

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК: 617.51+617.53]-006.04-033.2:577.15

©Коллектив авторов

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 2 И 9 И ИХ ТКАНЕВЫЕ ИНГИБИТОРЫ КАК ФАКТОРЫ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ГОЛОВЫ И ШЕИ

И.В. Кондакова, Е.В. Клишю, О.В. Савенкова, Г. В. Какурина, Е.Л. Чойнзонов,
Д.А. Шишкин, М.Р. Мухамедов*

ГУ НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН, 634009, Томск,
пер. Кооперативный 5; факс: (3822)51-40-97; эл. почта: kondakova@oncolgy.tomsk.ru

Проведён анализ экспрессии матриксных металлопротеиназ (ММП-2, -9), их тканевых ингибиторов (ТИМП-1,-2) и индуктора экстраклеточных матриксных металлопротеиназ (EMMPRIN) в ткани плоскоклеточных карцином головы и шеи. Иммуногистохимическое исследование выявило преимущественную экспрессию ММП-9 и ТИМП-1 в опухолях по сравнению с ММП-2 и ТИМП-2. Наблюдалось неравномерное распределение исследуемых показателей, кроме ТИМП-1, между раковыми клетками и стромой. Накопление ММП-2, -9 и ТИМП-2 обнаруживалось, главным образом, в клеточных элементах (фибробласты, лейкоциты и др.) и внеклеточном пространстве стромы. Показано, что экспрессия EMMPRIN в опухолевых клетках была достоверно выше, чем в стромальных. Вероятно, клетки карциномы экспрессируют EMMPRIN, который может увеличивать продукцию ММП клетками микроокружения. Отмечено значительное снижение экспрессии ТИМП-1 в клетках карцином с первой стадией метастазирования по сравнению с неметастазирующими. Уровень ТИМП-1 в сыворотке крови больных с метастазированием злокачественных новообразований в регионарные лимфатические узлы снижен по сравнению с сывороткой крови пациентов без метастазов. Таким образом, ММП-9 и ТИМП-1 играют важную роль в развитии опухолей головы и шеи, а содержание ТИМП-1 в сыворотке крови и тканях злокачественных новообразований связаны с начальной стадией метастазирования в регионарные лимфоузлы.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы, тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ, индуктор экстраклеточных матриксных металлопротеиназ, плоскоклеточные карциномы головы и шеи, метастазирование.

ВВЕДЕНИЕ. Метастазирование злокачественных новообразований является совокупностью многих процессов, среди которых важное значение имеет взаимодействие неопластических клеток с микроокружением, в результате чего происходит ремоделирование тканей с разрушением белков базальной мембраны и внеклеточного матрикса [1, 2]. В деградации внеклеточного матрикса принимают участие несколько семейств пептидаз, к наиболее важным из которых относится семейство матриксных металлопротеиназ (ММП) [3-5]. Эти ферменты обеспечивают инвазивный рост опухолевых клеток в базальной мембране и строме, пенетрацию в лимфатические и кровеносные сосуды и метастазирование, что связано с их способностью гидролизовать основные структурные белки и молекулы межклеточных и белково-клеточных контактов [1, 2]. Кроме того, ММП, увеличивая экспрессию фактора транскрипции Snail, индуцируют эпителиально-мезенхимальный переход, в результате которого трансформированные клетки не только теряют адгезивные молекулы, но и приобретают способность быть подвижными [6]. Установлено,

* - адресат для переписки

что ММП стимулируют миграцию злокачественных клеток, принимают участие в регуляции неоангиогенеза, отборе апоптоз-резистентных опухолевых клеток, угнетении противоопухолевого иммунного надзора [7, 8].

В настоящее время известно, что семейство ММП представлено несколькими группами, а именно, коллагеназами (МММ-1, МММ-8 и МММ-13), желатиназами (МММ-2 и МММ-9), стромелизинами (МММ-3 и МММ-10), матрилизином (ММП-7) и мембраносвязанными ММП (МТ-ММП). ММП-2 и ММП-9 способны гидролизовать основной структурный белок базальной мембраны - коллаген IV типа, поэтому в настоящее время эти ферменты претендуют на роль факторов прогноза метастазирования [9-11]. Представляется важным изучение и тканевых ингибиторов металлопротеиназ (ТИМП), так как именно нарушение тонкого баланса протеаза/ингибитор приводит к активации протеолиза [12, 13].

Показано, что в тканях ряда злокачественных опухолей наблюдается гиперэкспрессия ММП-9, ММП-2 и снижение экспрессии ТИМП-1 и ТИМП-2, что связано с образованием метастазов и плохим прогнозом течения заболевания [10, 11, 13]. Серологический уровень и экспрессия ММП-2, ММП-9, ТИМП-1 и ТИМП-2 в тканях злокачественных новообразований у больных опухолями головы и шеи с лимфогенным метастазированием изучены недостаточно. Кроме того, представляет интерес исследование экспрессии данных показателей как в злокачественных, так и стромальных клетках, в связи с тем, что раковые клетки могут направленно усиливать продукцию ММП клетками микроокружения путём секреции индуктора экстраклеточных матриксных металлопротеиназ (EMMPRIN) [14, 15].

Целью исследования явилось изучение содержания ММП-2, ММП-9 и их тканевых ингибиторов ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови и ткани опухоли больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи с различной выраженностью процесса метастазирования, а также в опухолевых и стромальных клетках в зависимости от экспрессии EMMPRIN.

МЕТОДИКА. В исследование были включены 80 больных опухолями головы и шеи (гортань, органы полости рта, глотки, носа и придаточных пазух) стадии T₁₋₃N₀₋₃M₀ в возрасте от 31 до 77 лет и 20 здоровых доноров в возрасте от 26 до 57 лет. Материалом для исследования служила сыворотка крови и образцы опухолевой ткани. Все опухоли имели гистологическое строение плоскоклеточных карцином разной степени дифференцировки. Сыворотку хранили при -50°C не более 10 месяцев и размораживали не более 1 раза для исследования содержания ферментов.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии ММП-2,-9 и ТИМП-1,-2 проведено в образцах опухолевых тканей 38 больных. Использовали антитела фирмы “Новокастра”: ММП-2 (NCL-MMP2-507, для парафиновых блоков, высокотемпературная демаскировка антигена в 1 мМ ЭДТА pH 8,0, рабочее разведение 1:40–1:80); ММП-9 (NCL-MMP9, для парафиновых блоков, рабочее разведение 1:40); ТИМП-1 (NCL-TIMP1-485, для замороженной ткани и парафиновых блоков, рабочее разведение 1:200); ТИМП-2 (NCL-TIMP2-487, для парафиновых блоков, высокотемпературная демаскировка антигена в 1 мМ ЭДТА, pH 8,0, рабочее разведение 1:20); EMMPRIN (CD 147) (NCL - CD147, для парафиновых блоков, высокотемпературная демаскировка антигена в 0,01 М цитратном буфере pH 6,0, рабочее разведение 1:20 – 1:40). Инкубацию с первыми антителами проводили 60 минут при температуре 25°C. Использовали систему визуализации фирмы “Dako” LSAB2 System-HRP, в качестве хромогена - ДАБ, препараты докрашивали гематоксилином. Экспрессия маркеров определялась как слабая, средняя (умеренная) и выраженная и представлена в баллах.

Исследование уровня ММП-9 и ТИМП-1 в сыворотке крови проводили с использованием наборов для твердофазного иммуноферментного анализа (Human Human MMP-9 Quantikine ELISA Kit, Human Human TIMP-1 Quantikine ELISA Kit, “R&D Systems”, США) на ИФА-анализаторе ANTHOS 2020 (Австрия).

Статистический анализ был проведен с использованием программы STATISTICA 6.0. Результаты исследования были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Колмагорова-Смирнова. При нормальном распределении значений применялся параметрический t-критерий Стьюдента. Для значений, закон распределения которых отличался от нормального, был применен непараметрический критерий Манна-Уитни. Наличие связи между изучаемыми признаками проводили с использованием корреляционного анализа и оценивали по коэффициенту корреляции Спирмена (R).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Иммуногистохимическое исследование показало, что экспрессия ММП-2 и ТИМП-2 в тканях опухолей головы и шеи была слабоположительной и отмечалась в 50% образцов, в то время как ММП-9 и ТИМП-1 определялись в большинстве тканей карцином головы и шеи. Отмечено неравномерное распределение исследуемых показателей, кроме ТИМП-1, между раковыми клетками и стромой (табл. 1). Преимущественное накопление ММП-2, -9 и ТИМП-2 обнаружено в клеточных элементах (фиброциты, лейкоциты и др.) и внеклеточном пространстве стромы. В то же время количество ЕММРIN антиген-позитивных опухолевых клеток было достоверно выше, чем стромальных. Корреляционный анализ показал наличие положительной связи между экспрессией ЕММРIN на поверхности опухолевых клеток с содержанием ММП-9 в опухолевых структурах ($R = 0,38$; $p = 0,02$) и ММП-1 ($R = 0,43$; $p = 0,007$), ММП-2 ($R = 0,38$; $p = 0,02$), ММП-9 ($R = 0,48$; $p = 0,002$) в строме.

Таблица 1. Уровни экспрессии ММП-2, ММП-9 и их тканевых ингибиторов ТИМП-1 и ТИМП-2 (в баллах) в опухолевой ткани и в строме у больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи.

Показатель	ТИМП1	ТИМП2	ММП2	ММП9	ЕММРIN
Опухоль	3,13±0,11	1,24±0,08	1,21±0,08	1,82±0,15	2,87±0,16
Строма	2,97±0,14	2,13±0,14	2,32±0,13	2,21±0,12	1,84±0,13
p	0,6	0,001	0,001	0,04	0,001

Примечание: p - уровень значимости различий между опухолью и стромой.

Вероятно, клетки карциномы экспрессируют ЕММРIN, который, являясь низкомолекулярным белком массой 55 кДа, находится на цитоплазматической мембране и может увеличивать продукцию ММП клетками микроокружения [14]. Зависимость продукции ММП фибробластами от уровня экспрессии ЕММРIN на поверхности опухолевых клеток подтверждена в исследованиях, в которых использовали культуры тканей плоскоклеточных карцином головы и шеи [15]. Установлено, что в смешанной культуре наблюдается усиление протеолиза коллагена ММП, синтезируемыми в фибробластах при трансфекции гена ЕММРIN в опухолевые клетки с его низкой эндогенной экспрессией. По-видимому, продукция ММП клетками микроокружения играет важную роль в инвазивном росте и метастазировании раковых клеток.

Анализ связи исследуемых показателей с метастазированием показал, что экспрессия ТИМП-1 в опухолевых клетках связана с наличием метастазов в регионарные лимфатические узлы (табл. 2).

МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗА КАК ФАКТОР МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

Таблица 2. Связь уровня экспрессии ММП2, ММП9, ТИМП1, ТИМП2 и ЕММРIN в опухолевой ткани (в баллах) с лимфогенным метастазированием у больных опухолями головы и шеи.

Показатель	Стадии метастазирования		
	N0	N1	N2+3
ММП2	1,21±0,09	1,20±0,20	1,20±0,20
ММП9	1,75±0,15	1,60±0,40	2,40±0,68
ТИМП1	3,21±0,11	2,60*±0,24	3,20±0,58
ТИМП2	1,29±0,10	1,20±0,20	1,00±0,00
ЕММРIN	2,79±0,19	3,20±0,37	3,00±0,44

Примечания: * - значимость различий с группой N0 (p = 0,04).

В клетках метастазирующих карцином экспрессия ингибитора значительно ниже по сравнению с неметастазирующими. Следует отметить, что эти различия характерны только для начальной стадии метастазирования (N1) и являются показателем появления метастазов. Вероятно, дальнейшее распространение метастатического процесса по лимфатической системе не зависит от содержания ТИМП-1 в клетках первичной опухоли. Полученные в представленной работе результаты согласуются с данными Ruokolainen H. et al. [13], которые свидетельствуют о важной прогностической роли ТИМП-1 при опухолях головы и шеи. В связи с этим, можно использовать этот критерий как фактор риска появления лимфогенных метастазов у больных опухолями головы и шеи, что может повлиять на характер лечебной тактики данной группы больных.

Исследование уровня экспрессии ММП2, ММП9, ТИМП1, ТИМП2 и ЕММРIN в клетках стромы опухолей не показало достоверных различий в зависимости от стадий метастазирования (табл. 3).

Таблица 3. Уровни экспрессии ММП2, ММП9, ТИМП1, ТИМП2 и ЕММРIN в стромальных элементах (в баллах) опухолей, различающихся по стадии лимфогенного метастазирования у больных опухолями головы и шеи.

Показатель	Стадии метастазирования		
	N0	N1	N2+3
ММП2	2,29±0,17	2,20±0,37	2,60±0,24
ММП9	2,14±0,15	2,20±0,37	2,60±0,24
ТИМП1	3,07±0,17	2,04±0,40	3,00±0,32
ТИМП2	2,04±0,16	2,00±0,32	2,80±0,49
ЕММРIN	1,86±0,13	1,80±0,58	1,80±0,37

Учитывая, что ткань плоскоклеточных карцином головы и шеи характеризуется экспрессией преимущественно ММП-9 и ТИМП-1, при исследовании сыворотки больных мы ограничились изучением только этих показателей. Было обнаружено значительное повышение уровня ТИМП-1 в сыворотке крови больных с опухолями головы и шеи по сравнению с уровнем ингибитора в крови здоровых лиц (p = 0,014). Содержание ММП-9 и ТИМП-1 в сыворотке крови не было связано с размером новообразования. В то же время показано наличие достоверных изменений уровня ТИМП-1 при метастазировании

(табл. 4). Так, в сыворотке крови больных опухолями головы и шеи без метастазов в регионарные лимфоузлы (N0) содержание ТИМП-1 было выше, чем у больных с N1-2 стадией опухолевого процесса, однако при значительном распространении метастатического процесса (N3) уровень ингибитора в сыворотке больных возрастал, что свидетельствует о важной роли продукции ингибитора металлопротеиназ на ранних этапах процесса метастазирования. Следует отметить, что изменения содержания ТИМП-1 в клетках опухолей носили тот же характер, что и в сыворотке крови. Это дает основание предполагать, что показатель содержания ТИМП-1 в сыворотке крови больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи связан с тканевым уровнем его экспрессии.

Таблица 4. Зависимость уровней ММП-9, ТИМП-1 и ММП-9/ТИМП-1 в сыворотке больных опухолями головы и шеи от TN стадии онкологического процесса.

Стадия опухолевого процесса		ТИМП-1 (нг/мл)	ММП-9 (нг/мл)
Контроль		95,6±42,9	347,9±200,1
N-стадия	0	129,3±38,2*	259,6±184,2
	1	106,8±19,9 ¹	290,7±220,4
	2	112,2±23,43	384,5±393,2
	3	146,3±35,54	241,8±32,4

Примечания: *- значимость различий с группой контроль (p<0,01); ¹ - значимость различий с группой "N0" (p<0,02).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. В злокачественных карциномах головы и шеи повышена экспрессия ММП-9 и ТИМП-1, что, вероятно, обусловлено их важной ролью в развитии этих опухолей. Наблюдается связь продукции ММП-2, ММП-9 и ТИМП-2 клетками стромы с экспрессией EMMPRIN в клетках злокачественных новообразований. Содержание ТИМП-1 в сыворотке крови и тканях опухолей больных опухолями головы и шеи связаны с начальной стадией метастазирования в регионарные лимфоузлы, что дает основание рассматривать этот показатель в качестве возможного маркера распространенности злокачественного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Christofory G. (2006) Nature, **441**, 444-450.
2. Lynch C.C., Matrisian L.M. (2002) Differentiation, **70**, 561-573.
3. Соловьева Н.И., Винокурова С.И., Дилакян Э.А., Гуреева Т.А., Журбицкая В.А., Балаевская Т.О. (2001) Вопр. мед. химии, **47**, 72-79
4. Nagase H., Woessner Jr. J.F. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 21491-21494.
5. Nelson A.R., Fingleton B., Rothenberg M.L., Matrisian L.M. (2000) J. Clin. Oncol., **18**, 1135-1144.
6. Przybylo J.F., Radisky D.C. (2007) Int. J. Biochem. Cell. Biol., **39**, 1082-1088.
7. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Клишо, Е.В., Какурина Г.В., Шишкин Д.А. (2007) Сибирский онкологический журнал, **21**(1), 67-71.
8. Koshikawa N., Gianelli G., Cirulli V., Miyazaki K., Quaranta V. (2000) J. Cell. Biol., **148**, 615-624.
9. Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л., Васильева О.С. (2005) Бюлл. СО РАМН, №2, 82-91.

МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗА КАК ФАКТОР МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

10. *Wiegand S., Dunne A.A., Muller H.H., Mandic R., Barth P., Davis R.K., Werner J.A.* (2005) *Cancer*, **104**, 94-100.
11. *Liu W.W., Zeng Z.Y., Wu Q.L., Hou J.H., Chen Y.Y.* (2005) *Otolaringol. Head. Neck. Surg.*, **132**, 395-400.
12. *Jiang J., Goldberg I.D., Shi Y.E.* (2002) *Oncogene*, **21**, 2245-2252.
13. *Ruokolainen H., Paakko P., Turpeenniemi-Hujanen T.* (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 3257-3264.
14. *Suzuki S., Sato M., Senoo H., Ishikawa K.* (2004) *Exp. Cell. Res.*, **293**, 259-266.
15. *Rosenthal E.L., Zhang W., Talbert M., Raisch K.P., Peters G.E.* (2005) *Mol. Cancer Res.*, **3**, 195-202.

Поступила: 29. 06. 2007.

MATRIX METALLOPROTEINASE 2 AND 9 AS THE FACTOR OF HEAD AND NECK TUMOR METASTASIS

*I.V. Kondakova, E.V. Klisho, O.V. Savenkova, G.V. Kakurina, E.L. Choinzonov,
D.A. Shishkin, M.R. Muha medov*

Cancer Research Institute, Tomsk Scientific Centre of Siberian Branch of RAMS, per. Kooperativny, 5, Tomsk, 634009 Russia; tel: (38-22) 51-25-29; fax: (3822)51-40-97; e-mail: kondakova@oncolgy.tomsk.ru

The levels of metalloproteinases (MMP-2,-9), their tissue inhibitors (TIMP-1,-2) and extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) were studied in tumor tissue and blood serum from patients with head and neck squamous sell carcinoma. Immunohistochemical investigation showed much higher expression of MMP-9 and TIMP-1 in tumor tissue than MMP-2 and TIMP-2. Different expression of the studied parameters (except TIMP-1) in cancer cells and stroma was observed. Enhanced level of MMP-2,-9 and TIMP-2 expression was revealed mainly in fibrocytes, leukocytes and stromal extracellular matrix. Expression of EMMPRIN in tumor cells was higher than in stromal cells. It is possible that carcinoma cells express EMMPRIN to increase MMP production by surrounding cells. Significant decrease of inhibitor expression was observed in cells of carcinomas with N1 grade of metastasis than in tumors without metastasis. Also the decrease in TIMP-1 level was determined in blood serum of patients with metastasis to regional lymph nodes compared with serum of patients without metastasis. Thus, MMP-9 and TIMP-1 play an important role in the development of head and neck squamous sell carcinoma and TIMP-1 level in blood serum and cancer tissues is linked to first grade of regional lymph node metastasis.

Key words: matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, extracellular matrix metalloproteinase inducer, head and neck squamous sell carcinoma, metastasis.