

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ ММП-9 И ЕЕ ЭНДОГЕННОГО ИНГИБИТОРА ТИМП-1 В ПЛАЗМЕ БОЛЬНЫХ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМИ КАРЦИНОМАМИ ГОЛОВЫ И ШЕИ

Е.В. Клишо, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов, Д.А. Шишкин

НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН

Проведено исследование продукции металлопротеиназы ММП-9 и ее эндогенного ингибитора ТИМП-1 в плазме крови больных ПКГШ. В группу исследования вошли 43 больных в возрасте 31-77 лет, из них с опухолями гортани -15, дна полости рта - 8, языка - 7, остальные локализации были представлены единичными случаями. В дальнейшем мы объединили больных с различной локализацией опухолей в общую группу ПКГШ, поскольку достоверных различий исследуемых показателей не было обнаружено. Была проведена оценка связи исследуемых показателей с клинико-морфологическими параметрами течения заболевания, такими как возраст больного, продолжительность анамнеза, гистотип и стадия опухолевого процесса. Было обнаружено снижение уровня ММП-9 ($p=0,03$) и увеличение коэффициента ТИМП-1/ММП-9 ($p=0,01$) у больных с продолжительностью заболевания 6-12 мес по сравнению с аналогичными показателями больных, обследованных менее чем через 6 мес от начала заболевания. Наиболее высокий уровень ММП-9 в плазме крови у больных с распространением опухоли, соответствующей T_2 , при T_3 он снижался ($p=0,04$). Обратная зависимость наблюдалась для отношения ТИМП-1/ММП-9 ($p=0,04$). Показано, что уровень ТИМП-1 в плазме крови больных ПКГШ без метастазов в региональных лимфоузлах выше, чем у больных без регионарных метастазов ($p=0,04$), что говорит о важной роли продукции ингибитора металлопротеиназ в развитии процессов метастазирования. Выявление прогностической значимости исследуемых показателей требует дальнейшего динамического наблюдения за исследуемой группой больных.

ASSESSMENT OF PLASMA LEVELS OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 AND ITS ENDOGENOUS INHIBITOR TIMP-1 IN PATIENTS WITH HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

E.V. Klisho, I.V. Kondakova, E.L. Choinzonov, D.A. Shishkin

Cancer Research Institute, Tomsk, Russia

Despite considerable progress in the treatment of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), the search for the new prognostic criteria is of great importance. The study analyzed the production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its tissue inhibitor (TIMP-1) in blood plasma of 43 patients with HNSCC in the age range 31-77 years. The study evaluated the correlation of MMP-9 and TIMP-1 levels with clinicopathological parameters such as age of the patients, history duration, histological type and stage of the tumor. The reduction in the level of MMP-9 ($p=0,03$) and the increase in the ratio TIMP-1/MMP-9 ($p=0,01$) were found in patients with a disease duration within 6-12 months as compared to similar indices for patients examined less than in 6 months from the onset of the disease. The highest plasma level of MMP-1 was observed in patients with stage II tumors and it was reduced in patients with stage III tumors ($p=0,04$). The reverse correlation was noted for the ratio TIMP-1/MMP-9 ($p=0,04$). The plasma level of TIMP-1 for patients with HNSCC without regional metastases was shown to be higher than in patients with regional metastases ($p=0,04$). Therefore, the production of matrix metalloproteinase inhibitor plays an important role in the development of metastases. The detection of prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 levels requires longer follow-up time for the studied group of patients.

Несмотря на определенные успехи, достигнутые в лечении опухолей головы и шеи, поиск новых прогностических критериев, отражающих фактическое состояние опухолевой прогрессии и дающих объективный прогноз течения болезни, остается актуальным. В процессе канцеро-

генеза малигнизированная ткань начинает производить так называемые маркеры опухолевой прогрессии - продукты, не свойственные нормальным клеткам, но необходимые для реализации тех или иных свойств опухоли [4]. Согласно современным представлениям о механизмах

метастазирования, для инвазивного роста, интра- и экстравазации опухолевым клеткам необходимо преодолевать барьеры в виде базальных мембран, экстраклеточного матрикса и тканевых структур. Для этого малигнизированные клетки, самостоятельно или с помощью стимуляции клеток окружающей стромы, вырабатывают протеолитические ферменты, в том числе металлопротеазы ММП-2 и ММП-9, способные к гидролизу белков базальной мембраны. В настоящее время эти ферменты претендуют на роль факторов прогноза опухолевой прогрессии [1,9]. Сравнивая прогностическую значимость определения ММП-2 и ММП-9 у больных, большинство исследователей, изучающих роль металлопротеиназ в развитии плоскоклеточных карцином головы и шеи (ПКГШ), считают, что ММП-9 может играть более важную роль, чем ММП-2, в качестве полезного маркера для динамического клинического наблюдения пациентов с данной локализацией опухолевого процесса [2, 8], поэтому в нашей работе мы остановились на исследовании уровня ММП-9 в плазме больных с ПКГШ. Представляется важным изучение и эндогенных ингибиторов протеаз, так как именно нарушение тонкого баланса протеаза/ингибитор приводит к активации протеолиза. Поэтому определение продукции протеаз и их ингибиторов, позволяющих получить представление о реальном состоянии опухолевой прогрессии, имеет научный и практический интерес. В нашей работе мы посчитали целесообразным проанализировать содержание тканевого ингибитора металлопротеиназ-1 (ТИМП-1), который является эндогенным ингибитором ММП-9, и проанализировать соотношение ингибитор/фермент в плазме данной группы больных.

Материалы и методы

В группу исследования вошли 43 больных плоскоклеточными карциномами гортани, органов полости рта, глотки, носа и придаточных пазух в возрасте от 31 до 77 лет (средний возраст 55,7 года), проходивших лечение в НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН в период с сентября 2003 г. по июнь 2004 г. Материалом исследования послужила гепаринизированная плазма крови больных, не подвергавшихся лечению.

Плазму хранили при -20°C не более 10 мес, и размораживали не более 1 раза для исследования уровня ферментов. Исследование уровня ММП-9 и ТИМП-1 в плазме крови проводилось с использованием наборов для твердофазного иммуноферментного анализа (Human MMP-9 Quantikine ELISA Kit, Human Human TIMP-1 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, USA) 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 Колмогорова - Смирнова. При нормальном распределении значений применялся параметрический t-критерий Стьюдента. Для значений, закон распределения которых отличался от нормального, был применен непараметрический критерий Манна - Уитни.

Результаты и обсуждение

В настоящей работе было проведено исследование содержания металлопротеиназы ММП-9 и ее эндогенного ингибитора ТИМП-1 в плазме крови больных опухолями головы и шеи. Основные группы больных составили больные с опухолями гортани ($n=15$), больные с опухолями дна полости рта ($n=8$) и языка ($n=7$), остальные локализации опухолевого процесса представлены единичными случаями (табл. 1). В дальнейшей работе мы объединили больных с различной локализацией опухолевого процесса в общую группу ПКГШ, поскольку достоверных различий исследуемых показателей не было обнаружено (табл. 1).

На следующем этапе работы была выявлена связь исследуемых показателей с клинико-морфологическими параметрами течения заболевания, такими как возраст больного, продолжительность анамнеза, гистологический тип опухоли и стадия опухолевого процесса (табл. 2,3).

Нами не было выявлено связи уровня ММП-9 и ТИМП-1 в плазме крови с возрастом больных, однако было обнаружено достоверное снижение уровня ММП-9 ($p=0,03$) и увеличение коэффициента ТИМП-1/ММП-9 ($p=0,01$) у больных с продолжительностью заболевания от 6 до 12 мес по сравнению с аналогичными пока-

Таблица 1
Уровень ММП-9, ТИМП-1 и ТИМП-1/ММП-9
плазмы крови при различных локализациях опухолей
головы и шеи

Локализация опухолевого очага	n	ТИМП-1 (нг/мл)	ММП-9 (нг/мл)	ТИМП-1/ ММП-9
Рак гортани	15	126,2±32,1	43,7±36,9	5,07±3,57
Рак слизис- той дна полости рта	8	109,0±16,9	57,3±46,5	4,52±4,63
Рак языка	7	105,5±11,7	31,0±19,2	4,99±3,12
Рак горта- ноглотки	3	127,3±53,6	36,0±6,9	3,74±1,98
Рак рото- глотки	3	126,3±23,2	52,6±44,1	5,26±5,57
Рак слизис- той щęki	3	91,0±34,1	80,0±56,7	2,53±2,97
Рак носо- глотки	1	123,0	10,8	11,39
Рак губы	1	66,0	172,0	0,39

Таблица 2
Зависимость плазменных уровней ММП-9, ТИМП-1 и
ТИМП-1/ММП-9 от возраста больных,
продолжительности анамнеза
и гистологического типа опухоли

Изучаемые показатели		п	ТИМП-1 (нг/мл)	ММП-9 (нг/мл)	ТИМП-1/ММП-9
Возраст больных	30 - 45 лет	6	114,3±22,6	25,3±20,5	7,16±4,02
	46 - 60 лет	21	118,3±34,3	55,8±45,7	4,31±3,81
	61 - 75 лет	15	112,6±23,5	53,8±41,5	4,03±3,31
Продолжи- тельность анамнеза	< 6 мес	23	111,4±27,1	61,5±42,2*	3,32±2,77**
	7 - 12 мес	12	121,2±28,8	31,5±25,9*	6,39±3,96**
	>13 мес	5	118,2±44,2	58,9±65,2	4,84±4,28
Гистотип опухоли	НПР	7	117,7±12,5	58,8±52,8	5±4,43
	УПР	21	111,2±32,1	53,1±47,4	4,58±3,74
	ВПР	11	118,4±31,9	43,3±31,2	4,86±4,05

Примечания: * - различия достоверны (p=0,03),

** - различия достоверны (p=0,01),

НПР - низкодифференцированный плоскоклеточный рак,

УПР - умереннодифференцированный плоскоклеточный рак,

ВПР - высокодифференцированный плоскоклеточный рак.

Таблица 3
Зависимость уровня ММП-9, ТИМП-1
и ТИМП-1/ММП-9 в плазме больных
опухолями головы и шеи от
местной распространенности опухоли

Распространен- ность по кри- териями T, N	n	ТИМП-1 (нг/мл)	ММП-9 (нг/мл)	ТИМП- 1/ММП-9
T	1 5	111,0±29,7	41,0±20,2	4,35±4,29
	2 10	114,4±26,8	68,3±47,1*	3,02±2,69*
	3 20	120,4±31,2	39,7±41,4*	5,77±3,72*
	4 7	107,9±28,1	62,4±44,1	4,08±4,43
N	0 24	121,8±26,2*	49,2±35,9	4,91±4,15
	1+2 15	103,4±26,2*	50,1±48,1	0,606±0,785

Примечания: * - различия достоверны (p=0,04).

зателями больных, обратившихся за помощью менее чем через 6 мес от начала заболевания. Возможно, именно высокая продукция протеа-зы является предпосылкой высокой скорости развития заболевания. Мы не выявили досто-верных различий уровня протеазы и ингибитора в зависимости от степени гистологической дифференцировки опухоли.

Была обнаружена связь исследуемых пара-метров со стадией первичного опухолевого про-цесса (T). Самый высокий уровень ММП-9 в плазме крови больных наблюдался на T₂ стадии опухолевого процесса и достоверно (p=0,04) снижался при T₃. Обратная зависимость наблю-далась для отношения ТИМП-1/ММП-9 (p=0,04). Уровни исследуемых показателей не значимо отличались для группы больных с T₄ стадией опухолевого процесса, вероятно, потому, что эта группа больных была представлена недостаточным количеством больных (табл. 3). Учитывая, что в ряде работ было показано, что серологическая концентрация ММП-9 была значительно выше у пациентов с ПКГШ, чем у здоровых людей [7, 8], а инвазивные свойства клеточных линий, производных от человеческих ПКГШ, могут быть существенно снижены с помощью антител против ММП-9 [5], важная роль ММП-9 в инвазии опухолей головы и шеи не оставляет сомнений. Представленные исследования показали связь уровня ММП-9 в плазме крови с местной распространенностью опухолевого процесса. Данные, полученные в настоящей работе, подтверждаются результа-

тами других исследователей, выявившими значительные корреляции между уровнями ММП-9 и Т-стадией опухолевого процесса у больных ПКГШ [6, 8].

Особый интерес представляют исследования связи продукции ММП-9 и ТИМП-1 с состоянием регионарных лимфатических узлов, так как металлопротеазы рассматриваются как потенциальные факторы прогноза метастазирования. В нашей работе было показано, что уровень ТИМП-1 в плазме крови больных ПКГШ без метастазов в регионарных лимфоузлах достоверно ($p=0,04$) выше, чем у больных с метастазами (табл. 3), что говорит о значительной роли ингибитора в развитии процессов метастазирования. Подобные результаты были получены и другими исследователями, показавшими, что уровни ТИМП-1 в гистологических опухолевых препаратах были выше в неметастатических опухолях, чем в метастатических [3].

Таким образом, была обнаружена связь уровня ММП-9 и ТИМП-1 в плазме крови больных ГЖГШ с клинико-морфологическими параметрами течения заболевания, такими как скорость развития заболевания и локорегионарная распространенность опухолевого процесса, оцененная по критериями Т и N. Представляет большой интерес дальнейшее динамическое наблюдение за группой больных, исследованных в настоящей работе, так как полученные клинические результаты позволят подтвердить

прогностическую и предсказательную значимость определения уровня металлопротеаз и их ингибиторов в крови больных ПКГШ.

Литература

1. Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Ц. Матричные металлопротеиназы в онкогенезе // Сибирский онкологический журнал. 2003. № 2. С. 62 - 71.
2. Hong S.D., Hong S.P., Lee J.I., Lim C.Y. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential // Oral Oncol. 2000. Vol. 36, № 2. P. 207 - 213.
3. Ikebe T., Shinohara M., Takeuchi H. et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer // Clin Exp Metastasis. 1999. Vol. 17, № 4. P. 315 - 323.
4. Lynch C.C., Matrisian L.M. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication // Differentiation. 2002. Vol. 70. P. 561 - 573.
5. O'Charoenrat P., Rhys-Evans P., Modjtahedi H. et al. Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and in vitro invasion // Int. J. Cancer. 2000. Vol. 86, № 3. P. 307 - 317.
6. O'Charoenrat P., Rhys-Evans P.H., Eccles S.A. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck // Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 2001. Vol. 127, № 7. P. 813 - 820.
7. Ranuncolo S.M., Matos E., Loria D. et al. Circulating 92 - kilodalton matrix metalloproteinase (MMP-9) activity is enhanced in the euglobulin plasma fraction of head and neck squamous cell carcinoma // Cancer. 2002. Vol. 94, № 5. P. 1483 - 1491.
8. Riedel K., Gotte K., Schwalb J., Hormann K. Serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 in patients with head and neck squamous cell carcinoma // Anticancer Res. 2000. Vol. 20, № 5A. P. 3045 - 3049.
9. Werner J.A., Rathcke I.O., Mandic R. The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck // Clin. Exp. Metastasis. 2002. Vol. 19, № 4. P. 275 - 282.

Поступила 1.02.05