

ВМІСТ МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ-9 У ПАЦІЄНТОК ІЗ МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ ПУХЛИНАМИ МАТКИ

Канд. мед. наук В. С. Сухін, доц. С. В. Данилюк,
канд. біол. наук В. З. Гертман

ДУ «Інститут медичної радіології ім. С. П. Григор'єва НАМН України»

Матриксна металопротеїназа-9 відіграє значну роль під час прогресування процесу. Підвищення її активності супроводжує прогресування остеосарком, фіброзних новоутворень і сарком м'яких тканин. Усе це дає підставу припустити, що дані про вміст цієї металопротеїнази в пацієнток із мезенхімальними пухлинами матки можуть бути інформативним показником під час оцінювання стану онкологічного процесу.

Проведено дослідження визначення вмісту матриксної металопротеїнази-9 у сироватці крові та пухлинній тканині в пацієнток із мезенхімальними доброякісними та злоякісними пухлинами матки для можливої диференційної діагностики характеру неопластичного процесу. Рекомендувати цей показник для диференційної діагностики пухлин ще зарано, зважаючи на невелику кількість спостережень, але вивчення змін вмісту цього ферменту в разі пухлин матки є перспективним.

Ключові слова: саркома матки, фіброміома, експресія матриксної металопротеїнази-9 у крові та пухлинних тканинах.

СОДЕРЖАНИЕ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-9 У ПАЦИЕНТОК С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ МАТКИ

Канд. мед. наук В. С. Сухин, доц. С. В. Данилюк,
канд. биол. наук В. З. Гертман

Матриксная металлопротеиназа-9 играет значительную роль во время прогрессирования процесса. Повышение ее активности сопровождается прогрессирование остеосарком, фиброзных новообразований и сарком мягких тканей. Все это дает основание предположить, что данные о содержании этой металлопротеиназы у пациенток с мезенхимальными опухолями матки могут быть информативным показателем при оценке состояния онкологического процесса.

Проведено исследование определения содержания матриксной металлопротеиназы-9 в сыворотке крови и опухолевой ткани у пациенток с мезенхимальными доброкачественными и злокачественными опухолями матки для возможной дифференциальной диагностики характера неопластического процесса. Рекомендовать этот показатель для дифференциальной диагностики опухолей еще рано ввиду малого числа наблюдений, но изучение изменений содержания данного фермента при опухолях матки является перспективным.

Ключевые слова: саркома матки, фибромиома, экспрессия матриксной металлопротеиназы-9 в крови и опухолевых тканях.

THE CONTENT OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 IN PATIENTS WITH MESENCHYMAL TUMORS OF THE UTERUS

V. S. Sukhin, S. V. Danilyk,
V. Z. Gertman

Matrix metalloproteinase-9 plays a significant role in the progression of the disease. The increased activity of matrix metalloproteinase-9 accompanies the progression of osteosarcoma, fibrous tumors and soft tissue sarcoma. All of the above suggests that the data on the content of matrix metalloproteinase-9 in patients with mesenchymal tumors of the uterus can be an informative indicator in assessing the state of the cancer process.

The study was conducted to determine the content of matrix metalloproteinase-9 in the serum and tumor tissue in patients with mesenchymal benign and malignant tumors of the uterus for the possible differential diagnosis of the nature of the neoplastic process. Recommending this indicator for differential diagnosis of tumors is still early, given the small number of observations, but the study of changes in the content of this enzyme in uterine tumors is promising.

Keywords: uterine sarcoma, uterine fibroid, expression of matrix metalloproteinase-9 in blood and tumor tissues.

Нині встановлено, що на всіх стадіях онкогенезу беруть участь ферменти пухлинного мікрооточення — матриксні металопротеїнази (ММП). Їх роль особливо велика під час прогресування процесу, коли ці активні компоненти

позаклітинного матриксу (ПКМ) і строми пухлини підтримують ріст ракових клітин і сприяють формуванню метастазів [2, 3].

Тепер у цій галузі проводять численні дослідження змін вмісту різних ММП у пухлинних

тканинах і плазмі (сироватці) крові хворих із різними злоякісними новоутвореннями з метою виявлення найперспективніших для діагностики та моніторингу пухлинного процесу біомаркерів. Серед численного сімейства матриксних металопротеїназ встановлено важливу роль MMP-9 у стимуляції росту деяких типів пухлин, особливо мезенхімальних, багатих на колагени різних типів і інші структурні білки, які є основними субстратами цього ферменту [9].

Було доведено, що цей фермент відіграє важливу роль у фізіологічних процесах у матці, бере участь в активації змін тканин матки протягом усього менструального циклу, в тому числі сприяє інволюції жовтого тіла та відторгненню ендометрія шляхом руйнування ПКМ. Водночас активація MMP-9 регулюється стероїдними гормонами [4]. В ендометрії і клітинах строми виявлено значну кількість MMP-9. У разі ендометріозу в перитонеальній рідині та плазмі крові рівень MMP-9 значно підвищується [8]. Оскільки MMP-9 належить важлива фізіологічна роль в ангиогенезі регенеруючих тканин, то під час росту пухлини цей фермент забезпечує ангиогенез і в пухлинній тканині. Високі рівні цього ферменту виявляють у карциномах яєчників, карциномі нирки й інших пухлинах [5, 6]. Також доведено, що підвищення активності MMP-9 супроводжує прогресування остеосарком [7, 9], фіброзних новоутворень і сарком м'яких тканин [7, 10]. Усе це дає підставу припустити, що дані про вміст MMP-9 у пацієнток із мезенхімальними пухлинами матки можуть бути інформативним показником під час оцінювання стану онкологічного процесу в цієї категорії хворих.

Мета роботи — визначення вмісту MMP-9 у сироватці крові та пухлинній тканині в пацієнток із мезенхімальними доброякісними та злоякісними пухлинами матки для можливої диференційної діагностики характеру неопластичного процесу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліджували 40 пацієнток: 20 — із фіброміомами матки та 20 — із саркомами.

Робота проведена відповідно до положень Гельсінської декларації Всесвітньої медичної

асоціації, згідно з типовими положеннями з питань етики МОЗ України № 66 від 13.02.2006. Усі пацієнтки надали інформовану згоду на участь у дослідженні.

Аналіз клінічного матеріалу засвідчив, що вік 20 пацієнток із саркомою матки I–II стадії коливався в діапазоні від 28 до 71 року, медіана склала 49,5 року, середній вік — $(49,6 \pm 1,4)$ року. Серед 20 осіб лейоміосаркома спостерігалася у 14 хворих, ендометріальна стромальна саркома — у 6 жінок.

Вік 20 пацієнток із фіброміомою матки коливався в діапазоні від 31 до 62 року, медіана склала 51,5 року, середній вік — $(50,7 \pm 1,8)$ року.

Дослідження вмісту MMP-9 було проведено на атестованому апараті для імуноферментного аналізу OrpHis MR фірми DYNEX Technologies, Inc., США. Досліджуваний маркер визначали за допомогою стандартних наборів для прямого імуноферментного аналізу MMP-9 Human ELISA Kit (R&D Systems, США). Процедура підготовки проб відповідає інструкціям виробників. Концентрацію дослідженого показника в сироватці крові виражали в нг/мл.

Під час імуногістохімічного дослідження експресії MMP-9 у пухлинній тканині використовували поліклональні антитіла до MMP-9 (92 kDa Collagenase IV) фірми Thermo scientific (Німеччина) у розведенні 1 : 50. Для візуалізації первинних антитіл застосовували систему детекції UltraVision Quanto Detection Systems HRP Polymer (Thermo scientific). Як хромоген використовували DAB (діамінобензидин). Результати підраховували за допомогою окулярної сітки Автандилова [1] у 10 довільно обраних полях зору за збільшення $\times 400$. Оцінку гістохімічної мітки проводили за двома параметрами: ступінь розповсюдженості й інтенсивність забарвлення, зважаючи на виразність реакції та її локалізацію. Ступінь розповсюдженості мітки враховували за відсотковим вмістом позитивно забарвлених у коричневий колір структур клітин від загальної кількості клітин у полі зору. Для оцінки інтенсивності забарвлення використовували якісну шкалу: 0 — відсутня реакція; 1+ — слабе цитоплазматичне забарвлення до 30,0 % пухлинних клітин; 2+ — помірна реакція, від 30,0 до 60,0 % забарвлених клітин; 3+ — виражена

цитоплазматична реакція у 60,0–100,0 % клітин пухлини. Комплекс морфологічних досліджень проводили на мікроскопі Primo Star (Carl Zeiss, Німеччина) із використанням програм AxioCam (ERc 5s).

Статистична обробка отриманих даних здійснювалася за допомогою пакета програм Statistica 10.0. Для визначення вірогідності отриманих даних використовували точний метод Фішера, t-критерій Стьюдента, метод максимально вірогідної оцінки для малої кількості спостережень, непараметричні критерії Манна-Уїтні та Краскела-Уолліса під час порівняння середніх даних виділених підгруп. Імовірність відмінностей між середніми значеннями показників вважалася достовірною в разі рівня значущості $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Попередній аналіз отриманих даних засвідчує, що в групі пацієнок із доброякісними пухлинами (фіброміоми) у 19 осіб показники ММП-9 у сироватці крові на момент обстеження були в межах популяційних норм (наведених в інструкціях до наборів, які використовувалися) і лише в однієї хворої (0,05 %) показник перевищував верхню межу норми. У групі пацієнок із саркомами матки у 4 (33,3 %) вміст показника перевищував нормальний дискримінаційний рівень.

Отримано середньостатистичні показники вмісту ММП-9 у сироватці крові пацієнок із доброякісними і злоякісними пухлинами матки (табл. 1).

Рівень ММП-9 у сироватці крові хворих на саркому матки демонструє помірне, але вірогідне перевищення показника в пацієнок із доброякісними пухлинами.

Ці дані дають підставу припустити, що досліджуваний фермент бере участь у розвитку неопластичного процесу.

Паралельно було проведено імуногістохімічне дослідження вмісту ММП-9 у пухлинній тканині.

Під час вивчення рівня експресії ММП-9 у разі фіброміоми матки визначено його вкрай низький рівень (рис. 1).

У 4 із 20 спостережень лейоміосаркоми (20,0 %) експресія ММП-9 була слабкою нерівномірною (+), переважно цитоплазматичною майже в 40,0 % пухлинних клітин. У 2 із цих випадків у цитоплазмі, де-не-де в клітинних мембранах і ендотеліоцитах, реакцію можна було розцінити як осередкову помірну, проте посилення забарвлення (++) було виявлено лише в 10,0 % клітинних елементів (рис. 2).

Помірну експресію ММП-9 було виявлено у 8 (40,0 %) пухлинах із 20, серед них лейоміосаркоми становили 4 спостереження, ендометріальні стромальні саркоми — ще 4 (рис. 3).

Кількість позитивно забарвлених клітин наближалася до 80,0–90,0 %.

Реакція визначалася досить рівномірною, у лейоміосаркомах її візуалізація була обмежена пухлинними клітинами. Ендометріальна стромальна саркома демонструвала осередкове забарвлення ендотеліальної вистілки кровоносних судин та клітин реактивного інфільтрату (рис. 4, 5).

Із 20 утворень 8 пухлин (40,0 %) — 6 лейоміосарком і 2 ендометріальні стромальні саркоми — відрізнялися високим вмістом ММП, що підтверджувалося дифузною вираженою позитивною реакцією клітин із ММП-9 (рис. 6, 7).

Якщо в описаних вище спостереженнях забарвлені гранули розташовувалися переважно

Таблиця 1

Вміст ММП-9 у сироватці крові пацієнок залежно від виду пухлини, нг/мл

Показник	Середнє, нг/мл	Стандартна помилка	Медіана, нг/мл	Стандартне відхилення	min-max, нг/мл
Фіброміома (n = 20)	502,4	11,39	513	50,96	376–590
Саркома (n = 20)	544,1	17,75	553,5	61,5	437–620

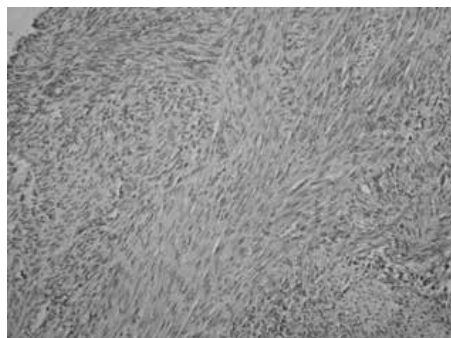


Рис. 1. Слабка осередкова експресія ММП-9 у клітинах фіброміоми. Реакція з поліклональними антитілами (ПКАТ) до ММП-9, 92 kDa Collagenase IV, $\times 400$

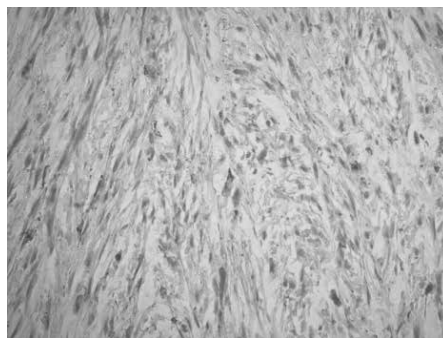


Рис. 2. Слабка цитоплазматична експресія ММП-9 у пухлинних клітинах та екстрацелюлярному матриксі лейоміосаркоми. Реакція ПКАТ до ММП-9, 92 kDa Collagenase IV, $\times 100$

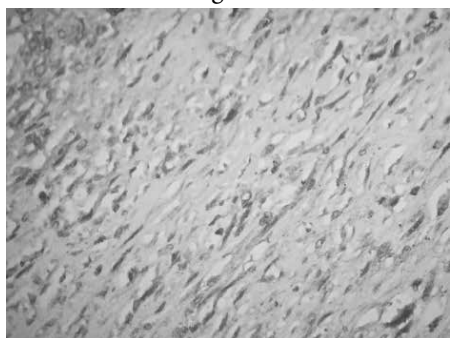


Рис. 3. Помірна цитоплазматична експресія ММП-9 у пухлинних клітинах лейоміосаркоми. Реакція з ПКАТ до ММП-9, 92 kDa Collagenase IV, $\times 100$

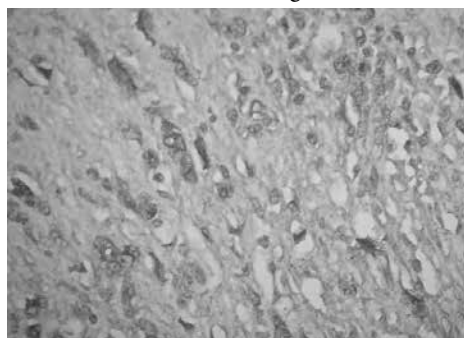
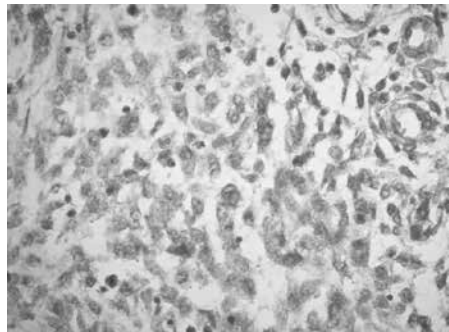
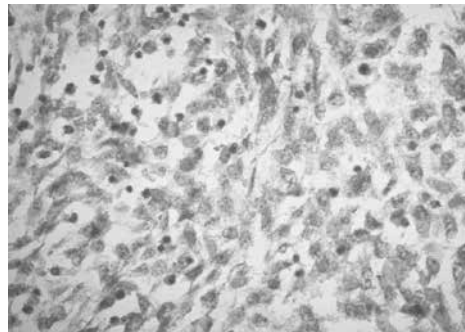


Рис. 4. Помірна цитоплазматична експресія ММП-9 у частині пухлинних клітин та екстрацелюлярному матриксі ендометріальної стромальної саркоми. Реакція з ПКАТ до ММП-9, 92 kDa Collagenase IV, $\times 400$



а



б

Рис. 5. Помірна цитоплазматична експресія ММП-9 у пухлинних клітинах, ендотеліоцитах (*а*) і в моноцитах та нейтрофілах реактивного інфільтрату (*б*) ендометріальної стромальної саркоми. Реакція з ПКАТ до ММП-9, 92 kDa Collagenase IV, $\times 400$

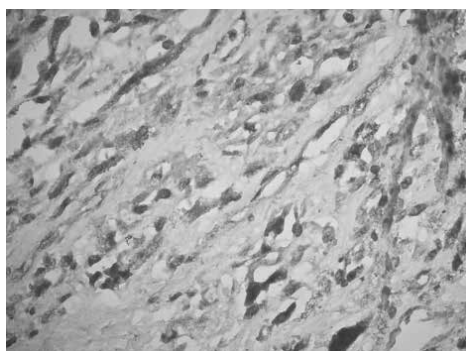


Рис. 6. Виражена цитоплазматична експресія ММП-9 у пухлинних клітинах та екстрацелюлярному матриксі лейоміосаркоми. Реакція з ПКАТ до ММП-9, 92 kDa Collagenase IV, $\times 400$

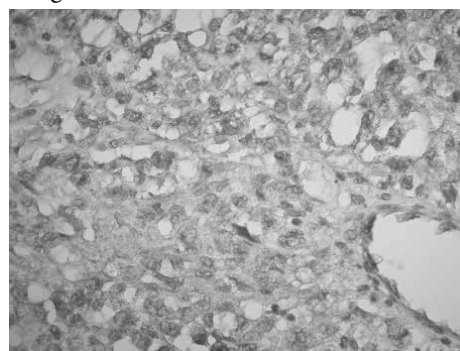


Рис. 7. Виражена цитоплазматична експресія ММП-9 у пухлинних клітинах, ендотеліоцитах та екстрацелюлярному матриксі ендометріальної стромальної саркоми. Реакція з ПКАТ до ММП-9, 92 kDa Collagenase IV, $\times 400$

в цитоплазмі та цитоплазматичній мембрані клітин новоутворення, то в цій вибірці металопротеїназа виявлялася також в ендотеліюцитах самої пухлини, в ендотелії судин міометрія, а також у лімфоцитах, макрофагах, гістіоцитах інфільтрату зони інвазії пухлини в міометрій.

Необхідно зазначити надекспресію ММП-9 у пухлинних вузлах в одному з досліджуваних випадків — забарвлення сприймали 100,0 % пухлинних клітин строми, епітеліального компонента, ендотеліюцитів і екстрацелюлярного матриксу (див. рис. 7).

ВИСНОВКИ

Загалом аналіз вмісту ММП-9 у сироватці крові та пухлинній тканині пацієнток із мезенхімальними пухлинами матки довів, що цей фермент із високим ступенем імовірності бере участь у неопластичному процесі. Про це свідчить вищий рівень ферменту в сироватці крові пацієнток із саркомами порівняно з таким

у жінок із фіброміомами, а також високий рівень експресії ММП-9 у пухлинній тканині саркоми матки. Так, помірний і високий вміст ММП-9 виявлено у 80,0 % сарком матки. Така реакція може свідчити про інвазивний та метастатичний потенціал цих пухлин, оскільки накопичення її у клітинах пухлини, фібробластах строми, реактивному інфільтраті й ендотеліюцитах призводить до порушень у екстрацелюлярному матриксі, дезорієнтації колагенових волокон і базальних мембран кровоносних судин, що й зумовлює можливість розвитку гематогенних метастазів.

На нашу думку, рекомендувати цей показник для диференційної діагностики пухлин було б передчасно через невелику кількість спостережень, але вивчення змін вмісту цього ферменту в разі пухлин матки є *перспективним*, щонайменше цей показник може бути корисним для моніторингу перебігу неопластичного процесу і відповідної реакції на проведені лікування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии : монография / Г. Г. Автандилов. — М. : Медицина, 2002. — 240 с.
2. Бережная Н. М. Физиологическая система соединительной ткани и онкогенез. I. Роль клеточных компонентов стромы в развитии опухоли / Н. М. Бережная, В. Ф. Чехун // Онкология. — 2016. — Т. 18, № 1 (67). — С. 4–14. — Режим доступа : http://nbuv.gov.ua/UJRN/OL_2016_18_1_3.
3. Герштейн Е. С. Клинические перспективы исследования ассоциированных с опухолью протеаз и их тканевых ингибиторов у онкологических больных / Е. С. Герштейн, Н. Е. Кушлинский // Вестник РАМН. — 2013. — № 5. — С. 16–27.
4. Гинекология : национальное руководство / под ред. В. И. Кулакова, И. Б. Манухина, Г. М. Савельевой. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. — 1088 с.
5. Иммуногистохимические характеристики почечно-клеточного рака с внутривенным распространением / Д. В. Щукин, Н. И. Яковцова, В. Н. Лесовой [и др.] // Патология. — 2015. — № 1. — С. 65–69.
6. 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 [и др.] // Сиб. онкол. журн. — 2005. — № 3 (15). — С. 54–63.
7. Сывороточные матриксные металлопротеиназы и их тканевой ингибитор 1-го типа: корреляция с отдаленными результатами лечения больных с саркомами костей / И. В. Бабкина, И. С. Черномаз, А. В. Бондарев [и др.] // Вопр. биол., мед. и фармац. химии. — 2016. — № 9. — С. 41–45.
8. Юлдашева Д. Ю. Роль матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов при развитии гиперплазии эндометрия / Д. Ю. Юлдашева // Фундаментальные исследования. — 2015. — № 1–4. — С. 845–847.
9. A systematic review of matrix metalloproteinase 9 as a biomarker of survival in patients with osteosarcoma / H. Li, K. Zhang, L. H. Li [et al.] // Tumor Biol. — 2014. — Vol. 35, № 6. — P. 5487–5491.
10. Matrix metalloproteinase expression in related to angiogenesis and histologic grade in spindle cell soft tissue neoplasms of the extremities / M. M. Roebuck, T. R. Helliwell, I. H. Chaudhry [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. — 2005. — Vol. 123. — P. 59–66.