

РОЛЬ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В РАЗВИТИИ И ПРОГНОЗЕ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ КАРЦИНОМ ГОЛОВЫ И ШЕИ

Е.В. Клишо, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов, Д.А. Шишкин,
О.В. Черемисина, С.Ю. Чижевская

*НИИ онкологии СО РАМН, г. Томск
634009, Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: biochem@oncology.tomsk.ru*

Исследована прогностическая значимость определения ММП-2 и ММП-9 в сыворотке крови у 142 больных опухолями головы и шеи с распространенностью $T_{1-3}N_{0-3}M_0$ с помощью метода ИФА. Уровень содержания ММП-9 в сыворотке крови больных значительно превосходит уровень содержания маркера в сыворотке здоровых лиц. Установлена отрицательная корреляционная связь между уровнем ММП-2 в сыворотке крови и размером опухолевого узла, причем уровень маркера при T_1 стадии значительно выше, чем у здоровых лиц. Высокий уровень содержания ММП-9 в сыворотке крови является признаком плохого прогноза 2-летней общей, безрецидивной и безметастатической выживаемости больных ПКГШ. Высокая вероятность возникновения метастазов у больных опухолями головы и шеи связана с высокими уровнями как ММП-2, так и ММП-9 в сыворотке крови, исследованной до начала лечения.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак головы и шеи, металлопротеины.

ROLE OF MMP-2 AND MMP-9 IN THE DEVELOPMENT AND PROGNOSIS OF SQUAMOUS CELL HEAD AND NECK CARCINOMA

E.V. Klisho, I.V. Kondakova, E.L. Choinzonov, D.A. Shishkin,
O.V. Cheremisina, S.Yu. Chizhevskaya

*Cancer Research Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk
5, Kooperativny Street, 634009-Tomsk, e-mail: biochem@oncology.tomsk.ru*

Prognostic significance of determination of MMP-2 and MMP-9 levels in blood serum of 142 patients with stage $T_{1-4}N_{0-3}M_0$ head and neck cancer was studied using immunoenzymatic assay. The serum MMP-9 level in head and neck cancer patients was significantly higher than that observed in healthy subjects. Negative correlation between the serum MMP-2 level and tumor size was found. The serum MMP-2 level was significantly higher in patients with stage I head and neck cancer than in healthy subjects. High serum MMP-9 level was associated with poor prognosis for 2-year overall, recurrence-free and metastasis-free survivals of head and neck cancer patients. High serum MMP-2 and MMP-9 levels prior to treatment were found to be related to a high risk for metastasis.

Key words: squamous cell head and neck carcinoma, metalloproteinases.

Для индивидуальной противоопухолевой терапии больных плоскоклеточными карцинами головы и шеи (ПКГШ) не всегда бывает достаточно клинико-морфологических критериев прогноза развития заболевания. Поэтому для объективной оценки метастатического потенциала опухоли и прогноза рецидивов возникает потребность в дополнительных молекулярных маркерах опухолевой прогрессии. Выбор прогностических маркеров опирается на современные представления о механизмах канцерогенеза. Известно, что для инвазивного роста, экстра- и интравазации при метастазировании опухолевым клеткам необходимо преодолевать барьеры в виде базальных мембран, экстраклеточного матрикса и тканевых

структур. Эти барьеры опухоли разрушают с помощью протеолитических ферментов, в частности матриксных металлопротеиназ (ММП), которые в настоящее время претендуют на роль прогностических факторов опухолевой прогрессии ПКГШ [12]

Матриксные металлопротеиназы играют основную роль в гидролизе базальной мембраны и экстраклеточного матрикса благодаря своей способности разлагать практически все их компоненты: коллагены всех типов, эластин, протеоглики, ламинин и т.д. Кроме того, исследования последних лет позволили открыть новые функции ММП в опухолевой прогрессии: участие в выходе депонированных факторов роста, расщепление некоторых биоактивных мо-

лекул с образованием веществ с новыми биологическими свойствами, участие в канцерогенезе ряда опухолей, мощный ангиогенный эффект, участие в поддержании жизнеспособности опухолевых клеток [2, 4, 7, 8, 20]. Все перечисленные свойства ММП делают их ключевыми маркерами опухолевой прогрессии.

Матриксные металлопротеиназы согласно своему строению и субстратной специфичности делятся на несколько групп, наиболее перспективным является изучение группы желатиназ, так как желатиназы гидролизуют нефибриллярный коллаген IV типа, образующий базальные мембраны, и поэтому считается, что именно эти протеазы инициируют инвазивные процессы [2]. Группа желатиназ состоит из ММП-2 (желатиназа А) и ММП-9 (желатиназа В).

Повышенную экспрессию ММП-2 в ткани ПКГШ по сравнению со здоровой слизистой оболочке наблюдали многие исследователи [3, 15, 22]. Эти результаты позволяют считать продукцию этого фермента опухолью индикатором степени злокачественного развития ПКГШ. Исследователи выявили корреляцию различной степени между уровнем экспрессии ММП-2 в ткани опухоли и наличием лимфогенных метастазов и инвазивностью [3, 6, 15, 10, 22, 24]. Экспрессия ММП-2 была в значительной степени связана и с отдаленным метастатическим поражением [24]. Эти результаты указывают на важную роль ММП-2 в опухолевой инвазии и метастазировании, что позволяет рассматривать ММП-2 как потенциальный биохимический маркер метастазирования и прогноза течения опухолевого процесса [11].

Следует отметить, что к настоящему времени уже опубликованы отдельные работы по оценке прогностической значимости определения ММП-2 у больных ПКГШ, позволяющих считать высокую активность ММП-2 в опухолевой ткани маркером плохого прогноза развития заболевания [24]. Общая выживаемость больных раком гортани была выше у пациентов с низким уровнем экспрессии ММП-2 в опухоли [6]. Характеристики инвазивного фронта отражают прогноз развития опухоли лучше, чем другие ее зоны. В случае ММП-2-позитивного инвазивного фронта многомерный статистический анализ показал снижение времени общей

выживаемости, связь с лимфогенным метастазированием и Т-стадией опухолевого роста [16]. Авторы исследования заключают, что экспрессия ММП-2 в инвазивном фронте является маркером низкой выживаемости и, вероятно, связана с ранними рецидивами у пациентов без метастазов в лимфатические узлы. Пациенты ПКГШ с высокой активностью ММП-2 имели более короткое время безрецидивной выживаемости после лечения, чем пациенты с опухолями, содержащими низкую активность ММП-2. Эти результаты демонстрируют важность измерения содержания ММП-2 в опухолевых образцах для прогноза безрецидивной выживаемости у больных ПКГШ [23].

Уровень активности [3] и экспрессии ММП-9 [13, 22] у больных ПКГШ был значительно выше в опухолях, чем в образцах нормальной слизистой оболочки. Серологическая концентрация ММП-9 у этих пациентов также была значительно выше, чем у здоровых лиц [17, 19]. У больных ПКГШ была выявлена достоверная корреляционная связь между уровнями содержания ММП-9 в сыворотке крови и экспрессией фермента в опухоли с такими клинкоморфологическими параметрами заболевания, как размер опухоли и наличие метастазов в лимфатических узлах [15, 19]. Кроме того, исследования последних лет обнаружили важную роль ММП-9 в процессах опухолевого ангиогенеза [8, 14, 18, 22], что согласуется с теорией о функции ММП-9 как регулятора опухолевого ангиогенеза, поддерживающего эндотелиальную клеточную инвазию ПКГШ.

У пациентов ПКГШ с высокой активностью ММП-9 в ткани опухоли наблюдалось сокращение времени безрецидивной выживаемости по сравнению с пациентами с низкой активностью ММП-9 [23]. Эти результаты свидетельствуют о том, что измерение активности ММП-9 в опухолевых образцах может быть полезно для прогноза сроков безрецидивной выживаемости пациентов с ПКГШ.

Таким образом, матриксные металлопротеиназы играют важную роль в инвазии и метастазировании злокачественных опухолей головы и шеи. Исследования последних лет указывают на большую предсказательную и прогностическую информативность определения уровня

экспрессии и активности ММП-2 и ММП-9 в опухолевой ткани. Работ по определению прогностической значимости металлопротеиназ в сыворотке крови немного, однако исследования в этом направлении являются наиболее перспективными, так как являются малоинвазивными и подходят для всех групп больных ПКГШ.

Материалы и методы

В группу исследования вошли 144 больных злокачественными опухолями головы и шеи (гортань, органы полости рта, глотки, носоглотки и придаточных пазух) стадии $T_{1-3}N_{0-3}M_0$ в возрасте от 31 до 77 лет (средний возраст – 55,7 года) и 22 здоровых донора в возрасте от 26 до 57 лет. Больные проходили лечение в НИИ онкологии СО РАМН в период с сентября 2003 г. по август 2007 г. Все опухоли имели гистологическое строение плоскоклеточной карциномы разной степени дифференцировки.

Срок наблюдения за больными составил от 1 до 53 мес. Материалом для исследования послужила сыворотка крови больных, не подвергавшихся специальному лечению. Сыворотку хранили при -50°C не более 6 мес и размораживали не более 1 раза для исследования содержания ферментов. Исследование уровня ММП-2 и ММП-9 в сыворотке 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). По поводу основного заболевания пациенты, включенные в исследование, получили комбинированное лечение (предоперационную химиолучевую терапию и операцию) и в самостоятельном варианте лучевую терапию или оперативное вмешательство.

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.

Для оценки прогностической значимости определения ферментов и ингибиторов в сыворотке крови больных ПКГШ использовали однофакторный анализ прогностической значимости признаков, который был выполнен с использованием критерия Гехана–Вилкоксона и log-рангового критерия. Сравнение выживаемости в группах проводили с помощью критерия Гехана–Вилкоксона и log-рангового критерия. Показатели 2-летней общей, безрецидивной и безметастатической выживаемости оценивали с помощью построения кривых выживаемости по методу Каплана–Майера. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$ [1].

Результаты и обсуждение

При анализе полученных результатов было показано значительное повышение уровня ММП-9 в сыворотке крови больных с ПКГШ до $530,0 \pm 37,2$ нг/мл по сравнению с уровнем протеиназы в крови здоровых лиц – $358,3 \pm 42,3$ нг/мл ($p < 0,05$) (таблица). Полученные результаты согласуются с литературными данными, в которых серологическая концентрация ММП-9 была значительно выше у больных ПКГШ, чем у здоровых людей [17, 19].

Рядом исследователей были выявлены значительные корреляции между уровнем экспрессии ММП-9 в опухолевой ткани и размером опухоли у больных [15, 19]. При исследовании сыворотки пациентов нами отмечено достоверное увеличение уровня ММП-2 при местной распространенности опухоли, соответствующей T_1 , и уровня ММП-9 при T_3 и T_4 по сравнению с уровнем показателей у контрольной группы ($p < 0,05$). Кроме того, для ММП-2 показано снижение содержания фермента в крови при увеличении размера опухоли. Особо стоит обратить внимание на высокий уровень ММП-2 уже при I стадии опухолевого процесса. Данное повышение ферментативной экспрессии, вероятно, свидетельствует о важной роли ММП-2 на ранних стадиях развития злокачественных опухолей, и, возможно, ММП могут являться биохимическими маркерами при ранней диагностике рассматриваемых новообразований.

Известные свойства ММП делают их ключевыми маркерами опухолевой прогрессии. Учитывая их связь с клинико-морфологическими

Таблица

**Уровень матриксных металлопротеиназ
ММП-2 и ММП-9 в сыворотке крови
в зависимости от распространенности
процесса у больных ПКГШ**

Здоровые лица	ММП-2		ММП-9	
	n	нг/мл	n	нг/мл
	19	239,4 ± 14,0	22	358,3 ± 42,3
ПКГШ				
Всего	69	255,9 ± 6,2	120	530,0 ± 37,2*
T ₁	8	284,3 ± 17,3*	12	389,6 ± 91,8
T ₂	19	265,9 ± 7,6	26	462,8 ± 73,3
T ₃	40	245,6 ± 9,0**	69	541,7 ± 50,9*
T ₄	2	252,2 ± 51,0	11	641,1 ± 117,4*
N ₀	45	258,9 ± 7,5	74	498,5 ± 46,7
N ₁	17	242,1 ± 13,4	27	575,4 ± 85,0*
N ₂	4	276,3 ± 18,7	10	534,4 ± 118,8*
N ₃	3	261,6 ± 39,3	6	505,5 ± 124,2

Примечания: * – различия статистически достоверны по сравнению с группой здоровых лиц ($p < 0,05$); ** – различия статистически достоверны по сравнению с группой «T1» ($p < 0,05$).

параметрами заболевания, с помощью однофакторного анализа прогностической значимости признаков с помощью критерия Гехана–Вилкоксона и log-рангового критерия мы изучили эти ферменты в качестве факторов прогноза выживаемости больных ПКГШ. В результате наблюдения за больными ПКГШ независимо от локализации первичного очага, его стадии и метода лечения, прогрессирование процесса за счет развития рецидивов опухоли было отмечено у 34 (30,4 %) больных (сроки возникновения рецидива в среднем составили 14 мес) и за счет образования метастазов – у 21 (18,8 %) пациента (в сроки от 2 до 26 мес, в среднем – через 10,9 мес). Была выявлена прогностическая значимость обоих изучаемых параметров и определен пороговый уровень значения показателей в сыворотке крови, при превышении которого наблюдалось статистически достоверное снижение выживаемости больных ПКГШ.

При оценке 2-летней общей выживаемости был выявлен один статистически значимый критерий: уровень содержания ММП-9 в

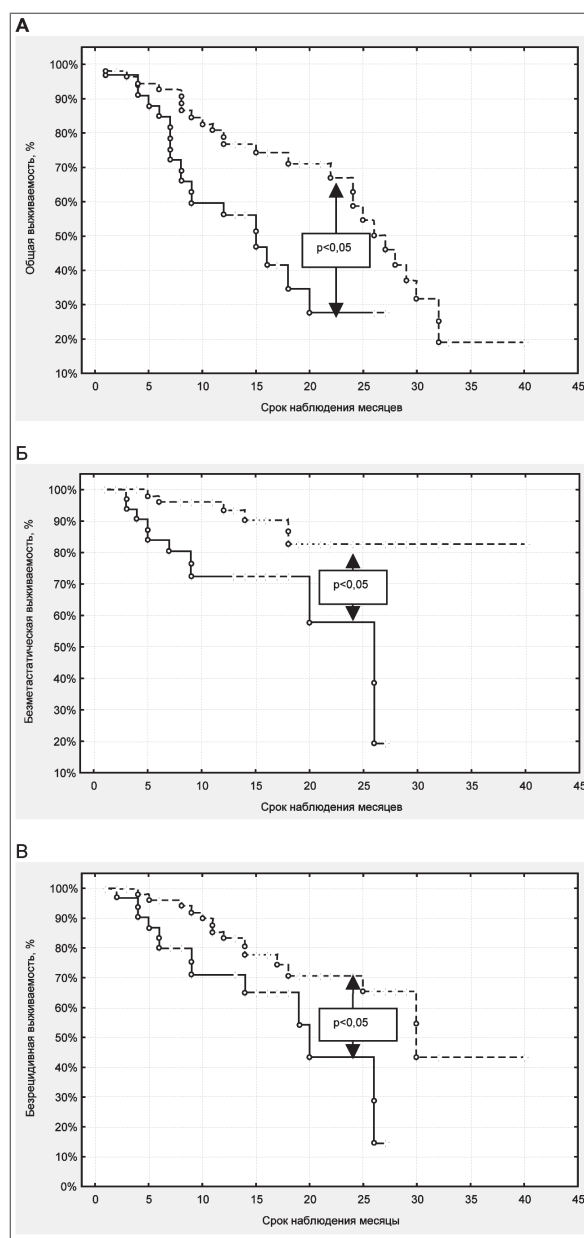


Рис. 1. Показатели общей (А), безметастатической (Б) и безрецидивной (В) выживаемости больных ПКГШ в зависимости от порогового уровня ММП-9 в сыворотке крови, равного 550 нг/мл.

Примечание: — уровень ММП-9 более 550 нг/мл;
--- уровень ММП-9 менее 550 нг/мл

сыворотке крови. Так, показатели 2-летней общей выживаемости были достоверно выше у больных ПКГШ при уровне содержания ММП-9 в сыворотке крови менее 550 нг/мл, по

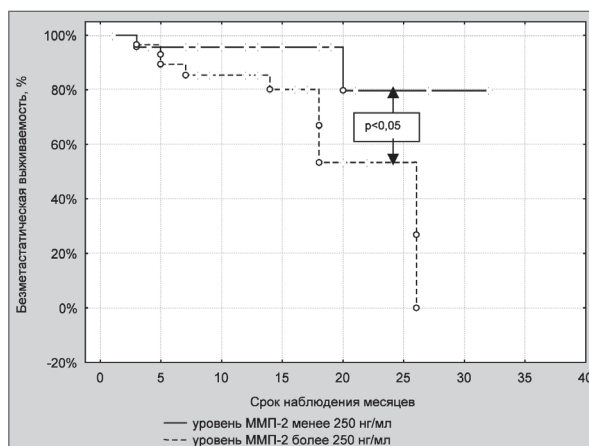


Рис. 2. Безметастатическая выживаемость больных ПКГШ в зависимости от порогового уровня ММП-2 в сыворотке крови, равного 250 нг/мл

сравнению с больными, у которых было более высокое содержание фермента ($p=0,009$; тест Gehan's Wilcoxon; $p=0,016$ тест Log-Rank; $n=89$) (рис. 1А). Таким образом, высокие концентрации ТИМП-1 в сыворотке крови коррелируют с плохим прогнозом общей 2-летней выживаемости. Безрецидивная выживаемость достоверно выше у больных с содержанием ММП-9 в сыворотке крови ниже 550 нг/мл, по сравнению с больными с более высоким уровнем ММП-9 ($p<0,05$) (рис. 1В).

При оценке показателей безметастатической выживаемости была выявлена информативность исследования обоих маркеров в сыворотке крови. Безметастатическая выживаемость была достоверно выше у больных с уровнем содержания ММП-9 в сыворотке крови менее 550 нг/мл. (рис. 1Б) и с уровнем содержания ММП-2 менее 250 нг/мл, чем у больных с более высоким содержанием ферментов (рис. 2) ($p<0,01$).

Таким образом, анализ полученных результатов позволил сделать вывод о том, что высокий уровень содержания ММП-9 в сыворотке крови является признаком плохого прогноза 2-летней общей, безрецидивной и безметастатической выживаемости больных ПКГШ. Высокая вероятность возникновения метастазов у больных опухолями головы и шеи связана с высокими уровнями как ММП-2, так и ММП-9 в сыворотке крови, исследованной до начала лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боровиков В.П. Программа STATISTICA для студентов и инженеров. М.: Компьютер Пресс, 2001. 301 с.
2. Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. Матричные металлопротеиназы в онкогенезе // Сибирский онкологический журнал. 2003. № 2. С. 62–71.
3. Bogusiewicz M., Stryjecka-Zimmer M., Szymanski M. et al. Activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 in advanced laryngeal cancer // Otolaryngol. Head Neck Surg. 2003. Vol. 128, № 1. P. 132–136.
4. Chang C., Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis // Trends Cell Biol. 2001. Vol. 11, № 11. P. 37–43.
5. Charous S.J., Stricklin G.P., Nanney L.B. et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma // Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 1997. Vol. 106, № 4. P. 271–278.
6. Danilewicz M., Sikorska B., Wagrowska-Danilewicz M. Prognostic significance of the immunorexpression of matrix metalloproteinase MMP2 and its inhibitor TIMP2 in laryngeal cancer // Med. Sci. Monit. 2003. Vol. 9, № 3. P. 42–47.
7. Egeblad M., Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression // Nat. Rev. Cancer. 2002. Vol. 2, № 3. P. 161–174.
8. Heissig B., Hattori K., Friedrich M. et al. Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases // Curr. Opin. Hematol. 2003. Vol. 10, № 2. P. 136–141.
9. Imanishi Y., Fujii M., Tokumaru Y. et al. Clinical significance of expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 in human head and neck squamous cell carcinoma // Hum. Pathol. 2000. Vol. 31, № 8. P. 895–904.
10. Kawata R., Shimada T., Maruyama S. et al. Enhanced production of matrix metalloproteinase-2 in human head and neck carcinomas is correlated with lymph node metastasis // Acta. Otolaryngol. 2002. Vol. 122, № 1. P. 101–106.
11. Kawata R., Shinomiya T., Yasuda N. et al. Matrix metalloproteinase-2 concentrations in squamous cell carcinoma of the head and neck and its clinical significance // Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho. 1996. Vol. 99, № 2. P. 299–305.
12. Lynch C.C., Matrisian L.M. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication // Differentiation. 2002. Vol. 70. P. 561–573.
13. Magary S.P., Ryan M.W., Tarnuzzer R.W., Kornberg L. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma: A quantitative analysis // Otolaryngol. Head Neck Surg. 2000. Vol. 122, № 5. P. 712–716.
14. 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.
15. 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.
16. Ondruschka C., Buhtz P., Motsch C. et al. Prognostic value of MMP-2, -9 and TIMP-1,-2 immunoreactive protein at the invasive front in advanced head and neck squamous cell carcinomas // Pathol. Res. Pract. 2002. Vol. 198, № 8. P. 509–515.
17. Ranuncolo S.M., Matos E., Loria D. 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.
18. Riedel F., Gotte K., Schwalb J. et al. Expression of 92- kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma // Int. J. Oncol. 2000. Vol. 17, № 6. P. 1099–1105.

19. Riedel F., 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.

20. Sternlicht M.D., Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001. № 17. P. 463–516.

21. Tokumaru Y., Fujii M., Otani Y. *et al.* Activation of matrix metalloproteinase-2 in head and neck squamous cell carcinoma: studies of clinical samples and in vitro cell lines co-cultured with fibroblasts // *Cancer Lett.* 2000. Vol. 150, № 1. P. 15–21.

22. 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.

23. Yasuda T., Sakata Y., Kitamura K. *et al.* Localization of plasminogen activators and their inhibitor in squamous cell carcinomas of the head and neck // *Head Neck.* 1997. Vol. 19, № 7. P. 611–616.

24. Yorioka C.W., Coletta R.D., Alves F. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients // *Int. J. Oncol.* 2002. Vol. 20, № 1. P. 189–194.

Поступила 24.08.09