

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ ММП-2, ММП-9 И ИХ ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ

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

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича», Россия, Москва, ryzhakova.olga@list.ru*

Желатиназы А и В – матриксные металлопротеиназы (ММП) – ММП-2, ММП-9, которые относятся к семейству цинковых кальцийзависимых металлопротеиназ. Функции этих ферментов связаны с метаболизмом белков соединительно-тканного матрикса (СТМ). Желатиназы выполняют как деструктивные, так и регуляторные функции. Они гидролизуют коллаген IV типа – основу базальных мембран, а ММП-2 способна гидролизовать фибриллярные коллагены I и III типов. При этом происходит не только деструкция мембраны, но и высвобождение из нее эндотелиальных клеток, способных мигрировать и принимать участие в ангиогенезе, процессе, который наряду с деструкцией, играет основную роль в прогрессии опухолей. Желатиназы гидролизуют и другие компоненты СТМ, такие как эластин, агрекан, адгезивные молекулы – ламинин, фибронектин, витронектин и др., а также модифицируют свойства и освобождают из СТМ целый ряд биологически активных молекул, таких как факторы роста, цитокины и др., которые отвечают за регуляцию сигнальных путей, контролирующих процессы инвазии и ангиогенеза. ММП-9 считают основным «включателем» высвобождения из СТМ эндотелиального фактора роста (VEGF), который является основным индуктором ангиогенеза. ММП-2 относится к конститутивным ферментам и может экспрессироваться в тканях независимо от индуцирую-

ших агентов. ММП-9 является индуцируемым ферментом, экспрессия которого в нормальных тканях находится на очень низком уровне или отсутствует. Экспрессия его в ткани находится под контролем сигнальных путей и зависит от целого ряда агентов, индуцирующих экспрессию ММП, в частности, онкогенов. Кроме того, экспрессия ММП в прилегающей к опухоли ткани стимулируется индуктором экспрессии ММП (EMMPRIN), находящимся на поверхности опухолевых клеток. Активность ММП-2 и ММП-9 на посттрансляционном уровне зависит от наличия их тканевых активаторов и ингибиторов (ТИМП). Активатором ММП-9 является плазмин, который образуется в результате активации плазминогена с помощью уАП. Зимогены этих ММП могут обладать частичной активностью в результате их ступенчатой активации с участием активных форм ММП. Основным ингибитором ММП-2 и ММП-9 является ТИМП-2, который наряду с ММП-14 принимает участие в активации про-ММП-2.

Итак, ММП-2 и ММП-9 в результате ограниченного протеолиза освобождают ряд биологически активных молекул, которые участвуют в регуляции сигнальных путей и способствуют экспрессии ММП как в опухоли, так и нормальной ткани. В ряде случаев наблюдается высокая экспрессия ММП не только в опухоли, но и в строме и СТМ, причем на достаточно высоком уровне, иногда превосходящем опухолевую ткань. Это приводит к генерализации онкологического процесса.

Настоящее исследование посвящено изучению особенностей экспрессии важнейших ферментов инвазии, деструкции и ангиогенеза – желатиназ (ММП-2 и ММП-9) и их эндогенных регуляторов (ТИМП-2 и уАП) при плоскоклеточной карциноме шейки матки (ПКШМ) в теле матки, которое отличается по морфологическому строению от шейки матки. Рак шейки матки занимает второе место после рака молочной железы по частоте заболеваемости и смертности у женщин. Этиологическими факторами возникновения рака шейки матки служат вирусы папиллом (HPV) высокого риска, среди которых вирусы HPV16 и HPV18 типов являются наиболее распространенными и агрессивными. Основные работы по исследованию экспрессии ММП проведены на клетках и клеточных линиях. В случае ПКШМ была установлена корреляция экспрессии ММП-2 и ММП-9 в тканях опухоли и плазме крови со стадией заболевания, степенью дифференцировки, васкуляризацией и метастазированием в лимфатические узлы, а также получены данные об увеличении экспрессии этих ферментов и ТИМП-2. Данные по экспрессии ММП и ингибиторов в морфологически нормальной ткани, окружающей опухоль, единичны.

Цель исследования – изучение особенностей экспрессии желатиназ А и В (матриксных металлопротеиназ – ММП-2 и ММП-9) и эндогенных регуляторов их активности: тканевого ингибитора ТИМП-2 и активатора про-ММП-9 – активатора плазминогена урокиназного типа – уАП, как факторов инвазии, в теле матки при плоскоклеточной карциноме шейки матки (ПКШМ). Эти сравнительные исследования позволяют оценить потенциал важнейших факторов инвазии, уровень их экспрессии и деструктивной активности в опухолевой и нормальной ткани матки, отличающейся по структуре от ткани шейки матки и находящейся вне зоны рака шейки матки.

Материалы и методы. В работе был использован операционный материал, полученный после экстирпации матки у пациенток с диагнозом плоскоклеточная карцинома шейки матки (ПКШМ) - 8 тканевых «лент», взятых на протяжении от стенки влагалища до дна полости матки, которые были разделены на фрагменты длиной около 1см и содержали от 4 до 6 фрагментов. Образцы были заморожены немедленно и хранились в жидком азоте. Все случаи были классифицированы по TNM клинической классификации опухолей в соответствии с требованиями международного союза по борьбе с раком (UICC). Ткани были гистологически идентифицированы, все образцы карцином экспрессировали ген E7 HPV16.

ОТ-ПЦР и иммуногистохимический анализ образцов проводили по стандартным методикам, активность ММП-2 и ММП-9 определяли методом зимографии, активность

уАП определяли флуориметрическим методом по гидролизу специфического субстрата Z-Gly-Gly-Arg-MCA.

Результаты и обсуждение. Исследование спектра и активности ММП-2 и ММП-9 методом зимографии показало, что во фрагментах пяти «лент», содержащих ПКШМ, наблюдалась высокая активность ММП-9, однако экспрессия ММП-9 происходила и в ткани матки, где в нормальных условиях она отсутствует, однако уровень ее экспрессии был в 2-3 раза ниже, чем в опухоли. Активность ММП-2 была существенно ниже, чем ММП-9, и равномерно выражена по всей длине «ленты». Полученные данные свидетельствуют о том, что при ПКШМ высокая экспрессия конститутивного фермента - ММП-2 и индуцируемого фермента - ММП-9 происходит не только в опухоли, но и в нормальной ткани матки, что способствует развитию инвазивного процесса. ММП-9 может служить маркером инвазивного процесса. Три другие «ленты» показали иную картину распределения активности. Активность ММП-9 наблюдалась только во фрагментах ПКШМ, а в нормальной ткани матки отсутствовала. Активность ММП-2 и находились на высоком уровне по всей длине тканевой «ленты». Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень экспрессии ММП-2 и ММП-9, может иметь прогностическое значение, для чего важно определять уровень ММП не только в опухоли, но и в окружающей опухоль нормальной ткани.

Исследование экспрессии генов ММП-2, ММП-9, их тканевого ингибитора ТИМП-2 и активатора уАП показало, что экспрессия ММП-9 выражена не только в опухолевых образцах, но и в нормальной ткани, хотя и на более низком уровне. Экспрессия генов ММП-2 происходит как в образцах, содержащих опухоль, так и в нормальной ткани. Данные по экспрессии ММП-2 и ММП-9 согласуются с результатами, полученными методом зимографии. Экспрессия регулятора активности ММП-9 уАП в опухолевой ткани была наиболее выраженной. Экспрессия ТИМП-2 была равномерной и достаточно выраженной по всей длине «ленты». Следует учесть, что ТИМП-2 обладает не только функцией ингибитора, но и в комплексе с мембраносвязанной металлопротеиназой ММП-14 принимает участие в активации ММП-2. Соответственно, высокая экспрессия ТИМП-2, наряду с высокой экспрессией ММП-14, направлена на увеличение протеолитического потенциала и опухолевой и морфологически нормальной ткани.

Исследование активности уАП – активатора ММП-9 показало, что активность фермента находилась на достаточно высоком уровне во всех образцах как опухолевой, так и нормальной ткани до дна полости матки. Удельная активность уАП практически во всех «лентах» имела наивысшие значения во фрагментах, содержащих опухолевую ткань, где ее значения колебались в пределах от 100 до 290 пм / мин / мг белка. Во фрагментах ткани, не содержащих опухолевую ткань, удельная активность уАП находилась в пределах от 25 до 75 пм / мин / мг белка. Однако в двух случаях активность уАП была в 2-2,5 раза выше в нормальных образцах, что может иметь прогностическое значение. Высокая активность уАП характеризует высокую потенциальную возможность проявления ферментативной активности ММП, кроме того, уАП, как сериновая протеиназа, может участвовать в деградации тканей, усиливая деструктивный потенциал опухоли.

Исследование уровней экспрессии ММП-2, ММП-9 и их тканевого ингибитора ТИМП-2 было проведено методом ИГХ на образцах ПКШМ и морфологически нормальных тканей залитых в парафин. Оценка результатов проводилась по интенсивности реакции полуколичественным методом по 3-х бальной шкале (от 0 до 3 баллов). Иммуногистохимический анализ фрагментов тканевых «лент» показал, что в большинстве случаев опухоль располагается в первых двух-трех фрагментах. Иммуногистохимическое исследование экспрессии ММП-2 показало наличие яркой положительной реакции (2-3 балла) в клетках опухоли. В строме опухоли и морфологически нормальной ткани положительная реакция была достаточно выражена. Для экспрессии ММП-9 характерно наличие выраженной позитивной реакции (2-3 балла) и в клетках опухоли и строме. Во фрагментах, где опухоль отсутствовала, также наблюдалось позитивное окрашивание, хотя и меньшей ин-

тенсивности, чем в опухоли. Следует учесть, что в нормальных тканях экспрессия ММП-9 отсутствует или находится на очень низком уровне. ТИМП-2 иммуногистохимически был выявлен не во всех образцах как в опухоли, так и в строме. Распределение выявленной на образцах, залитых в парафин, иммуногистохимической экспрессии ММП-2, ММП-9 в целом совпадает с данными по экспрессии генов и ферментативной активности, полученных на замороженном материале тканевых «лент». Исключение составляют данные по экспрессии ТИМП-2, которые в случае ИГХ исследований на образцах, залитых в парафин, также согласуются с результатами по генной экспрессии. Однако, как правило, по данным полученным ранее, в тканевых «лентах» обнаруживали слабое присутствие или отсутствие ТИМП-2, а данные ОТ-ПЦР свидетельствовали о выраженном наличии ТИМП-2 в тех же образцах. Это расхождение в результатах только за счет чувствительности методов в настоящее время объяснить достоверно не представляется возможным. Подобные расхождения отмечают и другие авторы.

Полученные нами данные по экспрессии ММП-2 и ММП-9 в теле матки при ПКШМ в основном согласуются с результатами, полученными нами ранее при исследовании экспрессии этих ферментов в фибробластах, трансформированных E7 онкогеном HPV16, а также на коммерческих клеточных линиях ПКШМ и на клиническом материале.

Заключение. Экспрессия желатиназ ММП-2, ММП-9 и регуляторов их активности направлена на увеличение деструктивного (инвазивного) потенциала опухоли и может происходить (индуцироваться) в нормальной ткани тела матки. Индуцируемая в теле матки ММП-9 может служить маркером инвазивного потенциала. Экспрессия ММП-2 и ММП-9, как факторов инвазии, в различных случаях ПКШМ может существенно различаться и может иметь прогностическое значение, поэтому важно определять уровень ММП не только в опухоли, но и в окружающей опухоль нормальной ткани. Нарушение регуляции экспрессии этих ферментов происходит не только на генном, но и на посттрансляционном уровне, а их повышенная экспрессия направлена на развитие инвазивного потенциала. Данные указывают на различные функции ММП-2 и ММП-9 в тканях. Они важны для понимания роли желатиназ ММП-2, ММП-9 в процессе канцерогенеза, могут иметь прогностическое значение и влиять на терапевтическую стратегию в отношении пациента.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013 – 2020 гг.