
МАТРИКСИНЫ 2, 7 И 9 ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ВЫЯСНЕНИЕ ВОЗМОЖНОЙ СВЯЗИ С КОНЦЕНТРАЦИЕЙ БЕЛКА HER-2/neu

**О.М. Кузнецова, Т.Т. Березов, Н.Н. Чернов,
А.Ю. Назаренко, Ю.В. Крюк**

Кафедра биохимии
Медицинский факультет
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

И.В. Терешкина, Н.Е. Кушлинский

Лаборатория клинической биохимии
Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН
Каширское шоссе, 24, Москва, Россия, 115478

Проведен сравнительный анализ содержания матриксных металлопротеиназ (ММП) 2,7 и 9 в опухолевых тканях молочной железы и гистологически неизменной ткани, определено содержание рецепторов половых гормонов, белка HER-2/neu. Достоверно высокие значения ММП-2 и -7 обнаружены в ткани опухоли по сравнению с гистологически неизменной тканью. Повышение концентраций ММП 2 в опухоли связано с рецепторным статусом опухоли ($p < 0,05$). Наиболее высокие значения концентраций ММП-7 и ММП-9 обнаружены при РЭ-, РП- и HER-2/neu+ опухолях, а также в новообразованиях размером более 4,0 см.

Ключевые слова: металлопротеиназы, иммуноферментный анализ, рак молочной железы, белок HER-2/neu, рецепторы половых гормонов.

Основной проблемой в терапии злокачественных новообразований по-прежнему остается борьба с метастазированием, главной морфологической особенностью раковых клеток. Именно поэтому изучение и детализация тонких молекулярных механизмов, контролирующих этот процесс, являются важной предпосылкой для успешной борьбы за увеличение продолжительности жизни и улучшение ее качества для онкологических больных. Одну из главных ролей в процессах инвазии и метастазирования, несомненно, играют матриксинны.

Матриксинны, или матриксные металлопротеиназы, принадлежат к семейству Zn-зависимых протеаз, специфически катализирующих гидролиз почти всех основных белков внеклеточного матрикса. Для многих ММП показано увеличение экспрессии в опухолях различного генеза, именно поэтому в настоящее время матриксинны рассматриваются в качестве перспективных биологических маркеров прогноза и лекарственной чувствительности злокачественных опухолей [1].

В нашем исследовании мы провели определение содержания ММП-2, -7 и -9 в тканях опухолей молочной железы и гистологически неизменной ткани, а также анализ взаимосвязи полученных результатов с основными клинико-морфологическими параметрами заболевания, содержанием белка HER2/neu и рецепторами половых гормонов [2—4].

Материалы и методы. В исследование включены 45 женщин, больных раком молочной железы (РМЖ) в различных стадиях опухолевого процесса. Средний возраст обследованных больных раком молочной железы составил $53,7 \pm 1,6$ лет. У 22,2% пациенток выявлена I стадия заболевания, у 53,3% — II стадия и у 24,4% — III стадия. У всех 45 больных отдаленные метастазы в момент начала лечения отсутствовали. У большинства обследованных больных установлен инфильтративно-протоковый вариант гистологического строения рака молочной железы (80%), другие типы представлены единичными наблюдениями.

Для количественного определения ММП были использованы стандартные наборы для прямого иммуноферментного анализа Quantikine[®], R&D Systems, США. Концентрацию исследованных показателей в тканях определяли в нанограммах (нг) на 1 мг общего белка. Белок определяли по методу Лоури. В качестве контроля определяли содержание исследуемых белков в экстрактах из участков гистологически неизменной ткани молочной железы, удаленных от края опухоли на расстояние 3,0 см.

Определение рецепторов стероидных гормонов выполнено на парафиновых срезах ткани опухолей с помощью биотинстрептавидинового иммунопероксидазного метода с моноклональными антителами к РЭ (рецепторы эстрогенов) и РП (рецепторы прогестерона) фирмы «Дакко» (Дания). Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью пакетов статистических программ SPSS 9,0 и «Statistica 6,0» (StatSoft Inc).

Результаты и обсуждение. Результаты полученных данных по содержанию металлопротеиназ MMP-2, MMP-7 и MMP-9 приведены в табл. 1.

Таблица 1

Содержанию металлопротеиназ MMP-2, MMP-7 и MMP-9 в опухолях больных раком молочной железы

Маркер	Образцы тканей	Медиана (квартили)	Диапазон
MMP-2	Неизменная опухоль	10,5 (7,2—17,0) ¹	5,5—39,3
		40,0 (26,2—56,4) ²	4,2—110
MMP-7	Неизменная опухоль	0,2 (0,1—0,3) ³	0,1—1,8
		0,7 (0,4—1,6) ⁴	0,05—14,7
MMP-9	Неизменная опухоль	2,7 (0—15,5) ⁵	0—245,0
		8,2 (0,3—19,1) ⁶	0—283

Примечание: 1vs2 $p = 0,00001$; 3vs4 $p = 0,003$; 5vs6 $p = 0,19$.

Обнаружено достоверное повышение концентраций ММП-2 и ММП-7 в опухолях по сравнению с гистологически неизменной тканью молочной железы у 91,1% и 78,6% соответственно. Эти результаты согласуются с данными многих авторов [2—5]. Повышенное содержание ММП-9 отмечено у 59% пациентов, однако это повышение не было статистически значимым. Однако нужно отметить, что, по литературным данным, имеются исследования, показывающие достоверную активацию ММП-9 в опухолях молочной железы [6—8]. Корреляционных зависимостей в содержании металлопротеиназ 2-го, 7-го и 9-го типов в неизменной ткани и первичной опухоли больных раком молочной железы нами не выявлено.

Для оценки клинического значения определяемых маркеров проанализировали возможную связь полученных результатов с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания. Содержание ММР-2 в первичной опухоли повышалось пропорционально возрасту больных РМЖ, а также при выявлении признаков, характеризующих клинически неблагоприятное ее течение. В то же время содержание ММР-7 и ММР-9 не было связано с возрастом больных.

При анализе содержания металлопротеиназ 2-го, 7-го и 9-го типов в опухоли больных раком молочной железы с учетом репродуктивной функции пациенток также не установлено достоверных различий. Однако наибольшие уровни ММП-2 выявлены в ткани опухолей больных РМЖ в постменопаузе.

Не установлено достоверной связи между содержанием металлопротеиназ 2-го, 7-го и 9-го типов в опухоли больных РМЖ и стадией заболевания. Однако наиболее высокая медиана содержания ММР-2 в опухоли больных раком молочной железы выявлена при I стадии болезни. Наибольшие медианы содержания металлопротеиназ 2-го, 7-го и 9-го типов в первичной опухоли больных РМЖ выявлены при наличии множественных метастазов в регионарных лимфатических узлах. Однако различия также были статистически недостоверными. Не установлено достоверной связи между содержанием металлопротеиназ 2-го и 7-го типов и степенью злокачественности опухоли. В то же время содержание ММР-9 в опухоли больных РМЖ достоверно увеличивалось при повышении степени ее злокачественности, что свидетельствует о неблагоприятном прогностическом значении высоких концентраций ММП-9 (табл. 2).

Таблица 2

Содержание металлопротеиназ ММР-2, ММР-7 и ММР-9 в опухоли больных раком молочной железы с учетом экспрессии РЭ, РП и HER-2/neu

Рецепторный статус опухоли	ММР-2 (Ед/мг белка)		ММР-7 (Ед/мг белка)		ММР-9 (Ед/мг белка)	
	N	медиана (квартили)	N	медиана (квартили)	N	медиана (квартили)
РЭ-	11	36,9 (22,4—36,9)	5	1,8* (1,3—4,1)	10	24,0* (18,6—80)
РЭ+	33	42,4 (26,4—61,4)	19	0,6** (0,3—1,4)	29	3,9** (0—11,5)
РП-	18	31,7* (22,4—45,6)	10	1,1 (0,6—1,8)	16	18,4 (0,3—28,6)
РП+	26	46,2** (32,8—68,1)	14	0,7 (0,3—1,4)	23	4,7 (0—11,9)
HER-2/neu-	39	41,3 (26,3—56,4)	22	0,7 (0,4—1,6)	35	7,6 (0—19,6)
HER-2/neu+	5	40,1 (22,4—64,0)	2	2,6 (1—4,1)	4	12,8 (5,8—16,4)

Примечание: ММР-7 РЭ-vsРЭ+ $p = 0,006$; ММР-9 РЭ-vsРЭ+ $p = 0,01$; ММР-2 РП-vsРП+ $p = 0,027$.

Корреляционной зависимости между содержанием металлопротеиназ 2-го, 7-го и 9-го типов с наибольшим размером опухоли у больных РМЖ не установлено. В то же время дисперсионный анализ показал достоверное увеличение со-

держания MMP-2 в первичной опухоли больных раком молочной железы с максимальным размером новообразования. Медианы содержания MMP-7 и MMP-9 в опухоли также были наибольшими у больных с размером новообразования более 4,0 см, однако различия недостоверны. Не выявлено связи между содержанием металлопротеиназ 2-го, 7-го и 9-го типов в опухоли больных раком молочной железы и локализацией процесса.

Установлено повышенное содержание MMP-2 при наличии в опухоли больных РМЖ рецепторов половых стероидных гормонов (РЭ и РП). Напротив, более высокие показатели MMP-7 и MMP-9 обнаружены в опухолях молочной железы, не содержащих РЭ и РП, а также при выявлении экспрессии HER-2/neu (см. табл. 2). Полученные данные указывают на существование определенной связи между содержанием металлопротеиназ 2-го, 7-го и 9-го типов и рецепторным статусом опухоли у больных раком молочной железы. Так, содержание MMP-7 и MMP-9 достоверно выше при прогностически неблагоприятном рецепторном статусе.

Выводы. В перспективе все три представленные в данной работе металлопротеиназы после дополнительных исследований можно рассматривать в качестве потенциальных биомаркеров при РМЖ, хотя остаются вопросы, требующие дальнейшего изучения, в частности, определенный интерес представляют концентрации MMP-9 в опухоли, вполне сопоставимые с содержанием этой протеиназы в неизменной ткани, что требует более тщательного анализа.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Overall C.M., Dean R.A. Degradomics: systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer // *Cancer Metastasis Rev.* — 2006. — 25(1). — P. 69—75.
- [2] Delassus G.S., Cho H., Hoang S. et al. Many new down- and up-regulatory signaling pathways, from known cancer progression suppressors to matrix metalloproteinases, differ widely in cells of various cancers // *Cell Physiol.* — 2010. — 224(2). — P. 549—558.
- [3] Ioannidis I., Dimo B., Karameris A. et al. Comparative study of the immunohistochemical expression of metalloproteinases 2, 7 and 9 between clearly invasive carcinomas and “in situ” trophoblast invasion // *Neoplasma.* — 2010. — 57(1). — P. 20—28.
- [4] Beeghly-Fadiel A., Shu X.O., Long J. et al. Genetic polymorphisms in the MMP-7 gene and breast cancer survival // *Cancer.* — 2009. — 124(1). — P. 208—214.
- [5] van Beijnum J.R., Petersen K., Griffioen A.W. Tumor endothelium is characterized by a matrix remodeling signature // *Front Biosci.* — 2009. — 1. — P. 216—225.
- [6] Ling X., Marini F., Konopleva M. et al. Mesenchymal Stem Cells Overexpressing IFN- β Inhibit Breast Cancer Growth and Metastases through Stat3 Signaling in a Syngeneic Tumor Model // *Cancer Microenviron.* — 2010. — 3(1). — P. 83—95.
- [7] Deryugina E.I., Quigley J.P. Pleiotropic Roles of Matrix Metalloproteinases in Tumor Angiogenesis: Contrasting, Overlapping and Compensatory Functions // *Biochim Biophys Acta.* — 2010. — 1803(1). — P. 103—120.
- [8] Sateesh K., Sajani S., Pushpa J. et al. MMP-9 Inhibition Downregulates Radiation-induced NF- κ Activity Leading to Apoptosis in Breast Tumors // *Clin Cancer Res.* — 2008. — 14(11). — P. 3617—3626.

**MATRICESINS 2, 7 AND 9 IN BREAST TUMORS.
DETERMINATION OF POSSIBLE CONNECTION
WITH THE CONCENTRATION OF HER-2/neu**

**O.M. Kuznetsova, T.T. Berezov, N.N. Chernov,
A.Y. Nazarenko, Yu.V. Kryuk**

Department of Biochemistry
Medical faculty
People's Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

I.V. Tereshkina, N.E. Kushlinskii

Laboratory of clinical biochemistry
Russian N.N. Blokhin Cancer Research Center
Kashirskoye highway, 24, Moscow, Russia, 115478

The comparative analysis of the quantity of matrix metalloproteinases (MMP) 2,7 and 9 in breast cancer is carried out; the concentration of sex hormones receptors and protein HER-2/neu are determined. Authentically high values MMP-2 and MMP-7 are found in a tumor tissue in contrast to the normal one. The elevated concentration of MMP-2 in a tumor is connected with receptor status ($p < 0,05$). The highest values of concentration MMP-7 and MMP- 9 are found at RE-, RP- and HER-2/neu + tumors, and also in the tumors with the size more than 4,0 cm.

Key words: metalloproteinase, immunoenzyme method, breast cancer, HER-2/neu, receptors of sex hormones.