©Коллектив авторов

СРАВНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ мРНК МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В МОРФОЛОГИЧЕСКИ НОРМАЛЬНОЙ, НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ И МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ ТКАНЯХ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА И В БИОПТАТАХ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

В.К. Боженко[1]*, У.С. Станоевич[1], И.Д. Троценко[1,2], М.В. Захаренко[1], Я.Ю. Киселева[1], В.А. Солодкий[1]

[1]Российский научный центр рентгенорадиологии,
117997, Москва, ул. Профсоюзная, 86; эл. почта: vbojenko@mail.ru
[2]Российский университет дружбы народов, Москва

Матриксные металлопротеиназы (matrix metalloproteinases, MMP), отвечающие за ремоделирование внеклеточного матрикса, активацию различных ростовых факторов и ангиогенез, играют важную роль в развитии колоректального рака (КРР). В данной работе проведён сравнительный анализ уровней экспрессии мРНК ММР-7, -8, -9 и -11, а также маркера пролиферации Ki-67 в образцах тканей, полученных от пациентов с КРР и здоровых доноров. С использованием метода ПЦР в реальном времени были исследованы уровни экспрессии их мРНК в 256 образцах ткани, полученных от 112 пациентов с КРР: 112 образцов первичной ткани опухоли (КРР), 112 образцов морфологически нормальной ткани слизистой стенки толстой кишки (МНТ), удалённой от первичной опухоли на 15-20 см и 16 образцов метастатической опухоли КРР в печени (МП). Также исследованы 16 биоптатов, полученных во время процедуры колоноскопии у здоровых волонтеров (НТ). Выявлено, что экспрессия мРНК генов, кодирующих ММР и Ki-67, возрастает в первичной ткани КРР и МП по сравнению с МНТ и НТ. При этом клетки первичной ткани опухоли и клетки метастазов имеют сходную пролиферативную активность. Среди исследованных типов тканей метастатическая опухоль характеризуется наибольшим числом и силой позитивных корреляций между уровнями экспрессии мРНК генов, кодирующих ММР. Впервые показано, что нормальная ткань слизистой оболочки кишки пациентов с КРР и здоровых доноров различаются по уровню экспрессии мРНК ММР-8. Кроме того, они имеют разные корреляционные паттерны исследуемых ММР, что свидетельствует о значительных отличиях между клетками нормальной ткани, соседствующей с опухолью, и клетками слизистой оболочки кишки здоровых доноров.

Ключевые слова: колоректальный рак, матриксные металлопротеиназы, Ki-67, экспрессия мРНК

DOI: 10.18097/PBMC20186401046

ВВЕДЕНИЕ

Патологические изменения в процессах ремоделирования внеклеточного матрикса (ВКМ) играют ключевую роль в инвазии и диссеминации опухоли [1]. Известно, что матриксные металлопротеиназы (matrix metalloproteinases, MMP), участвующие в физиологическом ремоделировании ткани посредством расщепления ВКМ [2-4], вовлечены также в процесс разрушения физических барьеров при формировании микроокружения опухоли, тем самым способствуя ангиогенезу и росту как первичных, так и метастатических опухолей [1]. Повышение экспрессии некоторых ММР в опухолевых образцах колоректального рака (КРР), коррелирующее с неблагоприятным прогнозом и стадией развития опухоли, было выявлено в ряде исследований [2, 5].

Среди матриксных металлопротеиназ роль ММР-9 в инвазии и метастазировании КРР была изучена одной из первых [6]. Наблюдалась значительная корреляция между уровнем мРНК ММР-9 и отдалёнными синхронными метастазами, а также была выявлена корреляция со стадиями КРР по классификации Дюкса. Полученные данные позволили предположить, что уровень экспрессии гена *MMP-9* может представлять независимый прогностический фактор при оценке вероятности рецидива заболевания и результата лечения. В ряде последних исследований был также найден повышенный уровень экспрессии гена *MMP-9* в опухоли и сыворотке пациентов с инвазией лимфатических сосудов [4, 5], что подтверждает возможную патогенетическую и прогностическую значимость данной металлопротеиназы при КРР. Предполагается, что важная роль в развитии метастазов в печени при КРР принадлежит также ММР-7 [7, 8]. Показано, что внутрибрюшинное введние антисмысловых олигонуклеотидов, подавляющих экспрессию ММР-7 на уровне мРНК, ингибирует формирование экспериментальных метастазов в печени бестимусных мышей [7]. Кроме того, выявлено, что уровень экспрессии гена *MMP-7* коррелирует с пролиферацией клеток рака толстой кишки [8]. Экспрессия гена *MMP-11* позитивно коррелирует как со стадиями КРР по классификации Дюкса, так и с метастазами в лимфоузлы, отдалёнными метастазами и экспрессией фактора роста эндотелия сосудов С [3]. Значение ММР-8 в развитии КРР ещё не изучено, однако недавние исследования продемонстрировали антиинвазивную роль ММР-8 при раке молочной железы и мочевого пузыря [9].

В настоящей работе мы сравнили уровни мРНК нескольких ММР (ММР-7, -8, -9, -11) в различных образцах КРР и нормальной ткани здоровых волонтеров. Большинство современных работ, посвященных анализу экспрессии ММР при КРР, сфокусированы на изучении первичной ткани опухоли, соседней с ней морфологически нормальной

* - адресат для переписки

ткани (МНТ) и, реже, на метастатической опухоли [10, 11]. Как правило, морфологически нормальная ткань, расположенная на некотором расстоянии от первичной ткани опухоли, рассматривается в качестве контрольного образца. Насколько соседство данной ткани и первичной опухоли влияет на экспрессию ММР неясно. Поэтому представляет интерес сравнение такого контроля как МНТ и контрольных образцов, представленных тканью биоптатов толстой кишки здоровых волонтеров. Для более глубокого понимания роли ММР в развитии и прогрессировании КРР мы оценили экспрессию мРНК ММР (относительное содержание мРНК матриксных металлопротеиназ) в биоптатах толстой кишки здоровых волонтеров, морфологически нормальной ткани пациентов с КРР, первичной опухолевой ткани и её метастазах в печени. Чтобы выявить коррелирует ли уровень экспрессии мРНК ММР с пролиферативной активностью тканей, мы оценили в них также уровень экспрессии мРНК Ki-67 – хорошо известного маркера клеточной пролиферации, имеющего прогностическое значение при КРР [12].

МЕТОДИКА

Образцы тканей

Экспрессия генов *MMP-7, -8, -9, -11* и *MKI-67* на уровне мРНК была оценена в 256 образцах, полученных от 224 пациентов с КРР при оперативном удалении опухоли. Среди них 112 образцов первичной ткани опухоли (КРР), 112 образцов морфологически нормальной слизистой стенки толстой кишки, удаленной от опухоли на 15-20 см (МНТ), 16 образцов метастатической опухоли колоректального рака в печени (МП) и 16 биоптатов, полученных во время процедуры колоноскопии у здоровых волонтеров (НТ). Пациенты не подвергались химиотерапии или радиотерапии. В группу обследованных пациентов вошли 125 мужчин и 131 женщина в возрасте от 22 до 86 лет (средний возраст составил 64,4 года).

Исследование было одобрено этическим комитетом Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России. Пациенты и добровольцы дали информированное согласие на участие в исследовании. Кусочки ткани размером 10-25 мм^3, полученные после хирургического вмешательства были помещены в полипропиленовые пробирки объёмом 1,5 мл, содержащие 700 мкл реагента, стабилизирующего РНК (EverFresh-RNA, “Sileks”, Россия). Также кусочки ткани были взяты из стенки толстой кишки, удаленной от опухоли на 15-20 см. В 16 случаях одновременно с первичной опухолью у пациентов удаляли метастатическую опухоль в печени, образцы которой также были взяты для анализа. 16 образцов ткани слизистой оболочки толстой кишки здоровых доноров были получены во время колоноскопии.

Согласно гистологической классификации опухоли были представлены аденокарциномами: высокодифференцированной (G1) – 42 образца, умеренно дифференцированной (G2) – 64 образца и низкодифференцированной (G3) – 6 образцов.

Согласно классификации Дюкса, у 8 пациентов выявлена стадия A, у 20 пациентов – стадия B, у 50 – стадия C, и у 34 – стадия D. Первичная опухоль локализовалась в 24 случаях (21,5%) в правой половине толстой кишки, в 38 случаях (33,9%) – в левой половине, в 50 случаях (44,6%) – в прямой кишке.

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени

Образцы ткани переносили из стабилизирующего раствора в механический гомогенизатор TissueLyser homogenizer (“Qiagen”, Германия). Гомогенат центрифугировали (8000 *g*, 10 мин), супернатант удаляли. Суммарную РНК выделяли из каждого образца с помощью набора RNeasy RNA kit (“Qiagen”) согласно инструкции производителя. Для элюции суммарной РНК использовали 50 мкл DEPC-обработанной воды. Качество РНК оценивали на биоанализаторе Agilent Bioanalyser 2100 (“Agilent Technologies”, США), используя набор Agilent RNA 6000 Nano Kit (“Agilent Technologies”; кат. №5067-1511). Значения RIN (RNA integrity number) для всех образцов лежали в интервале 7,8-8,6. Сразу после элюции проводили синтез кДНК в реакции обратной транскрипции с помощью специфических праймеров и реагентов, разработанных компанией “ДНК-Технология” (Россия) согласно инструкции производителя. Синтез кДНК проводили в 40 мкл реакционной смеси при 40°C в течение 30 мин, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 мин. Полученную кДНК хранили при -70°C до использования. ПЦР в реальном времени выполняли в 384-луночном формате в двух повторах на амплификаторе DT-Prime 5 (“ДНК-Технология”, Россия). Специфические праймеры, зонды и реагенты для амплификации были разработаны компанией “ДНК-Технология”. Используемые праймеры специфичны для мРНК, поскольку фланкируют участок кДНК на стыке экзонов. Образцы РНК (до постановки реакции ОТ) использовали как негативный контроль. Относительную экспрессию мРНК генов, кодирующих Ki-67 и ММР, измеряли в относительных единицах, определяемых методом сравнения индикаторных циклов (*Cp*) согласно принципам, предложенным Vandesompele et al. [13]. Уровень экспрессии гена без учёта количества материала, [C_i], определяли как $[C_i] = 2^{Cpi - Cpi\ min}$, где *Cpi* – значение индикаторного цикла в исследуемом образце, а *Cpi min* – значение индикаторного цикла в образце с максимальным уровнем экспрессии данного гена. Для нормировки использовали панель нормировочных генов, состоящую из генов *b2m*, *gusb* и *hprt1* [14-16]. Сначала вычислялись нормировочные факторы для каждого из нормировочных генов по формуле:

$$NF = 2^{Cp - Cpi\ min},$$

где *Cp* – значение индикаторного цикла в исследуемом образце, а *Cp min* – значение индикаторного цикла

в образце с максимальным уровнем экспрессии данного нормировочного гена. Нормировочный фактор *NF* с учётом всех нормировочных генов рассчитывается как среднее геометрическое:

$$NF = \sqrt[3]{NF_{b2m} \times NF_{gusb} \times NF_{hprt1}}$$

Уровень экспрессии генов *MMP* и *MKI-67* с учётом нормировочного фактора рассчитывали как $[C_{NF}] = [C_i]/NF$ и использовали для определения их относительного уровня экспрессии как отношение $[C_{NF}]/[C_{NF\ min}]$, где $C_{NF\ min}$ – значение C_{NF} в образце с минимальным уровнем экспрессии.

Статистический анализ

Статистический и корреляционный анализ выполняли с применением пакета прикладных программ STATISTICA 7.0 (“Statsoft”, США). Рассчитывали среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего. Сравнение групп проводили с помощью непараметрического критерия Краскела-Уолиса (Н-тест), так как в двух группах (НТ и МП) распределение не отвечало критериям нормальности. Различия принимали как достоверные при уровне статистической значимости $p<0,05$. Корреляционные связи между уровнями экспрессии генов *MMP* в исследованных группах образцов принимались как достоверные при уровне статистической значимости $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характерной особенностью опухолевых клеток является высокая скорость пролиферации, которая часто служит основой для цитостатической химиотерапии. Одним из хорошо известных маркеров клеточной пролиферативной активности является Ki-67 [12]. Так как недавно показано, что уровень экспрессии мРНК Ki-67 также позволяет оценивать пролиферативную активность опухоли, как и иммуногистохимическое окрашивание [17], мы оценили экспрессию гена *MKI-67* в нормальной и опухолевой ткани. На рисунке 1 представлено среднее значение нормализованной экспрессии гена *MKI-67* в разных типах ткани. Как можно было ожидать, среднее значение экспрессии гена *MKI-67* статистически достоверно отличается между нормальными (НТ и МНТ) и опухолевыми (КРР и МП) образцами (рис. 1 и табл. 1). В то же время между группами КРР и МП статистически достоверной разницы выявлено не было (табл. 1). Эти данные указывают, что клетки первичной опухоли и её метастазов имеют сходную пролиферативную активность. Подобные результаты по экспрессии гена *MKI-67* в первичной опухоли и метастазах были получены Anjomshoaa и соавт. [18]. Также не было выявлено статистически достоверных различий между группами НТ и МНТ (рис. 1 и табл. 1), что указывает на отсутствие изменений пролиферативной активности в эпителиальных клетках соседних с КРР.

На рисунке 2 приведены средние значения уровня экспрессии ММР для различных типов исследованной ткани (НТ, МНТ, КРР, МП). Возрастание уровня экспрессии ММР-7 в ткани опухоли является наиболее выраженным по сравнению с другими ММР. Ранее показано статистически достоверное повышение уровня мРНК ММР-7 при КРР в первичной ткани опухоли по сравнению с соседней морфологически неизмененной слизистой [19, 20]. Также было выявлено, что экспрессия ММР-7 коррелирует с прогрессированием КРР, и предполагается, что этот фермент играет роль в развитии метастазов опухоли в печени [11]. Наши результаты

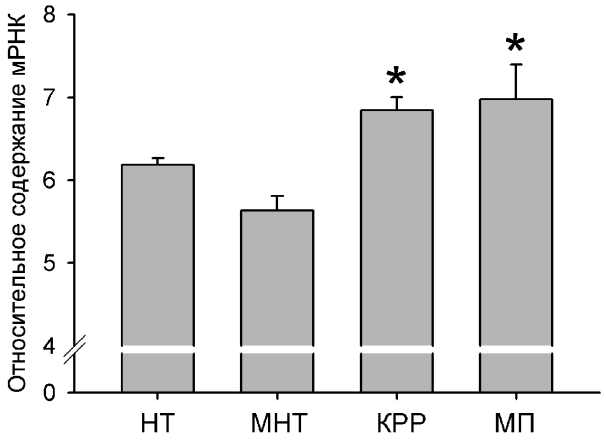

Рисунок 1. Относительная экспрессия гена *MKI-67* на уровне мРНК в разных типах ткани (НТ - нормальная ткань слизистой оболочки толстой кишки здоровых доноров, МНТ - максимально удалённая от опухоли (15-20 см) морфологически нормальная ткань слизистой оболочки толстой кишки, КРР - первичная опухоль колоректального рака, МП - метастатическая опухоль колоректального рака в печени). Знак * означает статистически достоверное ($p<0,05$) отличие от групп НТ и МНТ.

Таблица 1. Достоверность различий средних значений экспрессии генов *MKI-67* и *MMP-7*, *-8*, *-9* и *-11* в различных группах (НТ, МНТ, КРР и МП)

Ген	НТ/МНТ	НТ/КРР	НТ/МП	МНТ/КРР	МНТ/МП	КРР/МП
MKI-67	1,0000	**0,0071**	**0,0152**	**0,0000**	**0,0003**	1,0000
MMP-7	0,1888	**0,0000**	**0,0000**	**0,0000**	**0,0000**	0,3723
MMP-8	**0.0029**	**0,0000**	**0,0000**	**0,000001**	**0,0013**	1,0000
MMP-9	1,0000	**0,0002**	**0,0059**	**0,0000**	**0,0035**	1,0000
MMP-11	1,0000	**0,00001**	**0,0438**	**0,0000**	**0,0148**	1,0000

Примечание. Указаны уровни значимости p, полученные с помощью критерия Краскела-Уоллиса (Н-тест). Значения $p<0,05$ выделены жирным шрифтом.

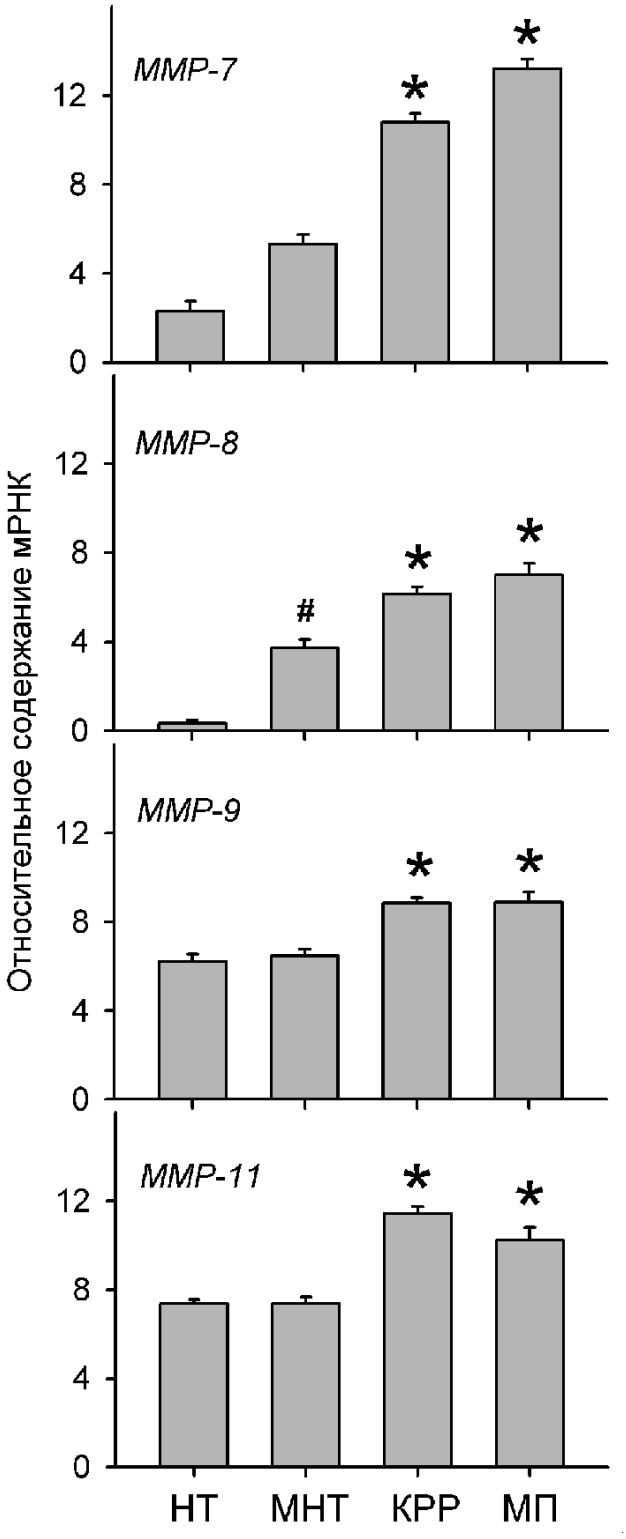

Рисунок 2. Относительная экспрессия генов *MMP-7*, *-8*, *-9* и *-11* на уровне мРНК в различных типах тканей (среднее значение и стандартная ошибка среднего). Типы тканей как на рисунке 1. *MMP-7* (1), *MMP-8* (2), *MMP-9* (3), *MMP-11* (4). Знак * означает статистически достоверное ($p<0,05$) отличие от групп НТ и МНТ, знак # - статистически достоверное ($p<0,05$) отличие между группами НТ и МНТ.

показывают, что экспрессия MMP-7 в нормальной слизистой (НТ и МНТ) и злокачественной ткани (КРР и МП) статистически достоверно различается, достигая наибольшего уровня в образцах МП, хотя статистически достоверных различий между группами КРР и МП не выявлено (табл. 1). Также не было выявлено статистически достоверных различий экспрессии MMP-7 между нормальной слизистой здоровых волонтеров и пациентов с колоректальным раком (табл. 1).

Также как и для MMP-7 наблюдается нарастание уровня экспрессии мРНК MMP-8 (рис. 2). Среднее значение уровня экспрессии MMP-8 статистически достоверно различается во всех исследуемых группах, за исключением отсутствия различий между КРР и МП. Необходимо отметить, что сравнительный анализ уровня мРНК MMP-8 в нормальной и злокачественной ткани кишки с помощью ПЦР в реальном времени был выполнен впервые. Предыдущая попытка оценить уровень экспрессии MMP-8 в ткани толстой кишки с помощью данного метода была неудачной [21]: уровень MMP-8 оказался слишком низким для того, чтобы сделать корректное сравнение. Известно, что MMP-8, в отличие от большинства MMP, обладает противоопухолевой активностью (например, [22] и цитированные в ней работы). Поэтому кажется скорее парадоксальным, что уровень мРНК MMP-8 повышен в образцах первичной опухоли и метастатической опухоли КРР в печени (рис. 2). Однако сообщается, что уровень экспрессии MMP-8 при раке яичников положительно коррелирует с развитием опухоли [23]. Предполагается, что активность MMP-8 зависит от типа ткани [24]. С другой стороны наблюдаемое возрастание уровня мРНК MMP-8 в опухолевой ткани может быть связано также и с нейтрофильной инфильтрацией в опухоли, так как MMP-8 была первоначально идентифицирована как нейтрофильная коллагеназа [25] из-за высокого уровня её экспрессии в этих клетках. В настоящее время существуют противоречивые взгляды на роль нейтрофилов в росте и развитии опухоли в связи с их про- и противоопухолевой активностью (например, [26] и цитированные в ней работы). Вне зависимости от роли нейтрофилов, можно предположить, что их накопление в опухоли и метастатических очагах в печени ответственно за повышенный уровень мРНК MMP-8 по сравнению с нормальной тканью кишки (рис. 2 и табл. 1). Интересно, что мы нашли статистически значимые различия между экспрессией MMP-8 в нормальной ткани пациентов с КРР и здоровых добровольцев. Возможно, это указывает на то, что морфологически нормальная стенка слизистой, окружающей опухоль, характеризуется повышенным содержанием нейтрофилов.

Уровень экспрессии мРНК MMP-9 и MMP-11 статистически значимо возрастает при переходе от нормальных тканей (НТ и МНТ) к злокачественным (рис. 2 и табл. 1). Наши результаты подтверждают данные других исследований, в которых более высокая экспрессия MMP-9 [6, 10, 27] и MMP-11 [28] наблюдалась в ткани КРР по сравнению с соседней

нормальной слизистой кишки. Уровни мРНК ММР-9 и ММР-11 сходны в группах НТ и МНТ (рис. 2 и табл. 1). Это даёт основание полагать, что нормальная слизистая здоровых доноров и МНТ пациентов с колоректальным раком не различается по экспрессии данных металлопротеиназ. Также не выявлено достоверных различий по уровню экспрессии ММР-9 и ММР-11 между группами КРР и МП (рис. 2 и табл. 1). Ранее не проводилось сравнение уровней экспрессии ММР-9 и ММР-11 в ткани КРР и метастазах. Можно отметить работу Zeng и соавт. [10], в которой уровень мРНК ММР-9 был оценен в первичной опухоли КРР и метастазах печени, однако прямое сравнение экспрессии ММР-9 авторы провели только между метастазами и нормальной тканью печени.

Процесс опухолевой инвазии и метастазирования вовлекает сложный каскад событий, который включает разрушение ВКМ матриксными металлопротеиназами. Каждый элемент ВКМ расщепляется специфической ММР или группой ММР [29]. Поэтому представляет интерес анализ того, как экспрессия различных ММР связана между собой в различных типах тканей. С этой целью мы провели корреляционный анализ уровней экспрессии мРНК ММР-7, -8, -9, -11 и Ki-67 в исследованных нами тканях. Таблицы 2-5 представляют результаты корреляционного анализа экспрессии мРНК Ki-67 и ММР в нормальной слизистой кишки здоровых волонтеров, морфологически нормальной слизистой кишки пациентов с КРР, а также в их первичном опухолевом очаге и метастазах. В группе НТ выявлена только одна сильная позитивная корреляция между уровнями мРНК ММР-9 и ММР-7 (табл. 2). В морфологически нормальной ткани пациентов с КРР число значимых корреляций между уровнями мРНК ММР больше, однако, только одна из них является сильной (между мРНК ММР-7 и ММР-8), остальные – слабые (табл. 3). ММР-7 и ММР-8 – две металлопротеиназы, демонстрирующие резкое возрастание уровня мРНК в группе МНТ по сравнению с группой НТ (рис. 2). Стоит отметить, что в морфологически нормальной ткани слизистой оболочки толстой кишки,

Таблица 2. Корреляционный анализ экспрессии генов в группе НТ

Ген	*MKI-67*	*MMP-7*	*MMP-8*	*MMP-9*	*MMP-11*
MKI-67	1,00	-0,08	0,12	-0,35	0,14
MMP-7	-0,08	1,00	-0,17	**0,64**	0,32
MMP-8	0,12	-0,17	1,00	-0,30	-0,39
MMP-9	-0,35	**0,64**	-0,30	1,00	0,25
MMP-11	0,14	0,32	-0,39	0,25	1,00

Примечание. Здесь и в таблицах 3-5 приведены значения коэффициентов корреляции Пирсона (r_p). Статистически достоверные значения r_p ($p<0,05$) выделены жирным шрифтом.

Таблица 3. Корреляционный анализ экспрессии генов в группе МНТ

Ген	*MKI-67*	*MMP-7*	*MMP-8*	*MMP-9*	*MMP-11*
MKI-67	1,00	0,00	0,12	**0,27**	-0,08
MMP-7	0,00	1,00	**0,62**	**0,26**	**0,25**
MMP-8	0,12	**0,62**	1,00	**0,28**	0,18
MMP-9	**0,27**	**0,26**	**0,28**	1,00	0,18
MMP-11	-0,08	**0,25**	0,18	0,18	1,00

Таблица 4. Корреляционный анализ экспрессии генов в группе КРР

Ген	*MKI-67*	*MMP-7*	*MMP-8*	*MMP-9*	*MMP-11*
MKI-67	1,00	0,16	0,17	-0,06	**0,22**
MMP-7	0,16	1,00	**0,47**	**0,57**	0,10
MMP-8	0,17	**0,47**	1,00	**0,45**	0,10
MMP-9	-0,06	**0,57**	**0,45**	1,00	**0,19**
MMP-11	**0,22**	0,10	0,10	**0,19**	1,00

Таблица 5. Корреляционный анализ экспрессии генов в группе МП

Ген	*MKI-67*	*MMP-7*	*MMP-8*	*MMP-9*	*MMP-11*
MKI-67	1,00	0,02	-0,05	-0,09	0,14
MMP-7	0,20	1,00	**0,56**	0,30	0,31
MMP-8	-0,05	**0,56**	1,00	**0,61**	**0,58**
MMP-9	-0,09	0,03	**0,61**	1,00	**0,82**
MMP-11	0,14	0,31	**0,58**	**0,82**	1,00

смежной с первичным очагом КРР, существует статистически значимая корреляция между экспрессией мРНК маркера пролиферации Ki-67 и экспрессией мРНК ММР-9, в то время как статистически значимых корреляций между экспрессией мРНК Ki-67 и металлопротеиназ в нормальной слизистой здоровых волонтеров выявлено не было (табл. 1 *vs.* табл. 2). Таким образом, особенности корреляции в группах НТ и МНТ отличаются, что даёт основание предположить, что эпителиальные клетки, соседствующие с опухолью, хотя выглядят морфологически неизмененными, тем не менее, отличаются от клеток слизистой эпителия здоровых индивидов.

В группе КРР общее число статистически достоверных корреляций не меняется, но при этом возрастает количество умеренных позитивных корреляций (табл. 4 *vs*. табл. 3). Интересно, что в образцах первичных очагов колоректального рака выявляется статистически достоверная слабая позитивная корреляция между экспрессией мРНК Ki-67 и ММР-11 в отличие от группы МНТ, где уровень экспрессии мРНК Ki-67 коррелирует с уровнем экспрессии мРНК ММР-9 (табл. 4). В группе МП статистически значимые корреляции, найденные между уровнями экспрессии мРНК ММР, были либо умеренными, либо сильными, при этом корреляций между экспрессией мРНК Ki-67 и ММР выявлено не было (табл. 5). Суммируя полученные данные, можно сказать, что корреляционный паттерн мРНК ММР для первичного очага КРР и метастатической опухоли КРР в печени характеризуется усилением позитивных корреляций исследуемых ММР по сравнению с нормальной тканью слизистой кишки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уровень экспрессии мРНК ММР-7, -8, -9, -11 возрастает как в клетках первичной опухоли КРР, так и в метастазах, локализованных в печени, по сравнению с клетками морфологически нормальной слизистой оболочкой кишки. В то же время, экспрессия мРНК исследуемых ММР в опухоли и её метастазах достоверно не различается. Полученные данные подтверждают важную роль ММР в росте и развитии опухоли. Возрастание уровня экспрессии мРНК ММР в опухолевой ткани сопровождается увеличением количества и силы позитивных корреляций между мРНК металлопротеиназ. Впервые показано, что нормальная ткань слизистой оболочки кишки пациентов с КРР и здоровых доноров различаются по уровню экспрессии мРНК ММР-8. Кроме того, они имеют разные корреляционные паттерны экспрессии мРНК исследуемых металлопротеиназ, что свидетельствует о значительных отличиях между клетками нормальной ткани, соседствующей с опухолью и клетками слизистой оболочки кишки здоровых доноров. Полученные результаты указывают на то, что морфологически нормальная ткань, соседствующая с первичной опухолью, должна использоваться в качестве контроля с осторожностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Herszenyi L., Hritz I., Lakatos G., Varga M.Z., Tulassay Z.* (2012) Int. J. Mol. Sci., **13**, 13240-13263.
2. *Said A.H., Raufman J.P., Xie G.* (2014) Cancers (Basel), **6**, 366-375.
3. *Xu C.J., Xu F.* (2014) Int. J. Clin. Exp. Med., **7**, 2883-2888.
4. *Dragutinovic V.V., Radonjic N.V., Petronijevic N.D., Tatic S.B., Dimitrijevic I.B., Radovanovic N.S., Krivokapic Z.V.* (2011) Mol. Cell Biochem., **355**, 173-178.
5. *Langers A.M., Verspaget H.W., Hawinkels L.J., Kubben F.J., van Duijn W., van der Reijden J.J., Hardwick J.C., Hommes D.W., Sier C.F.* (2012) Br. J. Cancer, **106**, 1495-1498.
6. *Zeng Z.S., Huang Y., Cohen A.M., Guillem J.G.* (1996) J. Clin. Oncol., **14**, 3133-3140.
7. *Miyazaki K., Koshikawa N., Hasegawa S., Momiyama N., Nagashima Y., Moriyama K., Ichikawa Y., Ishikawa T., Mitsuhashi M., Shimada H.* (1999) Cancer Chemother. Pharmacol., **43 Suppl**, S52-S55.
8. *Xie G., Cheng K., Shant J., Raufman J.P.* (2009) Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., **296**, G755-G763.
9. *Shinnoh M., Horinaka M., Yasuda T., Yoshikawa S., Morita M., Yamada T., Miki T., Sakai T.* (2013) Int. J. Oncol., **42**, 903-911.
10. *Zeng Z.S., Guillem J.G.* (1995) Br. J. Cancer, **72**, 575-582.
11. *Ishikawa T., Ichikawa Y., Mitsuhashi M., Momiyama N., Chishima T., Tanaka K., Yamaoka H., Miyazakic K., Nagashima Y., Akitaya T., Shimada H.* (1996) Cancer Letts., **107**, 5-10.
12. *Oshima C.T., Iriya K., Forones N.M.* (2005) Neoplasma, **52**, 420-424.
13. *Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F.* (2002) Genome Biol., **3**, RESEARCH0034.
14. *Terrin L., Rampazzo E., Pucciarelli S., Agostini M., Bertorelle R., Esposito G., DelBianco P., Nitti D., De Rossi A.* (2008) Clin. Cancer Res., **14**, 7444-7451.
15. *Lind G.E., Danielsen S.A., Ahlquist T., Merok M.A., Andresen K., Skotheim R.I., Hektoen M., Rognum T.O., Meling G.I., Hoff G., Bretthauer M., Thiis-Evensen E., Nesbakken A., Lothe R.A.* (2011) Mol .Cancer, **10**, 85.
16. *Sharan R.N., Vaiphei S.T., Nongrum S., Keppen J., Ksoo M.* (2015) Cell Oncol. (Dordr.), **38**, 419-431.
17. *Sinn H.P., Schneeweiss A., Keller M., Schlombs K., Laible M., Seitz J., Lakis S., Veltrup E., Altevogt P., Eidt S., Wirtz R.M., Marme F.* (2017) BMC Cancer, **17**, 124.
18. *Anjomshoaa A., Nasri S., Humar B., McCall J.L., Chatterjee A., Yoon H.S., McNoe L., Black M.A., Reeve A.E.* (2009) Br. J. Cancer, **101**, 822-828.
19. *Oshima T., Akaike M., Yoshihara K., Shiozawa M., Yamamoto N., Sato T., Yamada R., Fujii S., Rino Y., Kunisaki C., Tanaka K., Masuda M., Imada T.* (2008) Oncol. Rep., **20**, 359-364.
20. *Keles D., Arslan B., Terzi C., Tekmen I., Dursun E., Altungoz O., Oktay G.* (2014) Clin. Biochem., **47**, 1265-1271.
21. *Asano T., Tada M., Cheng S., Takemoto N., Kuramae T., Abe M., Takahashi O., Miyamoto M., Hamada J., Moriuchi T., Kondo S.* (2008) J. Surg. Res., **146**, 32-42.
22. *Thirkettle S., Decock J., Arnold H., Pennington C.J., Jaworski D.M., Edwards D.R.* (2013) J. Biol. Chem., **288**, 16282-16294.
23. *Stadlmann S., Pollheimer J., Moser P.L., Raggi A., Amberger A., Margreiter R., Offner F.A., Mikuz G., Dirnhofer S., Moch H.* (2003) Eur. J. Cancer, **39**, 2499-2505.

24. *Vayrynen J.P., Vornanen J., Tervahartiala T., Sorsa T., Bloigu R., Salo T., Tuomisto A., Makinen M.J.* (2012) Int. J. Cancer, **131**, E463-E474.
25. *Hasty K.A., Pourmotabbed T.F, Goldberg G.I., Thompson J.P., Spinella D.G., Stevens R.M., Mainardi C.L.* (1990) J. Biol. Chem., **265**, 11421-11424.
26. *Granot Z., Jablonska J.* (2015) Mediators Inflamm., **2015**, 701067. DOI: 10.1155/2015/701067
27. *Zhang Y., Guan X.Y., Dong B., Zhao M., Wu J.H., Tian X.Y., Hao C.Y.* (2012) J. Cancer Res. Clin. Oncol., **138**, 2035-2044.
28. *Tian X., Ye C., Yang Y., Guan X., Dong B., Zhao M., Hao C.* (2015) J. Transl. Med., **13**, 337.
29. *Visse R., Nagase H.* (2003) Circ. Res., **92**, 827-839.

Поступила: 17. 10. 2017.
Принята к печати: 05. 12. 2017.

COMPARISON OF MATRIX PROTEINASE mRNA EXPRESSION IN MORPHOLOGICALLY NORMAL, NEOPLASTIC, AND METASTATIC COLON TISSUE AND COLON BIOPSIES FROM HEALTHY DONORS

V.K. Bozhenko[1], U.S. Stanojevic[1], I.D. Trotsenko[1,2], M.V. Zakharenko[1], Y.Y. Kiseleva[1], V.A. Solodkiy[1]

[1]Russian Scientific Center of Roentgenoradiology,
86 Profsoyuznaya str., Moscow, 117997 Russia; e-mail: vbojenko@mail.ru
[2]Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Matrix metalloproteinases (MMPs) responsible for the extracellular matrix remodeling, the activation of various growth factors, and angiogenesis play an important role in the colorectal cancer (CRC) development. In the present work the comparative analysis of MMP-7, -8, -9, and -11 mRNA as well mRNA of the Ki-67 proliferation marker in tissue samples obtained from CRC patients and healthy individuals. Employing the real time PCR method the expression levels of several MMPs (MMP-7, -8, -9, and -11) and cell proliferation marker, Ki-67, were simultaneously measured in 256 tissue samples obtained from 112 patients with CRC: 112 samples of the primary tumor (CRC), 112 samples of the most distant border of morphologically normal colonic mucosa (MNT), 16 samples of liver metastases) and from 16 healthy volunteers who underwent colonoscopy and biopsy. The expression of both MMPs studied and Ki-67 was found to be elevated in CRC primary tumors and liver metastases compared with the normal mucosa. CRC tumor and metastatic cells exhibited similar proliferative activity. The metastases are characterized by the highest cross-correlation of MMPs among tissue types tested. For the first time it was shown that normal mucosa from healthy individuals and CRC patients varied in the MMP-8 expression level. They also had dissimilar MMP correlation patterns thus suggesting that epithelial cells adjusted to CRC tumor differ from mucosal epithelial cells of healthy individuals.

Key words: colorectal cancer, matrix metalloproteinase, Ki-67, mRNA expression