

УДК 618.19-006.6:616.15:577.112.854

*А.И. Катунина, Е.С. Герштейн, В.Д. Ермилова, И.В. Терешкина, А.Ю. Назаренко, А.А. Тулеуова, О.В. Кузнецова, З.К. Карабекова, М.В. Грицкевич, Е.К. Дворова, Т.Т. Березов*

**СОДЕРЖАНИЕ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ 2; 7 И 9  
В ОПУХОЛЯХ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**  
*РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

**Контактная информация:**

*Герштейн Елена Сергеевна*, Лаборатория клинической биохимии

**адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-11-59; **факс** +7(495)324-63-52;

**e-mail:** [esgershtein@gmail.com](mailto:esgershtein@gmail.com)

Статья поступила: 01.09.2010, принята к печати 16.09.2010.

**Резюме**

Иммуноферментными методами показано, что содержание ММП 2 и 7 повышено в опухолях по сравнению с окружающей гистологически неизмененной тканью у 91 и 76 % больных раком молочной железы соответственно, а уровни ММП-9 в опухолях и неизмененной ткани достоверно не отличаются. Концентрации ММП-2 и ММП-7 в сыворотке крови не коррелируют с соответствующими показателями в опухолях, не превышают норму и достоверно не снижаются после удаления первичной опухоли. Уровень ММП-9 в сыворотке крови больных достоверно ниже, чем в таковой группы контроля, а после операции повышается в 85% случаев. Однозначной взаимосвязи исследованных показателей с клинико-морфологическими факторами прогноза РМЖ не обнаружено.

**Ключевые слова:** матриксные металлопротеиназы 2; 7; 9, рак молочной железы.

*A.I. Katunina, E.S. Gershtein, I.V. Tereshkina, A.Yu. Nazarenko, V.D. Ermilova, A.A. Tuleuova, O.V. Kuznetsova, Z.K. Karabekova, M.V. Gritskovich, E.K. Dvorova, T.T. Berezov*

**CONTENT OF MATRIX METALLOPRONEINASES 2; 7 AND 9  
IN THE TUMORS AND BLOOD SERUM OF BREAST CANCER PATIENTS**

*Russian N.N.Blokhin Cancer Research Center RAMS;*

**Abstract**

A significant increase of matrix metalloproteinases' (MMP) 2 and 7 levels in the tumors as compared to adjacent histologically unchanged mammary gland was demonstrated by enzyme-linked immunosorbent assays in 91 and 76% of breast cancer patients respectively, while MMP-9 levels in these tissues did not differ significantly. The concentrations of MMP-2 and MMP-7 in blood serum were not associated with corresponding tumor values, did not exceed the control levels, and did not decrease after the excision of primary tumor. Serum MMP-9 was significantly decreased in breast cancer patients as compared to control group, and increased post-surgically in 85% of the patients. No unambiguous associations between the parameters studied and breast cancer clinico-morphologic prognostic factors were revealed.

**Key words:** matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 7, matrix metalloproteinase 9, breast cancer.

**Введение**

Одним из основных механизмов инвазии злокачественных опухолей является разрушение окружающей базальной мембраны и ВКМ ассоциированными с опухолью протеазами, играющими также важную роль в процессах метастазирования и неоангиогенеза. В инвазии и метастазировании задействовано несколько классов протеаз, в том числе – мультигенное семейство матриксных металлопротеиназ или матриксинов, названных так за свою способность специфически гидролизовать все основные ВКМ и состоящее из более чем 20 секретируемых или связанных с поверхностью клетки цинк-зависимых эндопептидаз [9].

Субстратами ММП помимо большинства компонентов ВКМ могут быть также другие протеазы, хемотаксические молекулы, латентные формы факторов роста, растворимые и мембранно-ассоциированные белки, связывающие факторы роста [7].

Активность ММП в межклеточном пространстве специфически подавляется ТИМП – структурно родственными белками, три из которых (ТИМП-1; 2 и 4) секретируются в растворимой форме, а один (ТИМП-3) связан с ВКМ. ТИМП играют также важную самостоятельную роль в регуляции роста и диф-

ференцировки опухолевых и нормальных клеток и обладают антиангиогенными свойствами [4]. В определенной степени антиангиогенной активностью обладают и сами ММП, поскольку они участвуют в образовании антиангиогенных пептидов из более крупных белков [6; 10].

Для многих ММП продемонстрировано увеличение экспрессии и активности в опухолях различного генеза, причем эта активация происходит по паракринному механизму с участием факторов роста и цитокинов, секретируемых инфильтрирующими опухоль макрофагами и лимфоцитами, а также клетками опухолевой стромы [9; 15]. В связи с этим различные ММП и ТИМП рассматриваются в настоящее время в качестве возможных биологических маркеров прогноза и лекарственной чувствительности злокачественных опухолей. Использование природных и синтетических ингибиторов ММП считается перспективным подходом к противоопухолевой терапии. В экспериментальных исследованиях продемонстрировано участие ММП в регуляции инвазивной, миграционной и даже пролиферативной активности РМЖ. Возможность подавления распространения опухоли с помощью синтетических ингибиторов ММП также является предметом исследований [6; 11–14].

Данные о роли ММП в прогнозе и клиническом течении РМЖ не очень многочисленны и единого мнения по этому вопросу пока нет [5; 8; 13; 15].

Цель данного исследования – провести сравнительную оценку содержания ММП–2; 7 и 9 в опухолях и гистологически неизменной ткани больных РМЖ, а также в сыворотке крови этих больных до и после операции и проанализировать взаимосвязь изученных показателей с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания.

### Материалы и методы

В исследование включили 45 больных раком молочной железы I–III стадий в возрасте от 26 до 73 лет (медиана – 54 года). Контрольную группу составили 8 практически здоровых женщин. Стадии заболевания: I – 10, ПА и ПВ – по 12, ПА – 6, и у 5 пациенток был распространенный процесс ПВ–С стадии. По гистологическому строению 36 опухолей представляли собой протоковый инфильтративный рак, 5 – дольковый инфильтративный рак, другие типы РМЖ представлены единичными наблюдениями. Умеренная степень дифференцировки РМЖ выявлена у большинства пациенток (33), низкая – у 7, высокая – у 5. Во всех опухолях иммуногистохимически исследована экспрессия рецепторов: эстрогенов, прогестерона и HER2/neu.

Содержание ММП–2; 7; 9 определяли в экстрактах опухолей и участках гистологически неизменной ткани молочной железы, а также в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала лечения и через 5–15 дней после операции. Для проведения иммуноферментного анализа образцы тканей лизировали в соотношении 1 : 3 в буфере следующего состава:

20 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 1 %-ный Тритон X-100, 2,5 мМ пиродифосфат натрия, 1 мМ β-глицерофосфат, 1 мМ ортованадат натрия, 1 мкг/мл леупептина. Полученные лизаты центрифугировали в течение 30 мин при 20 000 об/мин, +4 °С (центрифуга Optima™ TLX, «Beckman», USA). Определение проводили с помощью стандартных наборов для прямого иммуноферментного анализа: «Human/Mouse/Rat MMP-2 (total)», «Human MMP-7 (total)», «Human MMP-9 (total)» (все – Quantikine®, «R&D Systems», USA) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом универсальном ридере для микропланшет EL<sub>x</sub>800 («Bio-Tek Instruments, Inc.», USA). Концентрацию исследованных показателей в тканях выражали в нанограммах (нг) на 1 мг общего белка, определенного по методу Лоури.

Данные обрабатывали с помощью программы «Statistica 7.0». При сравнении и анализе взаимосвязей различных показателей использовали непараметрические методы: критерии Манна-Уитни и Kruskal-Wallis, тест корреляции рангов Спирмена (R). Различия и корреляции считали достоверными при p<0,05.

### Результаты

Во всех исследованных образцах опухолей и гистологически неизменной ткани молочной железы обнаружены измеримые количества ММП–2 и ММП–7, а ММП–9 выявлена в 30 из 40 (75%) опухолей и в 63% образцов неизменной молочной железы. Содержание ММП–2 и 7 достоверно повышено в опухолях по сравнению с гистологически неизменной тканью молочной железы у 91 и 76% больных соответственно (табл. 1). У 61% больных

отмечено также увеличение содержания ММП–9 в опухоли по сравнению с неизменной тканью, однако в целом по группе различия не достигали статистической значимости (табл. 1).

При этом уровни ММП–9 в опухоли и неизменной молочной железе достоверно положительно коррелировали между собой (R=0,36; p<0,05), а для ММП–2 и ММП–7 такой взаимосвязи не обнаружено. Кроме того, отмечена положительная взаимосвязь между уровнями ММП–2 и ММП–7, а также ММП–7 и ММП–9 в опухоли (R=0,49 и R=0,48 соответственно; p<0,05).

Таким образом, в опухолях обследованных больных РМЖ значимо увеличена экспрессия ММП–2 и ММП–7, что соответствует данным ряда авторов, продемонстрировавших важную роль этих белков в патогенезе РМЖ [7; 12; 15]. Достоверного увеличения экспрессии ММП–9 нами не обнаружено, однако в литературе представлены данные об активации этой протеиназы в опухолях молочной железы, полученные другими методами [5; 15].

При исследовании сыворотки крови не выявлено достоверного повышения концентрации ММП–2 и ММП–7 у больных РМЖ по сравнению с контрольной группой, а уровень ММП–9 в сыворотке крови больных оказался достоверно ниже, чем в контроле (табл. 2).

Ни для одного из исследованных показателей не выявлено достоверных корреляционных взаимосвязей тканевых и сывороточных концентраций, что может свидетельствовать о неопухоловом происхождении ММП, циркулирующих в периферической крови больных РМЖ.

В пользу этого предположения свидетельствует и тот факт, что после удаления первичной опухоли уровни ММП–2 и ММП–7 снизились только у половины больных, и это изменение не было статистически значимым и составляло всего 0,2–51% для ММП–2 и 2,5–39% для ММП–7 (табл. 2). Уровень ММП–9, сниженный до операции, напротив, повысился на 0,8–75% (p<0,0001) у 85% больных, но оставался ниже контрольного (табл. 2).

Для того, чтобы оценить клиническое значение определения исследуемых маркеров в опухолях и периферической крови больных РМЖ, проанализировали взаимосвязь этих показателей с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания: стадией, размером, гистологическим строением, степенью дифференцировки и рецепторным статусом первичной опухоли (табл. 3), наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах.

Обнаружено достоверное увеличение содержания ММП–9 в опухоли со снижением степени дифференцировки, что косвенно свидетельствует о неблагоприятной прогностической роли высокого уровня этой протеиназы в РМЖ.

Повышение уровня ММП–9, а также ММП–7 отмечено и в опухолях с прогностически неблагоприятным рецепторным статусом – PЭ<sup>-</sup> (p<0,05) и/или HER2/neu<sup>+</sup>.

Уровень ММП–2 практически не зависел от статуса PЭ и HER2/neu, но был более высок в PП<sup>+</sup> опухолях (p<0,05), чем в PП<sup>-</sup> отрицательных.

Основные закономерности, выявленные для показателей сыворотки крови, – это достоверное увеличение уровня ММП–2 (p<0,05) и снижение уровня ММП–9 при III стадии РМЖ по сравнению с I–II (p<0,05). Уровень ММП–9 в сыворотке крови также достоверно снижался при низкодифференцированном РМЖ и размере первичной опухоли более 4,0 см (в обоих случаях p<0,05).

Таблица 1

Содержание (нг/мг белка) ММП-2, ММП-7 и ММП-9 в опухолях и гистологически неизменной ткани МЖ

Показатель	n больных	Опухоль (Т)		Слизистая (N)		T>N %
		Медиана	Диапазон	Медиана	Диапазон	
ММП-2	45	40,1 <sup>1</sup>	3,6 – 111	10,5	2,3 – 67,3	91
ММП-7	25	0,7 <sup>2</sup>	0,04 – 15,0	0,2	0,03 – 2,2	76
ММП-9	40	8,2	0 – 294	2,7	0 – 225	61

<sup>1</sup>p<0,0001 по сравнению с неизменной тканью (парный критерий Вилкоксона);<sup>2</sup>p<0,01 по сравнению с неизменной тканью (парный критерий Вилкоксона).

Таблица 2

Содержание (нг/мл) ММП-2, ММП-7 и ММП-9 в сыворотке крови здоровых доноров и больных РМЖ до начала лечения и через 5-15 дней после операции

Показатель	Контрольная группа (8 человек)	Больные РМЖ			
		n больных	до операции (1)	после операции (2)	снижение (2<1)
ММП-2	256 161 – 303	45	228 151-389	245 153-361	52%
ММП-7	3,9 2,8 – 4,5	25	4,05 1,9-9,4	4,132,8-11,0	52%
ММП-9	398 279 – 496	40	229 <sup>1</sup> 87-446	284 <sup>2</sup> 136-847	15%

<sup>1</sup>p<0,05 по отношению к показателю контрольной группы (тест Манна-Уитни);<sup>2</sup>p<0,0001 по отношению к показателю до операции (парный критерий Вилкоксона).

Таблица 3

Содержание ММП-2, ММП-7 и ММП-9 в опухолях (нг/мг белка) и сыворотке крови (нг/мл) при РМЖ в зависимости от некоторых клинико-морфологических характеристик заболевания\*

Показатель	ММП-2		ММП-7		ММП-9	
	Опухоль	Сыворотка	Опухоль	Сыворотка	Опухоль	Сыворотка
<u>Стадия:</u> I	45,2 21,3-61,4	229 185-294	1,6 0,3-1,8	3,8 3,5-4,5	0 0-8,1	217 167-314
II	35,0 22,1-52,8	235 193-229	0,6 0,2-1,4	4,7 3,5-4,0	8,6 2,2-18,6	254 221-314
III	40,1 27,9-64,0	280 242-316	0,8 0,6-1,3	4,6 4,1-5,1	13,6 0-25,1	210 140-265
<u>Размер опухоли:</u> до 2,0 см	31,7 21,3-46,9	265 201-315	1,1 0,6-4,1	3,8 3,5-5,2	0 0-52,6	304 182-446
2-3,9 см	42,4 22,4-64,0	242 222-265	0,6 0,3-1,0	4,6 3,7-4,1	8,8 1,8-18,6	225 167-253
4,0 см и более	47,2 36,5-69,2	227 193-265	1,8 1,4-2,2	3,9 3,5-5,2	11,1 0-14,1	182 145-223
<u>Степень дифференцировки:</u> 1 Высокая	37,8 19,6-65,1	221 207-235	1,0 0,1-1,8	3,8 3,5-4,0	0,9 0-5,2	223 167-279
2 Умеренная	41,9 26,3-56,4	248 193-315	0,7 0,4-1,6	4,6 3,7-5,2	8,8 0,6-19,6	250 187-314
3 Низкая	36,9 24,9-66,2	241 201-280	1,0 0,6-1,4	3,9 3,5-4,3	13,9 5,2-114	167 126-241
<u>Рецепторный статус:</u> РЭ <sup>+</sup>	36,9 22,4-36,9	252 193-294	1,8 1,3-4,1	3,8 3,5-5,2	24,0 18,6-80	213 176-304
РЭ <sup>-</sup>	42,4 26,4-61,4	243 223-309	0,6 0,3-1,4	4,6 3,7-4,1	3,9 0-11,5	236 145-275
РП <sup>+</sup>	31,7 22,4-45,6	242 193-315	1,1 0,6-1,8	4,3 3,5-5,2	18,4 0,3-28,6	219 167-314
РП <sup>-</sup>	46,2 32,8-68,1	248 222-265	0,7 0,3-1,4	4,7 3,9-4,5	4,7 0-11,9	238 165-262
HER2/neu <sup>+</sup>	41,3 26,3-56,4	246 201-308	0,7 0,4-1,6	4,6 3,9-4,2	7,6 0-19,6	232 182-253
HER2/neu <sup>-</sup>	40,1 22,4-64,0	241 196-294	2,6 1,0-4,1	4,1 3,6-5,1	12,8 5,8-16,4	217 167-304

\*в таблице представлены медианы и квартили значений; статистически достоверные различия указаны в тексте статьи.

Подводя итог проведенным исследованиям, отметим:

- у большинства пациенток, страдающих РМЖ, отмечено значительное увеличение продукции ММП–2 и ММП–7 в опухоли по сравнению с окружающей гистологически неизменной тканью молочной железы.
- уровень этих протеиназ в сыворотке крови больных практически не отличается от показателей контрольной группы и достоверно не меняется после удаления опухоли.
- в опухолях значительной части больных повышена также экспрессия ММП–9, однако ее увеличение менее выражено, чем для вышеназванных показателей и не достигает уровня статистической значимости.

Достаточно парадоксальным и требующим дальнейшего изучения является тот факт, что концентрация ММП–9 в сыворотке крови больных достоверно снижена по сравнению с нормой, это снижение в наибольшей степени проявляется в некоторых прогностически неблагоприятных подгруппах, а после операции происходит нормализация уровня ММП–9, т.е. его повышение.

Следует отметить, что аналогичное снижение уровня ММП–9 мы наблюдали при раке желудка [3], а при раке яичников [2] и раке толстой кишки [1] уровень этого маркера в периферической крови, напротив, был повышен.

Таким образом, по данным нашего исследования, все три изученных ММП можно рассматривать в качестве возможных биомаркеров РМЖ и мишеней для молекулярно-направленной терапии, но они не являются перспективными серологическими маркерами данного заболевания.

## Литература

1. Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Щербakov А.М. и соавт. Матриксные металлопротеиназы 7 и 9 и их тканевые ингибиторы 1 и 4 типа в опухолях и плазме крови больных раком толстой кишки // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2007. – Т. 143. – №4. – С. 438–41.
2. Герштейн Е.С., Левкина Н.В., Дугаева М.А. и соавт. Матриксные металлопротеиназы 2, 7, 9 и тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ 1 типа в опухолях и сыворотке крови больных новообразованиями яичников // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2010. – Т. 149. – №5. – С. 562–5.
3. Герштейн Е.С., Лу Сунь, Рябов А.Б. и соавт. Сравнительное иммуноферментное исследование матриксных металлопротеиназ-2, -7, -9 и их тканевого ингибитора 2 типа в опухолях и плазме крови больных раком желудка // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2009. – Т. 148. – №12. – С. 660–3.
4. Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities // J. Cell Sci. – 2002. – Vol. 115 (Pt 19). – P. 3719–27.
5. Bartsch J.E., Staren E.D., Appert H.E. Matrix metalloproteinase expression in breast cancer // J. Surg. Res. – 2003. – Vol. 110 (2). – P. 383–92.
6. Bendrik C., Robertson J., Gauldie J., Dabrosin C. Gene transfer of matrix metalloproteinase-9 induces tumor regression of breast cancer *in vivo* // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68 (9). – P. 3405–12.
7. Dean R.A., Butler G.S., Hamma-Kourbali Y. et al. Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-based proteomic screens: disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF)/heparin affinity regulatory peptide (pleiotrophin) and VEGF/Connective tissue growth factor angiogenic inhibitory complexes by MMP-2 proteolysis // Mol. Cell Biol. – 2007. – Vol. 27 (24). – P. 8454–65.
8. Decock J., Long J.R., Laxton R.C. et al. Association of matrix metalloproteinase-8 gene variation with breast cancer prognosis // Cancer Res. – 2007. – Vol. 67 (21). – P. 10214–21.
9. Deryugina E.I., Quigley J.P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis // Cancer Metastasis Rev. – 2006. – Vol. 25 (1). – P. 9–34.
10. Deryugina E.I., Quigley J.P. Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions // Biochim. Biophys. Acta. – 2010. – Vol. 1803 (1). – P. 103–20.
11. Glasspool R.M., Twelves C.J. Matrix metalloproteinase inhibitors: past lessons and future prospects in breast cancer // Breast. – 2001. – Vol. 10 (5). – P. 368–78.
12. Kargozaran H., Yuan S.Y., Breslin J.W. et al. A role for endothelial-derived matrix metalloproteinase-2 in breast cancer cell transmigration across the endothelial-basement membrane barrier // Clin. Exp. Metastasis. – 2007. – Vol. 24 (7). – P. 495–502.
13. Liu S.C., Yang S.F., Yeh K.T. et al. Relationships between the level of matrix metalloproteinase-2 and tumor size of breast cancer // Clin. Chim. Acta. – 2006. – Vol. 371 (1-2). – P. 92–6.
14. Lungu G., Covalada L., Mendes O. et al. FGF-1-induced matrix metalloproteinase-9 expression in breast cancer cells is mediated by increased activities of NF-kappaB and activating protein-1 // Mol. Carcinogenesis. – 2008. – Vol. 47 (6). – P. 424–35.
15. McGowan P.M., Duffy M.J. Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database // Ann. Oncol. – 2008. – Vol. 19 (9). – P. 1566–72.