

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ПРОТЕОЛИЗА В МОЧЕ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Шевченко А.Н.¹, Пакус Д.И.¹, Комарова Е.Ф.¹, Демидова А.А.², Никипелова Е.А.¹, Максимов А.Ю.¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: katitako@gmail.com;

²ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону

В моче 73 больных поверхностным раком мочевого пузыря (РМП) в стадиях TaN0M0 и T1N0M0 методом ИФА оценивали уровень матриксной металлопротеиназы-2,9 и их ингибиторов – TIMP-1 и TIMP-2. Показано, что развитие поверхностного РМП характеризуется активацией системы протеолиза внеклеточного матрикса, о чем свидетельствует повышенная экскреция MMP-2 и MMP-9, а также TIMP-1 и TIMP-2 с мочой. Увеличение содержания MMP-9 в моче коррелирует со стадией первичного РМП (Ta-T1), степенью дифференцировки опухоли, прогнозом прогрессирования заболевания. Повышение содержания MMP-2, TIMP-1 и TIMP-2 в моче в зависимости от клинических и гистологических параметров заболевания умеренны. Актуально изучение диагностической значимости функционирования системы MMP-TIMP мочи для определения неопластического потенциала заболевания.

Ключевые слова: MMP-2,9 TIMP-1, TIMP-2, ПРМП, моча.

SOME INDICATORS OF EXTRACELLULAR PROTEOLYSIS IN THE URINE OF BLADDER CANCER PATIENTS

Shevchenko A.N.¹, Pakus D.I.¹, Komarova E.F.¹, Demidova A.A.², Nikipelova E.A.¹, Maksimov A.Yu.¹

¹Federal State Budget-Funded Institution "Rostov Cancer Research Institute" at the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, e-mail: katitako@gmail.com;

²State Budget-Funded Educational Institution of Higher Professional Education "Rostov State Medical University" at the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don

The level of matrix metalloproteinase-2,9 and their inhibitors - TIMP-1 and TIMP-2 in the urine of 73 superficial bladder cancer (BC) patients at TaN0M0 and T1N0M0 stages was determined using ELISA method. It was shown that BC development is characterized by activation of the extracellular matrix proteolysis system, as evidenced by increased excretion of MMP-2 and MMP-9, and TIMP-1 and TIMP-2 with the urine. MMP-9 increase in the urine correlates with the primary BC stage (Ta-T1), tumor differentiation grade, disease progression prognosis. Increase in MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 content in the urine depending on the clinical and histological parameters of the disease is modest. Study of the diagnostic significance of the urine MMP-TIMP system functioning to determine the neoplastic potential of the disease.

Keywords: MMP-2,9, TIMP-1, TIMP-2, superficial BC, urine.

Поверхностный неинвазивный рак мочевого пузыря (ПРМП) составляет 80% всех впервые выявленных случаев РМП, редко метастазирует, но связан с высоким риском местного рецидива [1]. Признанным стандартным методом постановки диагноза рецидива ПРМП является биопсия слизистой мочевого пузыря, однако актуален поиск малоинвазивных и дистанционных методик диагностики рака. Биомаркеры мочи представляют собой потенциальную область интереса для раннего обнаружения и динамического наблюдения рака мочевого пузыря из-за высокой доступности образцов, и несколько опухолевых маркеров были исследованы в этом качестве [10; 11].

Оценка экспрессии матриксных металлопротеиназ (ММП) и их ингибиторов в тканях методами иммуногистохимии, в биологических жидкостях с помощью методов ИФА, а также на генетическом уровне считается перспективным методом определения агрессивности опухолей и направленности злокачественного процесса различных локализаций [3-5]. Современные данные о диагностической значимости уровня ММП в моче, полученные разными исследователями, оказываются противоречивыми. Так, Данильченко Д.И. с соавторами [2] в своей работе при определении значений ММП-2 и ММП-9 в моче у пациентов с инвазивным и поверхностным РМП обнаружили, что содержание ММП-2 и ММП-9 возрастало при инвазивном РМП в сравнении с поверхностным РМП, при низкодифференцированном РМП (G3) в отличие от высоко- и умеренно-дифференцированных (G1, G2) РМП. S. Ricci и соавторы [9], изучив экспрессию в моче больных РМП MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, показали, что в большей степени изменялась экспрессия TIMP-1. Выявлено значительное повышение показателя в моче пациентов с высокодифференцированными опухолями, а также статистически значимые отличия распределения экспрессии TIMP-1 между стадиями Tа и T1. Однако в некоторых исследованиях не было выявлено корреляций между уровнем металлопротеиназ и клинико-патологическими параметрами пациентов РМП, такими как возраст, пол, размер опухоли и ее гистотип, степень инвазии, регионарного метастазирования и т.д. [7]. Значительные корреляции были обнаружены только между соотношением активности MMP-9/TIMP-1 и размером опухоли.

В связи с этим целью данного исследования было изучить уровень матриксных металлопротеиназ-2 и-9, а также их ингибиторов TIMP-1 и TIMP-2 в моче больных поверхностным раком мочевого пузыря.

Материалы и методы

В исследование были включены 73 больных поверхностным раком мочевого пузыря (ПРМП) в стадиях TаN0M0 и T1N0M0. Средний возраст составил 62,4±3,4 года. В качестве контроля исследовали мочу 30 практически здоровых доноров соответствующего возраста.

Диагностика рака основывалась на результатах гистологического исследования в соответствии с отраслевыми стандартами и алгоритмами объемов диагностики и лечения злокачественных новообразований в онкологии. Проведение данной работы было одобрено этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ. В каждом конкретном случае было получено добровольное информированное согласие больных на использование материалов для проведения научных исследований.

В моче больных ПРМП методом непрямого иммуноферментного анализа оценивали уровень матриксной металлопротеиназы-2 (ММП-2, R&D) и матриксной

металлопротеиназы-9 (ММП-9, Bender Medsystems), а также ингибиторов матричных металлопротеиназ – TIMP-1 (Bender Medsystems) и TIMP-2 (R&D). Содержание исследуемых показателей в моче определяли с учетом экскретируемого креатинина, что позволило достичь устранения различий диуреза.

У пациентов с РМП индивидуальный риск рецидивирования и прогрессирования РМП рассчитывали после выполнения цистоскопии согласно системе EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer), которая учитывает количество опухолей, их размер, частоту предшествующих рецидивов, наличие карциномы *in situ*, степень дифференцировки, стадию заболевания.

Данные обрабатывались при помощи пакета статистических программ STATISTICA 10.0. Доверительную вероятность различий показателей между здоровыми донорами и больными РМП определяли по критерию Манна-Уитни. При этом соблюдались общие рекомендации для медицинских исследований, критический уровень p был 0,05.

Результаты и их обсуждение

Уровни мочевой экскреции ММП-2 у больных РМП и у здоровых доноров представлены в таблице 1. У пациентов со стадией РМП Та-Т1 содержание в моче ММП-2 было повышено на 75,6% по сравнению со здоровыми донорами.

Тканевой ингибитор TIMP-2, ограничивающий активность желатиназы ММП-2, у больных РМП в моче по сравнению со здоровыми донорами был также повышен в 1,3 раза. Однако обращает внимание факт несоразмерности повышения активности ММП-2 и его ингибитора. При повышении мочевой экскреции у больных ММП-2 на 75,6% TIMP-2 увеличивался только на 34,4% (рис. 1).

Таблица 1

Содержание в моче ММП и их ингибиторов в исследуемых группах

Группа	Количество человек в группе	Содержание в моче, пг/мкмоль креатинина,			
		ММП-2	TIMP-2	ММП-9	TIMP-1
Здоровые доноры	30	4,1±0,27	28,2±1,7	0,34±0,02	243,1±21,7
ПРМП	73	7,2±0,15	37,9±2,0	0,82±0,09	356,4±33,4
p		0,003	0,04	0,0001	0,002

Примечание: доверительная вероятность различия показателя между здоровыми донорами и больными РМП определена по критерию Манна-Уитни.

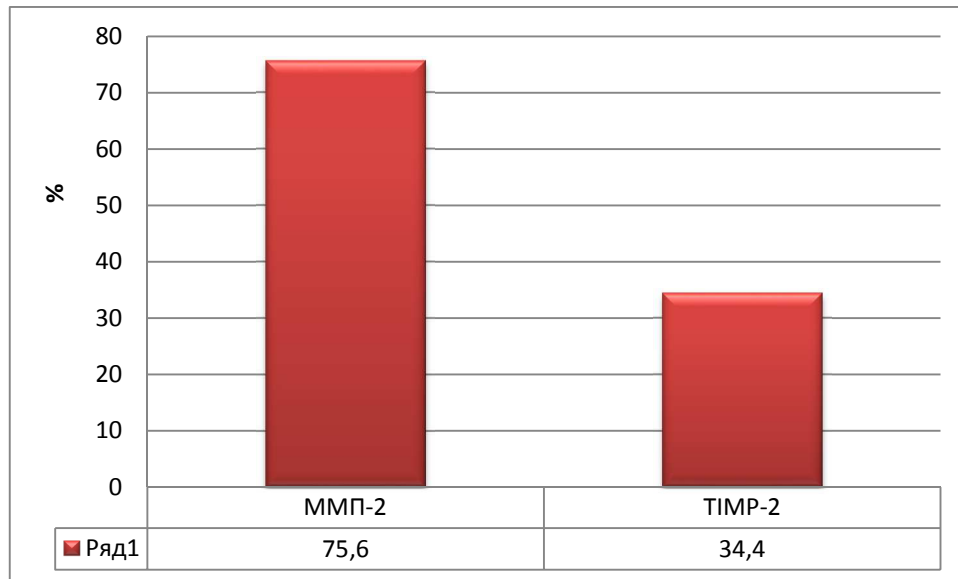


Рис. 1. Процентное повышение уровня ММП-2 и ТИМР-2 в моче у больных поверхностным РМП по сравнению со здоровыми донорами

Соотношение прироста ММП-2 и ТИМР 2 у больных РМП по сравнению со здоровыми донорами (Δ ММП-2/ Δ ТИМР-2) составило $2,2 \pm 0,13$. То есть прирост ММП-2 у пациентов клинической группы по отношению к контролю был в 2 раза выше по сравнению с приростом ТИМР-2. Таким образом, протеолитический потенциал ММП-2 был высоким, но не компенсировался активностью ингибитора ТИМР-2.

Содержание в моче ММП-9 у больных поверхностным РМП было статистически значимо выше (в 2,5 раза) по сравнению со здоровыми донорами (табл. 1). Уровень ингибитора активности ТИМР-1 был повышен в 1,5 раза в моче у больных РМП по сравнению со здоровыми донорами. Повышение уровня показателей ММП-9 и ТИМР-1 было неравномерным. Процентное повышение уровня мочевого экскреции ТИМР-1 у больных РМП по сравнению со здоровыми донорами составило 46,6% и было гораздо менее выраженным по сравнению с приростом содержания ММП-9 (рис. 2).

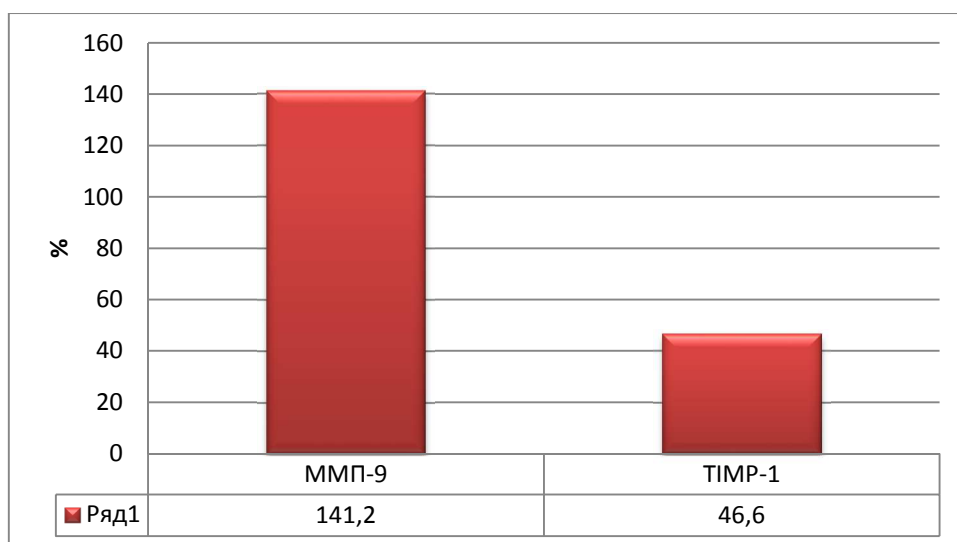


Рис. 2. Процентное повышение уровня ММП-9 и ТИМР-1 в моче у больных поверхностным РМП по сравнению со здоровыми донорами

Соотношение прироста ММП-9 и ТИМР-1 у больных РМП по сравнению со здоровыми донорами (Δ ММП-9/ Δ ТИМР-1) составило $3,03 \pm 0,18$. То есть протеолитическая активность ММП-9, так же как и в случае соотношения содержания ММП-2 и его ингибитора, адекватно не ограничивалась.

Далее представляло интерес оценить экспрессию в моче металлопротеиназ-2,9 и их ингибиторов в зависимости от клинико-гистопатологических характеристик основного заболевания больных РМП.

У больных клинической группы статистически значимого различия величины мочевой экскреции ММП-2 между подгруппами со стадией первичного РМП Т₀ и Т₁, разным количеством и размерами опухолевых узлов установлено не было (табл. 2). Различия показателя были обнаружены только между подгруппами больных с разной степенью дифференцировки и прогнозом РМП. У пациентов со степенью дифференцировки G₂ по сравнению с G₁ содержание ММП-2 в моче было статистически значимо выше на 12%.

Таблица 2

Мочевая экскреция ММП-2 и ТИМР-2 у больных ПРМП в зависимости от характеристик основного заболевания

Параметр	ММП-2, пг/мкмоль креатинина	ТИМР-2, пг/мкмоль креатинина	$\frac{\Delta$ ММП-2 Δ ТИМР-2	p
Стадия первичного РМП				
Т ₀	7,0 \pm 0,19	38,5 \pm 2,1	1,94 \pm 0,04	ММП2 p=0,35 ТИМР2
Т ₁	7,5 \pm 0,41	35,9 \pm 2,5	3,04 \pm 0,06	

				p=0,76
Степень дифференцировки				
G1	6,8±0,34	36,8±1,6	2,16±0,08	ММП2 p=0,04 TIMP2 p=0,83
G2	7,6±0,27	39,4±2,5	2,15±0,09	
Количество узлов				
Монофокальные опухоли	7,1±0,25	35,2±1,4	2,95±0,13	ММП2 p=0,98 TIMP2 p=0,84
Число узлов 2-3	7,4±0,43	38,6±2,0	2,18±0,11	
Размеры узлов				
До 1 см	7,1±0,32	36,8±1,9	2,4±0,16	ММП2 p=0,90 TIMP2 p=0,92
1-3 см	7,3±0,28	38,5±2,3	2,1±0,11	
Прогноз				
Благоприятный	6,9±0,22	37,6±2,0	2,0±0,07	ММП2 p=0,03 TIMP2 p=0,81
Промежуточный	7,7±0,38	34,5±2,3	2,9±0,09	

Достоверно выше был уровень ММП-2 в моче и у пациентов с промежуточным прогнозом прогрессирования РМП по сравнению с благоприятным прогнозом. Содержание в моче TIMP-2 у больных РМП не изменялось ($p>0,05$) в зависимости от стадии первичного РМП, степени дифференцировки опухоли, размеров и количества опухолевых узлов, прогноза прогрессирования основного заболевания.

Содержание ММП-9 в моче больных клинической группы исходно достоверно выше при стадии T1 по сравнению с Ta, степени дифференцировки G2 по сравнению с G1, промежуточном прогнозе прогрессирования РМП по сравнению с благоприятным прогнозом (табл. 3).

Таблица 3

Мочевая экскреция ММП-9 и TIMP-1 у больных ПРМП в зависимости от характеристик основного заболевания

Параметр	ММП-9, пг/мкмоль креатинина	TIMP-1, пг/мкмоль креатинина	Δ ММП-9 Δ TIMP-1	p
Стадия первичного РМП				
Ta	0,79±0,07	349,2±27,1	4,2±0,13	ММП9 p=0,03
T1	0,91±0,06	378,9±25,5	2,6±0,09	

				TIMP1 p=0,43
Степень дифференцировки				
G1	0,76±0,05	370,1±32,1	2,5±0,07	ММП9 p=0,04 TIMP1 p=0,74
G2	0,95±0,04	350,3±31,3	4,4±0,25	
Количество узлов				
Монофокальные опухоли	0,84±0,04	347,2±25,7	3,7±0,19	ММП9 p=0,95
Число узлов 2-3	0,81±0,06	364,8±30,3	3,0±0,18	TIMP1 p=0,88
Размеры узлов				
До 1 см	0,80±0,07	353,7±24,5	3,2±0,17	ММП9 p=0,93 TIMP1 p=0,95
1-3 см	0,85±0,09	361,2±25,7	3,3±0,21	
Прогноз				
Благоприятный	0,78±0,05	345,1±26,3	4,1±0,15	ММП9 p=0,03 TIMP1 p=0,85
Промежуточный	0,90±0,08	380,3±25,2	2,8±0,12	

При этом содержание TIMP-1 в моче не зависело от основных характеристик заболевания - стадии первичного РМП, степени дифференцировки опухоли, размеров и количества опухолевых узлов, прогноза прогрессирования основного заболевания.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что развитие поверхностного РМП характеризуется активацией системы протеолиза внеклеточного матрикса, о чем свидетельствует повышенная экскреция ММП-2 и ММП-9, а также TIMP-1 и TIMP-2 с мочой. Одновременное повышение активности ММП и их ингибиторов является закономерным физиологическим процессом, а протеолитическая активность ферментов по механизму обратной связи ограничивается ингибиторами [6]. В нашем исследовании было выявлено, что повышение активности ингибиторов ММП было недостаточным для сдерживания их протеолитической активности, что очевидно приводило к усиленной деградации внеклеточного матрикса.

Анализ связи клинико-гистопатологических характеристик больных поверхностным РМП и экспрессии изученных показателей протеолиза показал, что основные изменения мочевой экскреции были обнаружены для желатиназы ММП-9. При ПРМП стадия первичного РМП (Ta-T1), степень дифференцировки опухоли, прогноз прогрессирования заболевания коррелировали с повышением содержания ММП-9 в моче. Основной функцией

ММР-9 является разрушение белков внеклеточного матрикса, а именно: расщепляются фибриллин, ламинин, желатин, декорин, эластин, коллагены IV, V, XI и XVI типов. Кроме того, ММР-9 активирует трансформирующий фактор роста β и фактор некроза опухоли α . По данным литературы, повышенная экспрессия желатиназ ММР-9 и ММР-2 часто наблюдается при инвазивных и высокозлокачественных опухолях [8]. Однако нами была выявлена повышенная концентрация ММП-9 в моче уже при стадиях T_a и T₁ у больных РМП. Повышение содержания ММП-2, TIMP-1 и TIMP-2 в моче в зависимости от клинических и гистологических параметров заболевания было умеренным.

Подводя итог, можно заключить, что с прогностической точки зрения нерешенным остается вопрос о том, как паритет между ММП и их ингибиторами сказывается на риске прогрессирования РМП и несет ли исходная оценка активности системы ММП-TIMP в моче диагностическую значимость для определения неопластического потенциала заболевания.

Список литературы

1. Гуменецкая Ю.В., Попов А.М., Мардынский Ю.С., Карякин О.Б., Гулидов И.А. Результаты комбинированного лечения (трансуретральной резекции опухоли с последующей дистанционной лучевой терапией) у больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря // Сибирский онкологический журнал. - 2012. - Т. 50. - № 2. - С. 6–10.
2. Данильченко Д.И. Диагностическая и прогностическая ценность определения матрикс-металлопротеаз в моче у больных раком мочевого пузыря // Нефрология: Северо-западная ассоциация нефрологов и врачей диализа. – 2009. – Т. 13. – № 1. – С. 87–89.
3. Кит О.И., Шевченко А.Н., Комарова Е.Ф., Максимов А.Ю. Влияние сопряжения полиморфизма генов матричных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов с активностью внеклеточного протеолиза компонентов базальной мембраны на раннее рецидивирование у больных поверхностным раком мочевого пузыря // Уральский медицинский журнал. - 2015. - № 7. - С. 73-78.
4. Кондакова И.В., Клишо Е.В., Савенкова О.В. Содержание матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в сыворотке крови и опухолях при их метастазировании и др. // Вестник Национальной академии наук Белоруссии. – 2008. – № 2. – С. 88–92.
5. Непомнящая Е.М., Кит О.И., Нистратова О.В., Новикова И.А., Никипелова Е.А., Бахтин А.В., Ульянова Е.П., Вострикова Ж.И., Селютина О.Н. Циркулирующие опухолевые клетки и некоторые морфо-иммуногистохимические показатели при колоректальном раке //

Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 2. - URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24378>.

6. Рогова Л.Н., Шестернина Н.В., Замечник Т.В., Фастова И.А. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (обзор) // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т. XVIII, № 2. – С. 86-89.

7. Mohammed A. Mohammed, Manar F. Seleim, Mohga S. Abdalla, Hayat M. Sharada Abdel Hady A. Abdel Wahab Urinary high molecular weight matrix metalloproteinases as non-invasive biomarker for detection of bladder cancer // BMC Urology. - 2013. - № 13. - P. 25.

8. Monier F., Surla A., Guillot M., Morel F. Gelatinase isoforms in urine from bladder cancer patients // Clin. Chim. Acta. - 2000. - Vol. 299. - P. 11-23.

9. Ricci S., Bruzzese D., Carlo A. Di Evaluation of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, NGAL and MMP-9/NGAL complex in urine and sera from patients with bladder cancer // Oncol. Lett. - 2015. - Vol. 10. - № 4. – P. 2527–2532.

10. Shariat S.F., Passoni N., Bagrodia A., Rachakonda V., Xylinas E., Robinson B., Kapur P., Sagalowsky A.I., Lotan Y. Prospective evaluation of a preoperative biomarker panel for prediction of upstaging at radical cystectomy // BJU Int. - 2014. - № 113. - P.70–76.

11. VanTilborg A.A., Bangma C.H., Zwarthoff E.C. Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening // Int J Urol. - 2009. - № 16. - P. 23–30.