена вируса полиомы в эмбриональные фибробласты (ПФ), а в результате последующей трансфекции в ИФ гена E7 HPV-16 получены трансформированные фибробласты (ТФ), из которых отобрано два клон trF8 и trB4, а также клон trF8nmcc, который получен в результате отбора на животных [31-34].

Исследование туморогенных свойств клеток, проведённое нами на сингенных крысах линии

Фишер, показало, что по степени выраженности туморогенности клоны можно расположить в следующем порядке $trF8nmcc > trF8 > trB4$. Гистологический анализ, проведенный в лаборатории канцерогенных веществ Института канцерогенеза ОНЦ имени Н.Н. Блохина, показал, что это – злокачественная гистиоцитома. В качестве контроля использовали первичную культуру эмбриональных фибробластов (ПФ) [34].

В ТФ и ИФ проведено сравнительное исследование экспрессии коллагеназ – ММП-1 и ММП-14, желатиназ А и Б – ММП-2 и ММП-9, а также их тканевых ингибиторов – ТИМП-1, ТИМП-2 и активаторов – ММП-14 (как коллагеназы и как активатора ММП-2) и уАП (активатора секретируемых ММП). Работа проведена с использованием метода обратной полимеразной цепной реакции – ОТ-ПЦР, энзиматических методов – зимографии и определения активности желатиназ (по гидролизу меченого ^{14}C -ацетилированного коллагена IV типа) и коллагеназ (по гидролизу флуорогенного коллагена I типа).

1.1. Экспрессия коллагеназ – ММП-1 и МТ1-ММП, желатиназ – ММП-2 и ММП-9 и их эндогенных регуляторов

1.1.1. Экспрессия генов коллагеназ и их регуляторов [35]

Уровень экспрессии мРНК ММП-14 в ТФ и ИФ увеличивался по сравнению с ПФ (в 2-3 раза по данным денситометрии) (рис. 1). Данные по экспрессии мРНК ММП-1 в фибробластах крысы отсутствуют, так как не удалось подобрать праймеры для этого фермента. Ген ММП-1 крысы не секвенирован, а подбор праймеров на основе последовательности гена ММП-1 человека не дал результатов. Из полученных

данных следует, что процессы как иммортализации так и трансформации указанным геном сопровождаются увеличением экспрессии ММП-14. По своим ферментативным свойствам ММП-14 сходна с ММП-1; её считают ММП-1, связанной с мембраной [22]. Активность этого фермента проявляется в перичеллюлярном пространстве не только как фермента, специфически гидролизующего коллаген базальных мембран, а также фибриллярные коллагены, но и как активатора желатиназы А – ММП-2 [1, 2, 6, 22]. Таким образом, происходит концентрирование активности ММП-14 и ММП-2 на инвазирующих участках клеточной поверхности, что является не менее важным свойством, чем уровень экспрессии ММП, в частности ММП-14. Экспрессия мРНК ингибитора коллагеназ – ТИМП-1 была снижена во всех трех клонх ТФ (в 1,5-2 раза) по сравнению как с ПФ, так и ИФ, где она не изменялась (рис. 1А,Б), что может способствовать увеличению активности ММП-1 и ММП-14. Увеличение экспрессии мРНК активатора ММП уАП (в 1,5-2 раза) происходило только в ИФ, в то время как в ТФ она находится на уровне ПФ. Таким образом, трансформация фибробластов геном E7 HPV16 сопровождается индукцией экспрессии мРНК коллагеназы ММП-14 и снижением экспрессии ингибитора коллагеназ – ТИМП-1 в то время как экспрессия активатора ММП остаётся на уровне ПФ. Следует подчеркнуть, что увеличение экспрессии мРНК ММП-14 происходит уже на уровне иммортализации в ИФ, в то время как уровень экспрессии ТИМП-1 в ИФ остаётся на уровне ПФ, то есть ИФ могут проявлять увеличенную коллагенолитическую активность по сравнению с ПФ. Следовательно, при трансформации фибробластов наблюдается индукция экспрессии ММП-14 и снижение экспрессии её ингибитора, что направлено на увеличение активности коллагеназ.

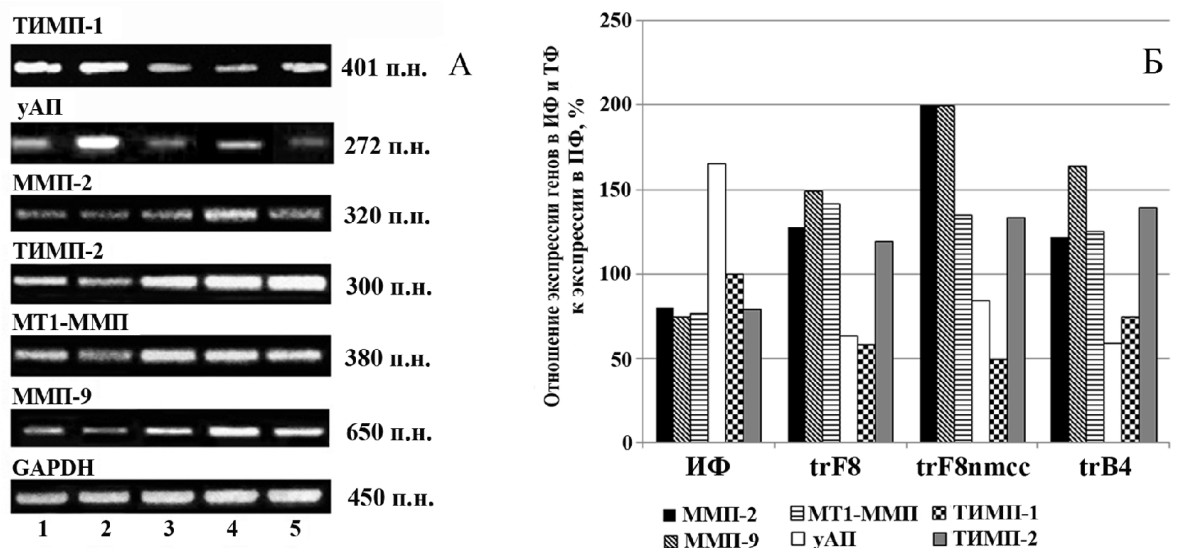


Рисунок 1. (А) - Экспрессии мРНК генов ММП-2, ММП-9, МТ1-ММП, ТИМП-1, ТИМП-2 и уАП. Количество кДНК, вносимое в реакцию соответствовало равному количеству продукта гена GAPDH для каждого клона клеток: 1. ПФ (REF); 2. IE5; 3. trF8; 4. trF8nmcc; 5. trB4. (Б) - Уровни экспрессии генов ММП и их регуляторов в иммортализованных фибробластах (ИФ) и трансформированных фибробластах (ТФ - trF8, trF8nmcc, trB4) к экспрессии в первичных фибробластах (ПФ). Уровень экспрессии в ПФ принят за 100%.

1.1.2. Коллагенолитическая активность [35]

Исследование коллагенолитической активности ММП (по гидролизу коллагена I типа) показало (рис. 2А,Б), что в ТФ активность ММП (как секретируемая, так и в лизатах клеток) увеличена по сравнению с ИФ (в 2-3 раза), причем уровень активности в лизатах (рис. 2Б), где находится мембраносвязанная ММП-14, был значительно ниже, чем в кондиционированной среде, где находится ММП-1 (рис. 2А). Следует подчеркнуть, что в ИФ также была обнаружена коллагенолитическая активность, но значительно более низкая, чем в ТФ, что согласуется с результатами по экспрессии мРНК в ИФ. Активация про-ММП трипсином приводила к значительному увеличению активности (в 1,5-2 раза), исключение составлял клон trF8nmcc, где активность в лизатах существенно не изменялась по сравнению с ИФ. Эти результаты свидетельствуют о наличии значительного количества ММПз в форме предшественников и проявление их активности в большой степени будет зависеть от наличия активаторов про-ММП и ингибиторов ММП (рис. 2А,Б). Результаты по исследованию свободных эндогенных ингибиторов ММПз в кондиционированной среде свидетельствуют о том, что в ТФ ингибирование выражено в значительно меньшей степени, чем в ИФ, а величины коллагенолитической активности в ТФ значительно выше, чем в ИФ (таблица). Эти результаты согласуются с полученными нами данными по уменьшению экспрессии мРНК ТИМП-1 и увеличению экспрессии коллагеназы ММП-14 в ТФ и ИФ. Данные по исследованию коллагенолитической активности ММП-1 и ММП-14 согласуются с результатами по экспрессии мРНК как ММП-14, так и ТИМП-1.

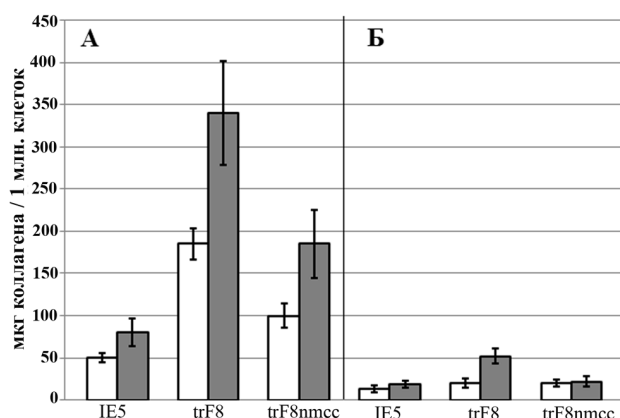


Рисунок 2. Коллагенолитическая активность: (А) - в кондиционированной среде, (Б) - в лизатах клеток. Белые столбики - исходная активность, серые столбики - активность в присутствии трипсина

1.1.3. Экспрессия генов желатиназ и регуляторов их активности [36]

Исследование экспрессии генов желатиназ – ММП-2, ММП-9, их ингибитора – ТИМП-2, а также ММП-14 (как активатора ММП-2) и уАП – активатора ММП-9 свидетельствуют о том (рис. 1А,Б),

Таблица. Коллагенолитическая активность при различных разведениях кондиционированной среды.

Клон клеток	Активность, мкг коллагена / 1млн. клеток* (при различных разведениях кондиционированной среды)		
	1:05	1:02	1:01
IE5	53,03±2,81	60,12±2,25	32,53±3,47
trF8	116,67±14,43	130,0±24,75	98,13±21,83
trF8nmcc	95,93±10,96	113,0±13,73	97,19±18,5

что уровень экспрессии мРНК ММП-9 (в 2-3 раза) существенно повышался только в ТФ; в клетках клона trF8nmcc, обладающих наибольшим опухолевым потенциалом, экспрессия мРНК была наивысшей. Следовательно, ММП-9 может служить маркером при трансформации клеток геном E7 HPV-16. Экспрессия мРНК ММП-2 существенно не изменялась во всех клеточных клонах, кроме клеток клона trF8nmcc, прошедших отбор на животных, где уровень мРНК ММП-2 был выше по сравнению со всеми остальными клонами (в 1,5-3 раза), что указывает на нарушение конститутивного пути регуляции экспрессии гена ММП-2 в данном клоне. Уровень экспрессии мРНК ТИМП-2 (ингибитора ММП-2 и ММП-9) и ММП-14 (активатора ММП-2) в ТФ был увеличен по сравнению с ИФ (в 1,5-2 раза). Следует учитывать, что ТИМП-2 является не только ингибитором желатиназ, но также участвует в активации про-ММП-2, а ММП-14 выступает не только как активатор про-ММП-2, но и гидролизует фибриллярные коллагены и коллаген IV. Таким образом, в перичеллюлярном пространстве происходит увеличение концентрации ММП-2 и ММП-14, что приводит к увеличению деструктивного (инвазивного) потенциала опухолевых клеток. В ИФ уровни экспрессии ММП-2 и ММП-9 не изменялись, а экспрессия ММП-14, ТИМП-2 и уАП, выполняющих важные регуляторные функции, увеличивалась (в 1,5-3 раза) по сравнению с ПФ. Это свидетельствует о том, что уже на стадии иммоуализации происходят изменения в экспрессии генов, регулирующих активность желатиназ, что приводит к нарушению баланса ММП-2, ММП-9/ТИМП-2/МТ1-ММП, свойственного ПФ.

1.1.4. Спектр и активность желатиназ [34, 36]

Для идентификации желатиназ и оценки их активности и спектра использовали метод зимографии с сополимеризованным желатином. Данные зимографии (рис. 3В) показали, что ММП-9 обнаруживается в основном в ТФ, в то время как ММП-2 обнаруживается как в ИФ, так и в ТФ. Активность ММП-2 (по данным денситометрии) в ИФ и ТФ находилась на одном уровне, за исключением клеток клона trF8nmcc, прошедших отбор на животных, где активность ММП-2 была существенно выше (в 2,8-3 раза), что свидетельствует о нарушении конститутивной регуляции экспрессии фермента в данном клоне. Таким образом, трансформация клеток геном E7 HPV-16 приводит к индукции активности ММП-9, что согласуется с данными по экспрессии мРНК желатиназ.

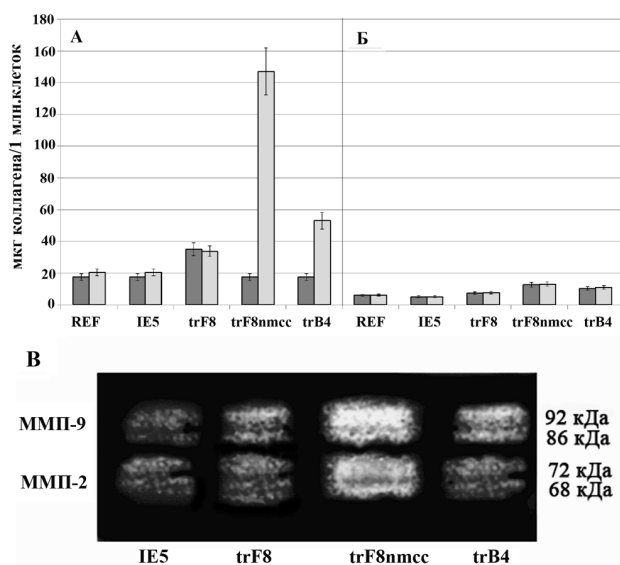


Рисунок 3. Суммарные активности желатиназ (по гидролизу ^{14}C -коллагена IV типа) (А) в кондиционированной среде, (Б) в лизатах клеток. Белые столбики - исходная активность, серые столбики - активность в присутствии трипсина; (В) зимография желатиназ ММП-2 и ММП-9 в 10% ПААГ с 0,1% желатином. ММП-9 (латентная форма - 92 кДа и активированная форма - 86 кДа) и ММП-2 (латентная форма - 72 кДа и активированная форма - 68 кДа).

Исследование суммарной активности желатиназ (по гидролизу ^{14}C -коллагена IV типа) показало, что активность желатиназ увеличивалась только в ТФ (в 2-3 раза), как в кондиционированной среде (рис. 3А), так и в лизатах клеток (рис. 3Б); при этом в клетках клона trF8nmcc, характеризующегося наибольшим опухолевым потенциалом, активность была наивысшей (увеличение в 7-10 раз) по сравнению с ПФ и ИФ, в которых активность была на одном уровне. Изменение активности желатиназ в лизатах носило тот же характер, что и в среде; однако, в лизатах активность была в 3-10 раз ниже. Учитывая данные зимографии по исследованию спектра желатиназ, изменение уровней активности, в зависимости от выраженности опухолевого потенциала, в клонах ТФ можно представить следующим образом: trF8nmcc > trF8 = trB4. Энзимологические данные коррелируют с данными зимографии и с выраженностью опухолевых свойств клеток в опытах *in vivo*. Исследование свободных эндогенных ингибиторов в кондиционированной среде методом разведений по коллагену IV свидетельствуют о том, что эндогенные ингибиторы желатиназ, как и коллагеназ, в значительно большей степени присутствуют в ПФ и ИФ, чем в ТФ, что согласуется с данными по снижению экспрессии мРНК TIMP-1. Полученные результаты подтверждают вывод о том, что ММП-9 может служить маркером ТФ.

Результаты исследований ММП и их регуляторов в фибробластах, а также при трансформации фибробластов в опытах *in vivo*, позволили выделить стадию иммортализации и получить

трансформированные клоны с различным опухолевым потенциалом. Трансфекция фибробластов онкогеном E7 HPV16 сопровождалась: а) индукцией экспрессии генов и активности коллагеназ – ММП-1 и ММП-14; б) увеличением экспрессии мРНК и активности желатиназы ММП-9, происшедшем происходило только в ТФ (экспрессия мРНК ММП-2 не изменялась по сравнению с ПФ и ИФ). Это свидетельствует в пользу того, что ММП-9 может служить маркером ТФ. В ТФ обнаружено снижение экспрессии мРНК ингибитора коллагеназ – TIMP-1 и увеличение экспрессии ингибитора желатиназ – TIMP-2, который выполняет функции как ингибитора, так и активатора про-ММП-2; уровень свободных эндогенных ингибиторов в ТФ был значительно ниже, чем в ИФ. Экспрессия ММП, особенно желатиназ, коррелировала с опухолевым потенциалом клонов. В ИФ обнаружена незначительная экспрессия мРНК ММП14 и активности коллагеназ, а экспрессия желатиназ не изменялась по сравнению с ПФ.

Полученные данные важны для понимания механизмов развития деструктивных (инвазивных) процессов при ПКШМ и указывают на значительное увеличение деструктивного потенциала ТФ за счёт индукции экспрессии коллагеназ и желатиназ, а именно деструктивный процесс характеризует степень злокачественности опухолей.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ КОЛЛАГЕНАЗ, ЖЕЛАТИНАЗ И ИХ ЭНДОГЕННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ В ЛИНИЯХ КЛЕТОК КАРЦИНОМ ШЕЙКИ МАТКИ

Сравнительное исследование особенностей экспрессии ММП проведено на клеточных линиях, ассоциированных с наиболее злокачественными и распространёнными типами вирусов HPV: линии SiHa и Caski, ассоциированные с HPV16; линии HeLa и C4-1 ассоциированные с HPV18. В качестве контроля использовали линию C33A, где HPV отсутствует. Исследование экспрессии ММП включало оценку экспрессии мРНК методом ОТ-ПЦР и определение коллагенолитической активности по гидролизу флуорогенного коллагена I типа и активности желатиназ – методом зимографии.

2.1. Экспрессия генов коллагеназ – ММП-1, ММП-14 и желатиназ – ММП-2 и ММП-9 и эндогенных регуляторов их активности [37]

В линиях клеток HeLa, C4-1, ассоциированных с HPV-18 (рис. 4А, дорожки 4 и 5) экспрессия ММП (рис. 4Б), как правило, была выше, чем в линиях клеток SiHa и Caski, ассоциированных с HPV-16 (рис. 4А, дорожки 1 и 2). В линиях клеток, ассоциированных с обоими типами вирусов, экспрессия коллагеназ – ММП-1 и ММП-14 увеличивалась от 2 до 12 раз; исключение составили клетки линии SiHa (для ММП-1) и HeLa (для ММП-14), где наблюдалось снижение экспрессии указанных ферментов (рис. 4Б,а,в).

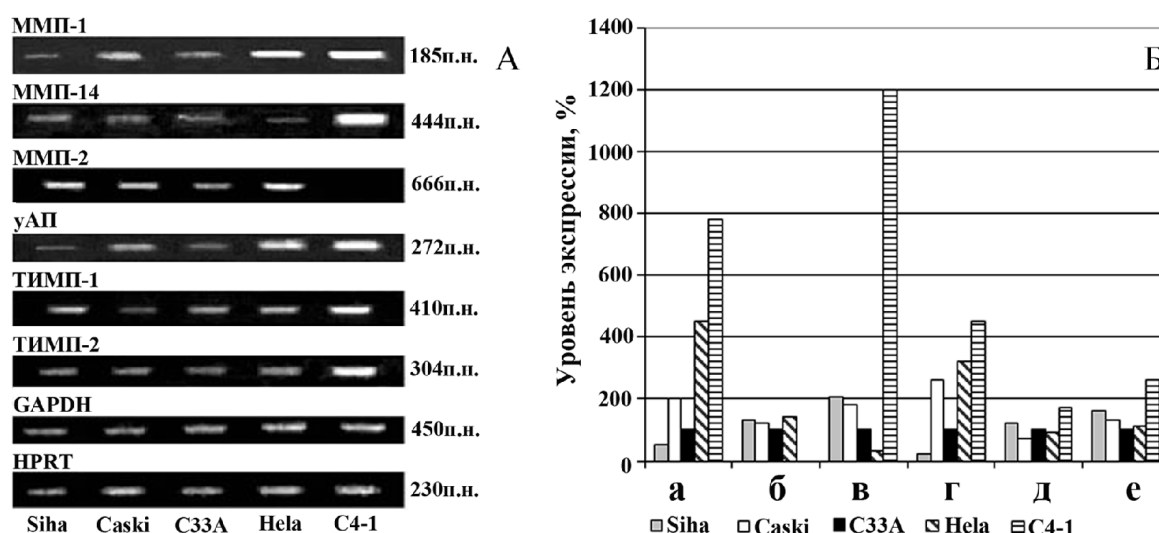


Рисунок 4. Экспрессия м-РНК генов: а - ММП-1, б - ММП-2, в - ММП-14, г - уАП, д - ТИМП-1, е - ТИМП-2 в клеточных линиях: Siha; Caski; C33-A; HeLa; C4-1. Количество к-ДНК, вносимое в реакцию соответствовало равному количеству продукта гена GAPDH (глицеральдегидфосфатдегидрогеназы) и HPRT (гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза) для каждого клона клеток. За 100% принят уровень экспрессии в клеточной линии C33A.

Уровни экспрессии мРНК желатиназы ММП-2 в линиях клеток, ассоциированных с обоими типами вирусов (рис. 4Б,б), существенно не увеличивались, в линии клеток C4-1 ММП-2 отсутствовала. Результаты по экспрессии ММП-9 в клеточных линиях получить не удалось, поскольку праймеры, подобранные к гену ММП-9 человека и дающие положительный результат на клинических образцах, в случае клеточных линий продукта не дали. Экспрессия ингибиторов в основном была в пределах контроля (рис. 4Б,д,е). Исключение составила линия C4-1, где экспрессия ТИМП-1 и ТИМП-2 была увеличена (в 2-2,5 раза). Экспрессия уАП (рис. 4Б,г) увеличена во всех линиях клеток (от 2 до 4,5 раз), кроме Siha, где она была снижена (до 20%) (рис. 4Б,г). Полученные данные свидетельствуют о том, что в линиях клеток существуют некоторые различия в экспрессии мРНК ММП и их регуляторов. Однако в большинстве линий клеток существенно нарушено соотношение фермент/ингибитор/активатор, которое связано с увеличением экспрессии коллагеназ и низкой экспрессией ингибиторов, что приводит к увеличению деструктивного потенциала клеток.

2.2. Исследование коллагенолитической активности [37]

Коллагенолитическая активность ММП-1 и ММП-14 (которую определяли по гидролизу флуорогенного коллагена I типа) обнаружена только в кондиционированной среде (рис. 5А). В лизатах клеток всех исследованных линий обнаружить данную активность не удалось. Это свидетельствует о том, что коллагенолитическая активность в основном связана с ММП-1. Клеточная линия HeLa, ассоциированная с HPV18, обладала более высокой коллагенолитической активностью, чем линии Caski и Siha, ассоциированные с HPV-16 (рис. 5А). Активация про-ММП трипсином

приводила к увеличению активности (в 1,5-2 раза) во всех клеточных линиях, что свидетельствует о наличии значительных количеств ММП в форме предшественников. В клеточных линиях ПКШМ свободных эндогенных ингибиторов в кондиционированной среде не было обнаружено. Основная активность активатора ММП-1 – уАП находилась в лизатах (рис. 5Б). Следует подчеркнуть, что уАП относится к мембраносвязанным ферментам и его активность ассоциирована с лизатами. Активность уАП в клетках HeLa была значительно выше, чем в Caski, где она находилась на уровне контроля, что согласуется с данными по экспрессии мРНК уАП и предполагает существенную роль уАП в активации про-ММП-1.

Данные по исследованию коллагенолитической активности согласуются с данными по экспрессии мРНК и свидетельствуют о том, что: 1) в линиях клеток, трансформированных HPV-18, деструктивный потенциал значительно выше, чем в клетках, трансформированных HPV-16; 2) ММП-1 вносит существенный вклад в деструктивный (инвазивный) потенциал в линиях клеток обоих типов; 3) в кондиционированной среде клеточных линий ПКШМ свободных эндогенных ингибиторов не было обнаружено.

2.3. Исследование спектра и активности желатиназ

Исследование желатиназной активности в кондиционированной среде клеточных линий карцином методом зимографии выявило активность только ММП-2, но не ММП-9, причем в линии HeLa активность была наивысшей, что согласуется с данными по экспрессии мРНК в клеточных линиях (рис. 5В). В лизатах линий клеток, также как и в случае исследования коллагеназной активности, желатиназной активности обнаружено

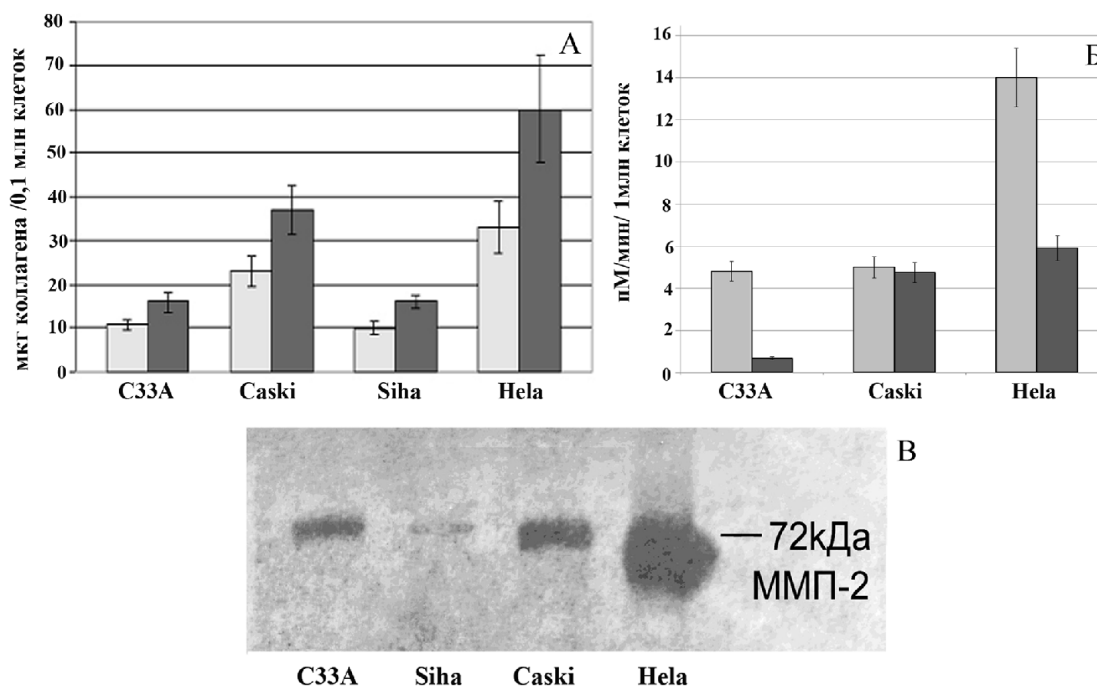


Рисунок 5. (А) - коллагенолитическая активность: светлые столбики - исходная активность, тёмные столбики - активность в присутствии трипсина. (Б) - активность уАП: светлые столбики - в лизатах; тёмные столбики - в среде. (В) - зимография желатиназы в клеточных линиях карцином шейки матки.

не было. Инвазивные и метастатические свойства исследованных клеточных линий, в частности, гидролиз коллагена базальных мембран, могут проявляться за счёт ММП-2, но не ММП-9 [1, 10, 37]. Кроме того, показано, что ММП-2 может гидролизовать и фибриллярные коллагены, хотя и менее эффективно, чем коллагеназы, и участвовать в разрушении соединительнотканного барьера. Полученные нами данные на модельной системе фибробластов крысы свидетельствуют о том, что экспрессия ММП-9 была выражена именно в трансформированных клетках. Наши результаты по экспрессии мРНК и желатиназной активности указывают на отсутствие ММП-9 в исследованных клеточных линиях ПКШМ. С учётом того, что ММП-9 относится к индуцируемым ферментам, а ММП-2 – к конститутивным [5, 6], можно предположить, что отсутствие ММП-9 в исследованных линиях клеток было обусловлено отсутствием факторов, способных активировать экспрессию ММП-9. Данные по отсутствию ММП-9 в клеточных линиях не согласуются с результатами по экспрессии ММП-9 в ТФ крысы, где она являлась маркером ТФ.

Таким образом, сравнительное исследование экспрессии ММП-1,-2,-9,14 и эндогенных ингибиторов этих ферментов ТИМП-1 и ТИМП-2, а также активатора про-ММП-1 – уАП на клеточных линиях карцином шейки матки, ассоциированных с разными типами вирусов, показало, что: а) инвазивный потенциал в клеточных линиях, ассоциированных с HPV18, более выражен, чем в линиях клеток, ассоциированных с HPV16; б) клеточные линии существенно различались

по степени выраженности исследуемых свойств; в) увеличение деструктивного потенциала в большинстве линий клеток связано с увеличением экспрессии мРНК коллагеназ – в основном – ММП-1, а также ММП-14, в то время как экспрессия мРНК ММП-2 существенно не изменялась, в то же время активность ММП-2 в некоторых линиях (Caski и HeLa) увеличивалась, что свидетельствует о возможности нарушения конститутивной регуляции этого фермента; г) экспрессия эндогенных ингибиторов находилась в основном в пределах контроля; д) в кондиционированной среде клеточных линий свободных эндогенных ингибиторов не было обнаружено. Данные по экспрессии мРНК согласуются с данными по энзиматической активности и свидетельствуют о том, что нарушение баланса фермент/ингибитор/активатор приводят к увеличению инвазивного (деструктивного) потенциала в клеточных линиях за счёт увеличения экспрессии коллагеназ и прежде всего ММП-1 и в меньшей степени экспрессии ММП-2, а также низкой экспрессии ингибиторов.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ КОЛЛАГЕНАЗ, ЖЕЛАТИНАЗ И ИХ ЭНДОГЕННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ В ОБРАЗЦАХ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ КАРЦИНОМ ШЕЙКИ МАТКИ

Исследование особенностей экспрессии ММП и деструктивного потенциала опухолевой ткани проведено на образцах ПКШМ, взятых во время операций. Во всех образцах обнаружена экспрессия

ММП и их ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ПРИ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ

гена E7 HPV16. Исследовали экспрессию коллагеназ – ММП-1, ММП-14 и желатиназ – ММП-2, ММП-9, а также регуляторов их активности. Работа проведена с использованием четырёх методов: ОТ-ПЦР, иммуногистохимии, зимографии и определения коллагенолитической активности.

3.1. Экспрессия генов ММП-1, МТ1-ММП, ММП-2, ММП-9 и регуляторов их активности уАП, ТИМП-1 и ТИМП-2 [38-40]

Сравнительные исследования проведены на 36 образцах ПКШМ и 11 образцах морфологически нормальной ткани, прилегающей к опухоли, которые были получены от пациентов ОНЦ имени Н.Н. Блохина в соответствии с правилами, утвержденными Советом ОНЦ. Экспрессию ММП и их регуляторов в образцах опухолевой ткани сравнивали с экспрессией в образцах нормальной ткани. Полученные данные (рис. 6А,Б) свидетельствуют о том, что увеличение экспрессии мРНК коллагеназ и желатиназ наблюдалось в большинстве образцов опухоли (от 60 до 86%). Наиболее выражена была экспрессия ММП-1 (86%). Экспрессия активатора ММП – уАП также была повышена в значительной части образцов (55%), а экспрессия ингибиторов снижена (в 60-90%). Изменения уровней экспрессии мРНК коллагеназ и желатиназ, их ингибиторов и активатора способствовали увеличению деструктивного (инвазивного) потенциала опухолевой ткани.

3.2. Исследование коллагенолитической активности [41]

Коллагенолитическая активность (ММП-1, ММП-14) была обнаружена как в опухоли, так и в прилегающей к опухоли нормальной ткани (рис. 7А). В ряде образцов (1-3) активность в опухоли превышала активность в нормальной ткани (от 1,3 до 2,7 раза). В некоторых образцах (4, 5) наблюдалась обратная картина – активность в нормальной ткани превышала активность в опухоли

(в 3 и 1,4 раза). При этом активность в опухоли была достаточно высокой во всех образцах, а активация трипсином приводила к дальнейшему увеличению активности как в опухолевых, так и в нормальных тканях. Полученные данные свидетельствуют о наличии значительного коллагенолитического потенциала, как в опухолевых так и прилегающих к опухоли нормальных тканях.

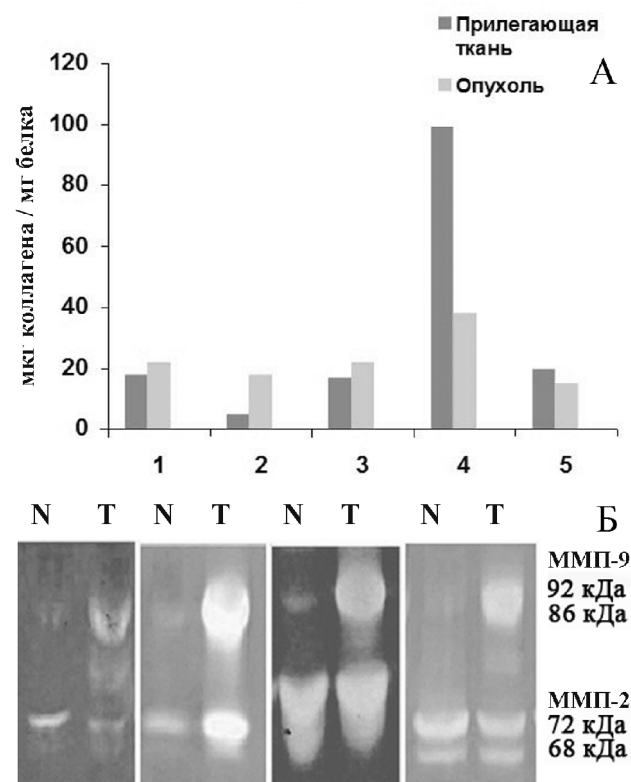


Рисунок 7. Коллагенолитическая (А) и желатиназная (Б) активности в опухолевой и нормальной тканях шейки матки (N-нормальная ткань, Т- опухоль).

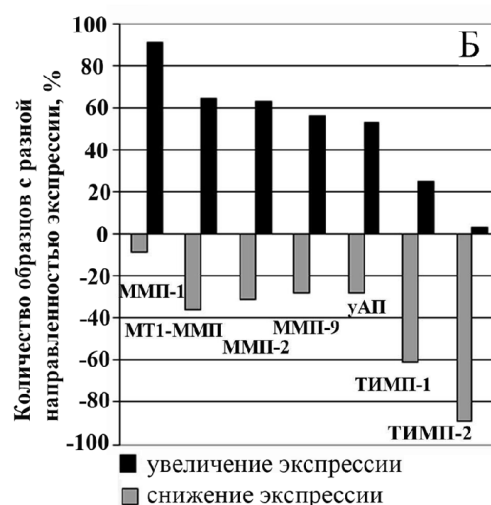
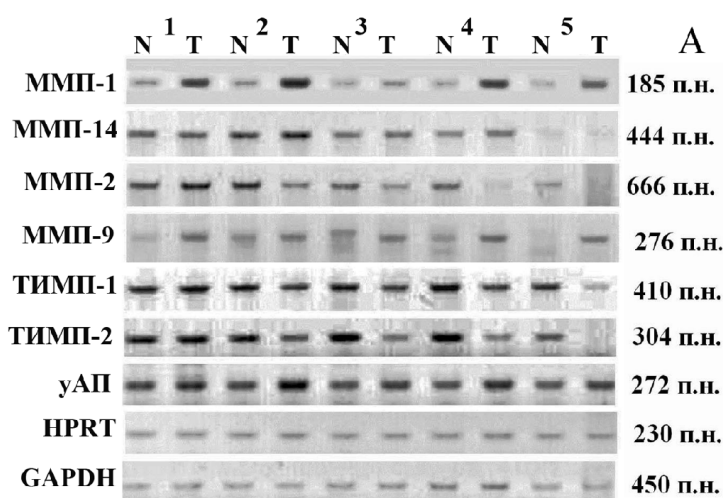


Рисунок 6. Экспрессия генов ММП и их регуляторов (А) и направленность экспрессии (Б) в опухолевой и нормальной тканях шейки матки. N-морфологически нормальная прилегающая к опухоли ткань, Т - ткань опухоли.

3.3. Исследование активности и спектра желатиназ [41, 42]

Исследование спектра и активности ММП-2 и ММП-9 в 19 опухолевых и 15 морфологически нормальных образцах тканей, проведённое методом зимографии, показало, что в большинстве опухолевых тканей (94%) происходит ярко выраженное увеличение активности ММП-9 по сравнению с нормой, где она либо отсутствовала, либо была незначительной (рис. 7Б). Во всех образцах опухоли и нормальной ткани присутствовала ММП-2, причём в некоторых случаях (2-3) в нормальной ткани она была значительно ниже, чем в опухоли, а в некоторых образцах (1, 4, 5) активность в нормальной ткани была на уровне опухоли или несколько выше неё, что указывает на нарушение конститутивной регуляции этого фермента. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экспрессия желатиназ может происходить не только в опухолевых клетках, но и в прилегающей к ним морфологически нормальной ткани, причём увеличение активности ММП-9 в опухолевой ткани ярко выражено (увеличено в 10 и более раз).

3.4. Исследование экспрессии ММП и их регуляторов в зависимости от наличия метастазов [40, 41]

Исследование, проведённое иммуногистохимическим методом (рис. 8) на 11 образцах с неотдалёнными метастазами в лимфатические узлы (М+) и на 13 образцах опухолей без метастазов (М-), показало (рис. 9), что во всех без исключений образцах опухолей с метастазами обнаружена

экспрессия ММП-1, причём в большинстве случаев (80%) экспрессия оценивалась высшими баллами (исходя из бальной шкалы от 0 до 3, принятой для оценки выраженности иммуногистохимической реакции). В образцах без метастазов высокая

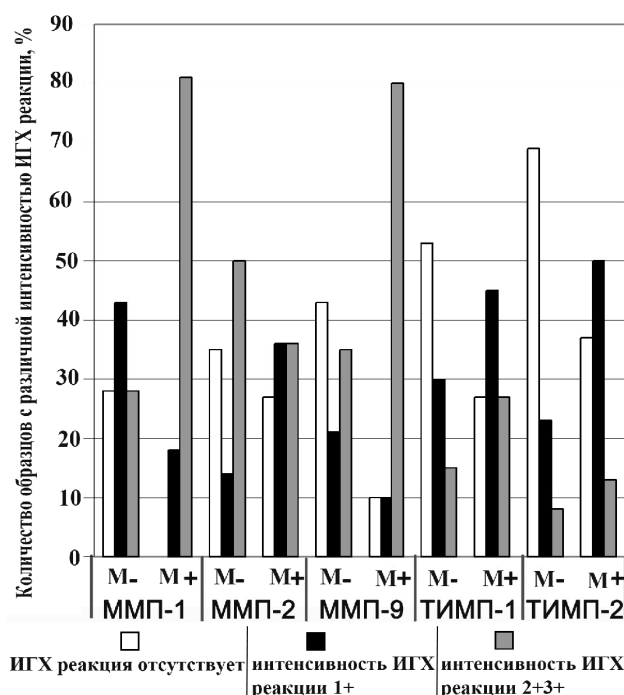


Рисунок 9. Зависимости уровней экспрессии ММП и их ингибиторов от наличия метастазов в образцах карцином шейки матки.

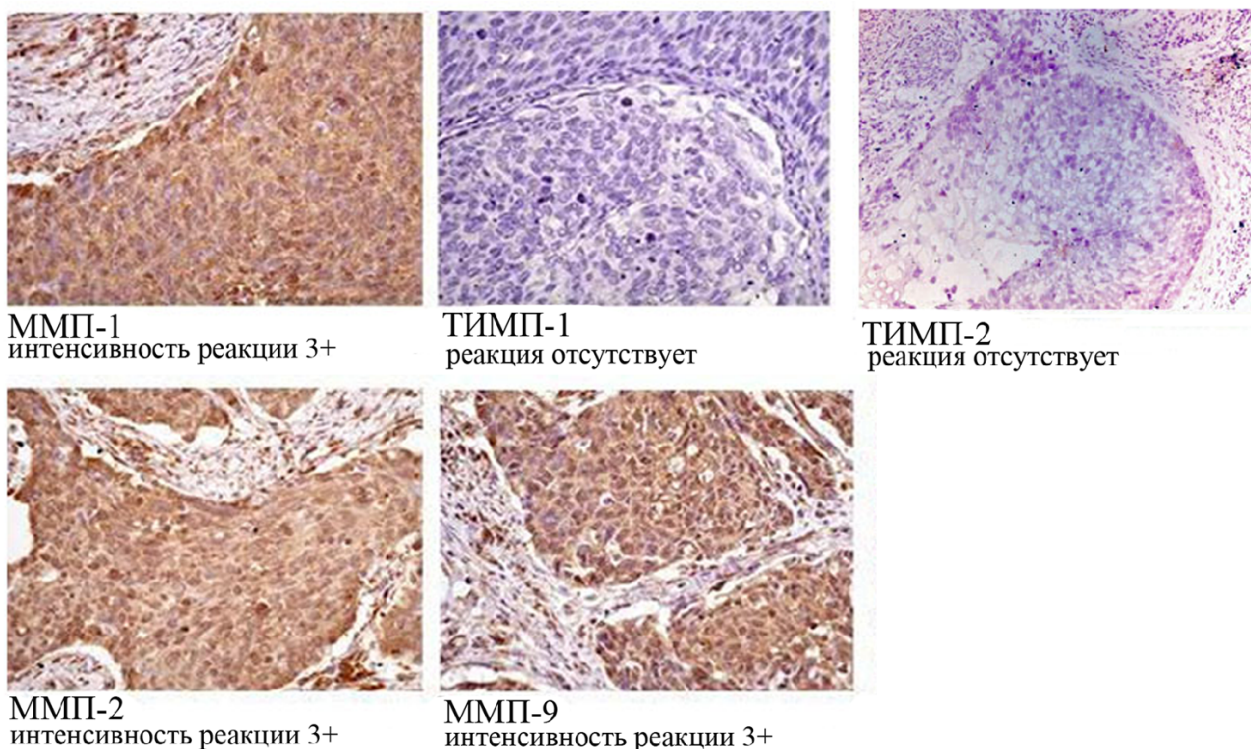


Рисунок 8. Экспрессия ММП-1, ММП-2, ММП-9, ТИМП-1 и ТИМП-2 в образцах плоскоклеточных карцином шейки матки. Увеличение, $\times 400$. 1 - ИГХ реакция присутствует; 2 - ИГХ реакция отсутствует.

экспрессия ММП-1 была обнаружена только в 28% случаев, в остальном же она была низкой или отсутствовала. Экспрессия ММП-9 была обнаружена в 90% образцов, из них в 80% она была наивысшей и оценивалась в 2-3 балла. Выраженных различий в экспрессии ММП-2 в образцах с метастазами и без метастазов обнаружено не было, причем в образцах без метастазов высокая активность ММП-2 была обнаружена даже в большем количестве образцов. Слабая экспрессия ТИМП-1 и ТИМП-2 была обнаружена как в образцах метастазирующих опухолей, так и в опухолях без метастазов.

Корреляционный анализ результатов выявил наличие обратной корреляции между степенью дифференцировки клеток опухоли и высоким уровнем экспрессии ММП-1, ММП-2 и ММП-9, а данные по экспрессии ММП-1 и ММП-9 характеризовались прямой корреляцией с данными о наличии метастазов. Следовательно, высокая активность ММП-1 и ММП-9 имеет прогностическое значение и может служить маркером метастатического потенциала опухоли.

Данные, полученные на опухолевых тканях ПКШМ, свидетельствуют о том, что основной вклад в деструктивный (инвазивный и метастатический) потенциал опухолевой ткани вносит увеличение экспрессии коллагеназ – ММП-1 и ММП-14 и желатиназы – ММП-9, а также снижение экспрессии ингибиторов – ТИМП-1 и ТИМП-2, и в меньшей степени – увеличение экспрессии ММП-2. ММП-1 и ММП-9 могут служить маркерами развития инвазивного и метастатического потенциала при ПКШМ. Более того, в прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани обнаружена существенная экспрессия ММП-1, ММП-2, ММП-9, которая вносит свой дополнительный вклад в увеличение деструктивного потенциала опухоли.

Полученные данные важны для понимания механизма развития как инвазивного, так и метастатического процессов, указывают на важное значительное ММП – коллагеназ и желатиназ, а также регуляторов их активности в развитии деструктивного потенциала ПКШМ, который характеризует степень злокачественности опухолей. Данные имеют прогностическое значение и могут быть использованы для разработки лекарственных средств.

Работа выполнена в рамках “Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы” и при поддержке грантов РФФИ 04-04-49048, 07-04-01233, 10-04-01573а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hadler-Olsen E., Winberg J.O., Uhlin-Hansen L. (2013) Tumour Biol., **34**, 2041-2051.
2. Fingleton B. (2006) Front Biosci., **11**, 479-491.
3. Соловьева Н.И. (2000) Вопр. мед. химии, **46**, 489-490.
4. Willis A.L., Sabeh F., Li X.Y., Weiss S.J. J. (2013) Microsc. Sep., **251**, 250-260.
5. Murphy G., Nagase H. (2008) Mol. Aspects Med., **29**, 2900-3086.

6. Visse R., Nagase H. (2003) Circ Res., **92**, 827-839.
7. Mannello F., Medda V. (2012) Progr. Histochem. Cytochem., **47**, 27-58.
8. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. (2010) Cell, **141**, 52-67.
9. Rodríguez D., Morrison C.J., Overall C.M. (2010) Biochim. Biophys. Acta, **1803**, 39-54.
10. Cathcart J., Pulkoski-Gross A., Cao J. (2015) Genes Dis., **2**, 26-34.
11. Кузнецкая Е.В., Тимошенко О.С., Соловьева Н.И. (2015) Биомед. химия, **61**, 683-688.
12. Shuman Moss L.A., Jensen-Taubman S., Stetler-Stevenson W.G. (2012) Am. J. Pathol., **181**, 1895-1899.
13. Gialeli C., Theocharis A.D., Karamanos N.K. (2011) FEBS J., **278**, 16-27.
14. Kessenbrock K., Wang C.Y., Werb Z. (2015) Matrix Biol., **44-46**, 184-190.
15. Jacob A., Prekeris R. (2015) Front. Cell. Dev. Biol., **3**, 4.
16. Bauvois B. (2012) Biochim. Biophys. Acta, **1825**, 29-36.
17. Соловьева Н.И. (1998) Биоорг. химия, **24**, 217-226.
18. Jiang W.G., Sanders A.J., Katoh M. (2015) Semin. Cancer Biol., pii: S1044-579X(15)00023-1.
19. Макаркина О.М., Родионова А.А. (2014) Vademecum, **17**, 22-29.
20. zur Hausen H. (1996) Biochim Biophys Acta, **1288**, 55-78.
21. zur Hausen H. (2009) Virology, **384**, 260-265.
22. Wang H., Zhang X., Huang L., Li J., Qu S., Pan F. (2014) Cell Biochem. Biophys., **70**, 729-734.
23. Zhu D., Ye M., Zhang W. (2015) Int. J. Clin. Exp. Pathol., **8**, 4981-4989.
24. McLaughlin-Drubin M.E., Menger K. (2009) Virology, **384**, 335-344.
25. Moody C.A., Laimins L.A. (2010) Nat Rev Cancer, **10**, 550-560.
26. Киселев Ф.Л., Имянитов Е.Н., Киселева Н.П., Левина Е.С. (2013) Молекулярная онкология: от вирусной теории к лечению рака (ред. Орлова Г.М.), ГЕОС, Москва, с. 40-46.
27. Fullár A., Dudás J., Oláh L., Hollósi P., Papp Z., Sobel G. (2015) BMC Cancer, **15**, 256.
28. Matheus E.R., Zonta M.A., Discacciati M.G., Paruci P., Velame F., Cardeal L.B. (2014) Diagn. Cytopathol., **42**, 827-833.
29. Li Y., Wu T., Zhang B., Yao Y., Yin G. (2012) Med. Oncol., **29**, 3394-3399.
30. Cardeal L.B., Boccardo E., Termini L., Rabachini T., Andreoli M.A., di Loreto C., Longatto Filho A., Villa L.L., Maria-Engler S.S. (2012) PLoS One, **7**, e33585.
31. Komissarova E.V., Soyfer M.V., Pavlova L.S., Kissel'jov F.L. (1995) Oncol. Rep., **2**, 1169-1174.
32. Журбицкая В.А., Савельева Л.В., Зеленин А.В., Киселев Р.Л. (1999) Мол. биол., **33**, 243-247.
33. Yartseva N., Komissarova E., Zhurbitskaya V., Rissel'jova N., Pavlova L., Fedortseva R., Kissel'jov F. (1997) Oncol Rep., **4**, 629-635.
34. Соловьева Н.И., Винокурова С.В., Дилакян Э.Ф., Гуреева Т.А., Журбицкая В.А., Балаевская Т.О. (2001) Вопр. мед. химии, **47**, 72-79.
35. Рыжакова О.С., Гуреева Т.А., Журбицкая В.А., Соловьева Н.И. (2007) Биомед. химия, **53**, 322-331.
36. Соловьева Н.И., Винокурова С.В., Рыжакова О.С., Гуреева Т.А., Цветкова И.В. (2009) Биомед. химия, **55**, 441-450.
37. Рыжакова О.С., Соловьева Н.И. (2013) Биомед. химия, **59**, 530-540.

38. Solovyeva N.I., Ryzhakova O.S., Kisseleva N.P., Zavalishina L.E., Andreeva Ju.Ju., Frank G.A. (2010) *Cancer Res. J.*, **4**, 59-72.
39. Соловьева Н.И., Тимошенко О.С., Кугаевская Е.В., Андреева Ю.Ю., Завалишина Л.Э. (2014) *Биоорг. химия*, **40**, 743-751.
40. Solovyeva N.I., Ryzhakova O.S., Kisseleva N.P., Zavalishina L.E., Andreeva J.J., Frank G.A. (2012) in: *Advancements in cancer research* (Viktorsson K., ed.) Nova Science Publishers, NY, pp. 61-74.
41. Рыжакова О.С., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Соловьева Н.И. (2013) *Биомед. химия*, **59**, 55-64.
42. Тимошенко О.С., Кугаевская Е.В., Гуреева Т.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Франк Г.А., Соловьева Н.И. (2015) *Архив патологии*, **77**, 31-35.

Поступила: 16. 07. 2015.

MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR ENDOGENOUS REGULATORS IN SQUAMOUS CERVICAL CARCINOMA (Review of the own data)

N.I. Solovyeva, O.S.Timoshenko, T.A. Gureeva, E.V. Kugaevskaya

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119992, Russia; tel.: (499) 246-50-72; e-mail: Nina.Solovyeva@ibmc.msk.ru

Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and their endogenous regulators has been investigated in squamous cervical carcinoma (SCC). The study included (i) immortalized fibroblasts (IF) and three clones of fibroblasts transformed by oncogene E7 HPV-16 (TF); (ii) cell lines associated with HPV-16 and HPV-18; (iii) tumor tissue samples from patients with SCC, associated with gene E7 HPV-16. Transfection of fibroblasts with the E7 HPV16 oncogen was accompanied by induction of collagenase (MMP-1, MMP-14) and gelatinase (MMP-9) gene expression and the increase in catalytic activity of these MMP, while gelatinase MMP-2 expression remained unchanged. Expression of MMP-9 was found only in TF. MMP-9 may serve as a TF marker. In TF expression mRNA TIMP-1 was decreased. The level of free endogenous inhibitors in TF was significantly lower then the level in IF. Expression MMP correlated with the tumorigenic potential of TF. Invasive potential of cell lines associated with HPV18 (HeLa and S4-1) was more pronounced than that of cell lines associated with HPV16 (SiHa and Caski). The cell lines differed substantially in the level of expression of MMPI and their endogenous regulators. In most cell lines mRNA levels of collagenases MMP-1 and MMP-14 and the activator (uPA) increased, while gelatinase MMP-2 mRNA and tissue inhibitors mRNAs changed insignificantly. MMP-9 expression in cell lines was not detected. Results of studies on these cell lines suggest existence of an imbalance in the system enzyme / inhibitor / activator, that increases destructive potential of these cells. The study of expression of MMP and their endogenous regulators performed using SCC tumor samples associated with HPV16 has shown that the invasive and metastatic potentials of tumor tissue in SCC is obviously determined by the increase of expression of collagenases MMP-1, MT1-MMP and gelatinase MMP-9, decreased expression of inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2), and to a lesser extent to increased expression of MMP-2. MMP-1 and MMP-9 can serve as markers of invasive and metastatic potential of the SCC tumor. In adjacent to the tumor normal tissue revealed a significant expression of MMP-1,-2,-9.

Key words: matrix metalloproteinases (MMP), tissue inhibitors of MMP (TIMP), urokinase-type plasminogen activator, human papilloma virus (HPV), squamous cervical carcinoma