

14. National Center for Biotechnology Information. GenBank, NIH genetic sequence database [Electronic resource] / United States National Library of Medicine (NLM), a branch of the National Institutes of Health. — Bethesda, Maryland, 1988. — Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snpref.cgi?rs=1801280>. — Date of access: 19.11.2010.

15. Макарова, С. И. Соответствие генотипа и фенотипа ацетилирования / С. И. Макарова, В. А. Вавилин, А. В. Кудряшов // Фармакогенетика. — 2006. — № 6. — С. 37–39.

16. Полиморфизм NAT2, фармакокинетика изониазида и гепатотоксические реакции у больных туберкулезом легких / В. А. Вавилин [и др.] // Материалы Междунар. конф., Новосибирск, 2–8 сент. 2007 / Новосибирский НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН. — С. 18.

17. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA / L. X. Shen [et al.] // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 1999. — Vol. 96. — P. 7871–7876.

Поступила 19.10.2015

УДК 616.345-006-097.1

ОЦЕНКА ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 В РАКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Т. Т. Штабинская¹, М. Боднар², С. А. Ляликов¹, В. А. Басинский¹, А. Маршалек³

¹Гродненский государственный медицинский университет

²Collegium Medicum в Быдгоще, Университет им. Н. Коперника, Торунь, Польша

³Познанский университет медицинских наук и Великопольский Центр Онкологии, Польша

К ведущим факторам неоангиогенеза относят матриксные металлопротеиназы.

Цель: оценить прогностическую значимость уровня экспрессии ММП-2 в раке толстой кишки.

Материалы и методы. Клинико-морфологический анализ 72 случаев колоректального рака, резецированного в период с 2001 по 2011 гг. Иммуногистохимическое исследование с использованием мышиных моноклональных антител к ММП-2 выполнено в лаборатории Collegium Medicum в Быдгоще.

Результаты. Обнаружены связи между уровнем экспрессии матриксной металлопротеиназы-2 в раке толстой кишки с возрастом пациентов, степенью дифференцировки, инвазии и метастазированием рака, выживаемостью пациентов. Однако полученные данные свидетельствовали об отсутствии прямой взаимосвязи между возрастанием экспрессии маркера и прогрессированием опухоли.

Ключевые слова: неоангиогенез, матриксная металлопротеиназа-2, колоректальный рак.

THE ASSESSMENT OF THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF THE LEVEL OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 EXPRESSION IN COLON CANCER

T. T. Shtabinskaya¹, M. Bodnar², S. A. Lyalikov¹, V. A. Basinskiy¹, A. Marshalek³

¹Grodno State Medical University

²Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland

³Poznan University of Medical Sciences and Wielkopolski Center of Oncology, Poland

The leading factors triggering neoangiogenesis include matrix metalloproteinases.

Objective: to assess the prognostic significance of the level of MMP-2 expression in colon cancer.

Material and methods. The clinical and morphological analysis of 72 cases of colorectal cancer resected over 2001–2011. Immunohistochemical studies using mouse monoclonal antibodies to MMP-2 were performed in the laboratory of Collegium Medicum Bydgoszcz.

Results. The research showed a relation between the level of matrix metalloproteinase-2 expression in colon cancer to the age of the patients, level of differentiation, invasion and metastasis of cancer, and survival of patients. However, the data suggest there is no direct relation between an increase in the marker expression and tumor progression.

Key words: angiogenesis, matrix metalloproteinase-2, colorectal cancer.

Введение

Колоректальный рак является весьма актуальной и исключительно частой патологией: индивидуальный риск развития заболевания достигает 5–6 % [1]. У мужчин он занимает 4-е место по частоте (после рака легкого, простаты и желудка), а у женщин — 3-е (после рака молочной железы и шейки матки) [2]. Поэтому актуальным является поиск биомаркеров для скрининга, ранней диагностики и прогноза

развития заболевания [3]. К основным проявлениям прогрессирования рака относится его инвазивный рост, а также метастазирование, важнейшим патогенетическим звеном которого является неоангиогенез [4]. К пусковым факторам опухолевого неоангиогенеза относят матриксные металлопротеиназы (ММП), произведенные опухолевыми и стромальными клетками. Для инвазии и метастазирования клеткам необходимо преодолеть барьеры в

виде базальных мембран, экстраклеточного матрикса и тканевых структур. Эти барьеры разрушаются с помощью протеолитических ферментов, в частности, ММП, которые в связи с этим также претендуют на роль факторов опухолевой прогрессии. ММП согласно своему строению и субстратной специфичности делятся на несколько групп. Наиболее перспективным является изучение группы желатиназ. Так как они гидролизуют нефибриллярный коллаген IV типа, образующий базальные мембраны, считается, что именно эти протеазы инициируют инвазивный рост рака, приводят к нарушению контактного ингибирования и развитию метастазов [5]. Группа желатиназ включает ММП-2 (желатиназу А) и ММП-9 (желатиназу В), принимающих активное участие в деградации внеклеточного матрикса, дестабилизации и разрушении межклеточных связей [6]. В целом ретроспективный анализ исследований экспрессии ММП-2 у больных раком различных локализаций показывает, что повышение экспрессии ММП-2 в первичной опухоли позитивно ассоциировано с низкой дифференцировкой, способностью к инвазии и метастазам, с плохим прогнозом [7], однако не все авторы выявили такую однозначную зависимость [8, 9].

Цель

Изучить клинико-морфологическую характеристику колоректального рака у жителей Гродненской области (Беларусь) с оценкой уровня экспрессии ММП-2 и его прогностической значимости.

Материалы и методы исследования

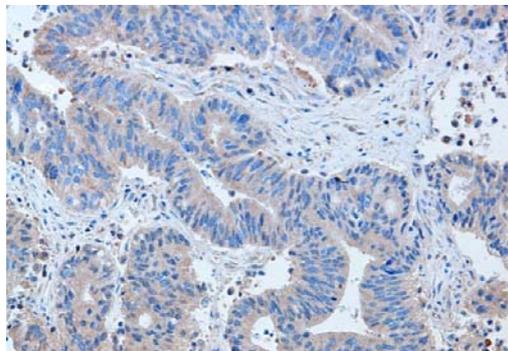
Материалом для исследования стали 72 образца ткани рака толстой кишки, резецированного у 29 мужчин и 43 женщин в период с 2001 по 2011 гг. в Гродненском областном онкологическом диспансере (Беларусь). Возраст пациентов колебался от 37 лет до 81 года. Преобладали лица старше 60 лет (76 %). У большинства пациентов опухоль локализовалась в дистальных отделах — 59 случаев. В 11 случаях на момент операции была диагностирована I стадия рака, в 14 случаях — II, в 33 — III и в 14 — IV. Наличие регионарных метастазов отмечено у 44 пациентов. При этом поражение лимфатических узлов N1 (от 1 до 3) было диагностировано у 33 пациентов, N2 (4 и больше лимфоузлов) — у 11. Прорастание опухоли в соседние органы и ткани обнаружено в 6 случаях. На момент постановки диагноза у 12 пациентов имелись гематогенные метастазы, у 7 из них в течение 5 лет появились новые. Среди остальных пациентов за этот же период отдаленные метастазы впервые были выявлены еще у 4. При гистологическом исследовании опухолей во всех наблюдениях выявлена аденокарцинома разной степени дифференцировки: G1 — у 29 пациентов, G2 — у 26, G3 — у 15 и G4 — у 2. За период наблюдения

(с 2001 по 2015 гг.) у 24 пациентов были выявлены рецидивы, при этом у 12 из них рецидив возник в течение первых 2 лет после операции, а у остальных — в течение 5 лет. В среднем рецидивировали опухоли через 2,24 года (1,75–3,43). Всего за период наблюдения умерли 45 (62,5 %) пациентов. Медиана продолжительности жизни пациентов после постановки диагноза составила 4,82 (2,81–10,41) года. Рубеж 5-летней выживаемости не перешагнули 35 пациентов, а 23 из них не прожили и 3 лет после постановки диагноза.

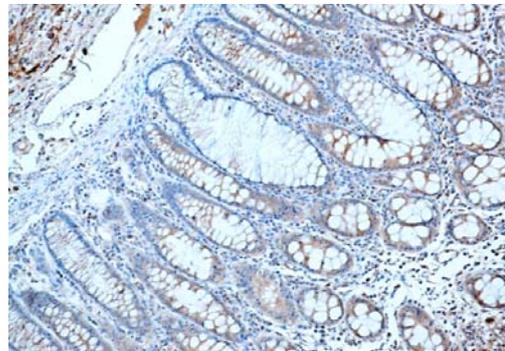
Иммуногистохимическое исследование выполнено в лаборатории Collegium Medicum им. Л. Рыдыгера в Быдгоще (Польша) на серийных парафиновых срезах ткани опухолей с использованием мышинных моноклональных антител к ММП-2 (ab1828) (Abcam, Cambridge, UK). Депарафинизацию и демаскировку антигенов проводили по стандартной методике, используя Epitope Retrieval Solution pH-9 (Dako, Denmark). Срезы толщиной 3 мкм инкубировали с первичными антителами на протяжении 16 ч при +4 °С. В качестве вторичных антител и пероксидазного комплекса использовали стандартный набор EnVision (фирма «Dako», Дания). Для визуализации реакции применяли раствор диаминобензидина DAB+ (фирма «Dako», Дания). Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера. Контрольный срез оставляли без первой инкубации. Для количественной оценки результатов микропрепараты были сфотографированы в максимально возможном количестве неперекрывающихся полей зрения, полученных с использованием объектива ×20 с разрешением 1600×1200 пикселей, при помощи микроскопа Leica и цифровой камеры Leica 425 C. Экспрессия маркеров оценивалась количественно при помощи компьютерной программы «Aperio Image Scope» v. 9.1.19.1567. Программа калибровалась, после чего результаты иммуногистохимических реакций оценивались исходя из показателя «позитивность» (в интерфейсе программы «positivity»), определяемого компьютерной программой, по стандартному алгоритму подсчета позитивных пикселей «Positive Pixel Count» v. 9. Из анализа исключались гистологические артефакты при помощи инструмента «negative pen tool». Для каждого случая рассчитывалось среднее значение позитивности всех изображений по правилам нахождения среднего.

Статистический анализ проводили с использованием программы «Statistica», 10.0 (SNAXAR207F394425FA-Q). Для сравнения независимых переменных применяли тест Mann — Whitney, Kruskal — Wallis и медианный. Зависимые переменные сравнивали с помощью теста Wilcoxon. Для оценки достоверности различий между переменными в случаях с количеством групп больше двух использовали тест Kruskal —

Wallis. Связь между переменными оценивали с помощью метода ранговой корреляции Спирмена. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные в работе представлены в формате медианы (нижняя квартиль-верхняя квартиль).



а)



б)

**Рисунок 1 — Экспрессия ММП-2 в опухоли (а) и краях резекции (б).
Окраска с использованием антител к ММП-2, ув. $\times 10$**

Вместе с тем уровень экспрессии ММП-2 в стромальном компоненте опухоли существенно выше, чем в паренхиматозном — 0,042 (0,01–0,08) и 0,024 (0,006–0,05), $p = 0,00000000003$. С помощью теста Спирмена выявлена отрицательная корреляционная связь между уровнем экспрессии ММП-2 в опухоли и возрастом пациентов ($r = -0,27$; $p = 0,02$). Статистически значимых различий в зависимости от пола пациентов не обнаружено. В отличие от результатов, полученных отдельными исследователями [8, 10], нами установлено, что позитивность экспрессии ММП-2 в дистально локализованных раках выше по сравнению с проксимально локализованными — 0,048 (0,028–0,107) и 0,017 (0,012–0,033), $p = 0,001$. Статистически значимые различия были выявлены между высокодифференцированными (G1) и низкодифференцированными (G3) раками — 0,054 (0,027–0,083) и 0,022 (0,015–0,041), $p = 0,04$, а также умеренно дифференцированными (G2) и низкодифференцированными (G3) раками — 0,049 (0,026–0,080) и 0,022 (0,015–0,041), $p = 0,011$. В двухуровневой системе классификации с выделением «низкогредных» (G1-2) и «высокогредных» (G3-4) опухолей [11] статистический анализ выявил достоверные различия по величине экспрессии ММП-2 между 1-й и 2-й группами (0,052 (0,026–0,081) и 0,022 (0,015–0,041), $p = 0,007$), в то же время ряд авторов отмечает отсутствие какой-либо связи между уровнем экспрессии ММП-2 в раке толстой кишки и уровнем дифференцировки опухоли [8, 10]. Возможно, что ММП-2 играют критическую роль в процессе неоангиогенеза в начальной стадии заболевания, с чем связан ее высокий уровень в высокодифференцированных опухолях [4].

Результаты и обсуждение

Нами установлено, что уровни позитивности ММП-2 в опухоли и вне ее, в краях операционных разрезов статистически значимо не различаются — 0,040 (0,022–0,075) и 0,045 (0,019–0,127) соответственно; $p > 0,05$ (рисунок 1).

Показатели позитивности ММП-2 в опухоли на разных стадиях заболевания, как и в работах других авторов [8, 9], не различались. Однако в строме рака уровень экспрессии ММП-2 достоверно отрицательно коррелирует со стадией заболевания ($r = -0,25$; $p = 0,03$). Статистически значимые различия в интенсивности экспрессии ММП-2 установлены между ПА и ПШВ стадиями — 0,077 (0,018–0,130) и 0,035 (0,0195–0,051), $p = 0,016$, а также между ПША и ПШВ — 0,078 (0,048–0,092) и 0,035 (0,0195–0,051), $p = 0,019$.

В отличие от результатов, полученных Е. С. Герштейн с соавт. [10], нами было установлено, что размеры опухоли отрицательно коррелировали с уровнем экспрессии ММП-2 ($r = -0,35$; $p = 0,002$). Статистически значимо показатели позитивности различались между pT2 и pT4 (0,072 (0,025–0,11) и 0,0154 (0,013–0,021), $p = 0,013$), а также pT3 и pT4 (0,041 (0,023–0,06) и 0,0154 (0,013–0,021), $p = 0,0038$). Уровень позитивности ММП-2 в опухоли практически не зависит от степени поражения лимфоузлов метастазами, что не противоречит результатам других исследований [9, 10]. Однако достоверные корреляционные связи были выявлены между характеристикой N и экспрессией ММП-2 в микроокружении опухоли ($r = -0,25$, $p = 0,03$), а также между N и экспрессией ММП-2 в краях резекции ($r = 0,5$, $p = 0,016$). Следует отметить, что в первом случае связь была отрицательной, а во втором — положительной. Статистически значимо показатели позитивности в строме различались между собой при pN0 и pN2 (0,061 (0,029–0,130) и 0,018 (0,015–0,085) соответственно; $p = 0,07$) (рисунок 2а), а в краях резекции — при pN0 и pN1 (0,025 (0,009–0,045) и 0,105 (0,003–0,31) соответственно; $p = 0,047$) (рисунок 2б).

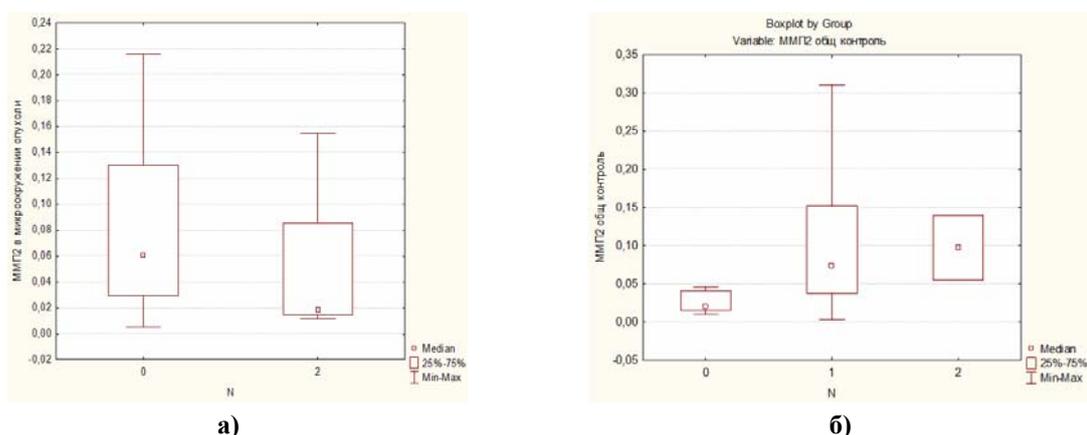


Рисунок 2 — Экспрессия ММП-2 в зависимости от степени поражения регионарных лимфоузлов метастазами: а — в микроокружении опухоли; б — в краях резекции

Данные литературных источников о зависимости между экспрессией ММП и появлением гематогенных метастазов весьма противоречивы. В отдельных работах доказывается наличие такой связи [13], в других — отвергается [9, 10]. В нашем исследовании статистически значимых различий между показателями экспрессии ММП-2 в раке у пациентов с наличием и отсутствием гематогенных метастазов на момент постановки диагноза выявлено не было. Следует, однако, отметить, что показатели позитивности ММП-2 в краях резекции у 11 человек с метастазами, возникшими в период наблюдения после оперативного лечения, были достоверно ниже, чем у остальных пациентов (0,013 (0,006–0,031) и 0,055 (0,032–0,140), $p = 0,02$).

Как и ряд авторов [8, 9], мы не выявили статистически значимых связей между уровнями экспрессии ММП-2 у пациентов с наличием и отсутствием рецидивов в анамнезе и 5-летней выживаемостью. Однако у пациентов, умерших за период наблюдения, выявлена достоверная положительная корреляционная между уровнем позитивности ММП-2 в раке и длительностью жизни после верификации диагноза ($r = 0,38$; $p = 0,0098$). У пациентов, не проживших трех лет после верификации диагноза, уровни экспрессии ММП-2 в раке были существенно ниже, чем у лиц, умерших позже — 0,027 (0,0155–0,059) и 0,056 (0,031–0,086), $p = 0,017$.

Заключение

Обнаруженные связи между уровнем экспрессии ММП-2 в опухоли, ее микроокружении, краях резекции с такими клинико-морфологическими параметрами, как возраст пациентов, степень дифференцировки рака, его инвазивный потенциал, метастазирование, выживаемость представляют определенный интерес и могут быть использованы при разработке прогностических критериев заболевания. Однако полученные данные, в сопоставлении с литературными сведениями, свидетельствуют

о том, что прямая взаимосвязь между возрастанием экспрессии ММП и прогрессирующим раком не может считаться для рака толстой кишки самоочевидной. Это диктует необходимость изучения особенностей поведения рака с учетом иммуногистохимической гетерогенности опухоли.

Выводы

Уровень экспрессии ММП-2 в микроокружении рака толстой кишки выше, чем в опухолевых клетках ($p = 0,0000000003$), при этом позитивность экспрессии ММП-2 в дистально локализованных раках выше по сравнению с проксимально расположенными новообразованиями ($p = 0,001$).

Уровень позитивности ММП-2 в микроокружении опухоли отрицательно коррелирует со стадией заболевания ($r = -0,25$; $p = 0,03$), при ПIV стадии он достоверно ниже, чем при ПА ($p = 0,016$) и ПIIА ($p = 0,019$), с глубиной инвазии, при pT4 он статистически значимо ниже, чем при pT2 ($p = 0,013$) и pT3 ($p = 0,0038$), а также с возрастом пациентов ($r = -0,27$; $p = 0,02$). Статистически значимых различий в зависимости от пола пациентов не обнаружено.

Выраженность метастатического поражения лимфатических узлов достоверно отрицательно коррелирует с уровнем экспрессии ММП-2 в стромальном компоненте опухоли и положительно — с его позитивностью в краях резекции. У лиц с гематогенными метастазами, возникшими после удаления опухоли, уровни экспрессии ММП-2 в краях резекции достоверно ниже ($p = 0,02$), чем у пациентов без метастазов.

Уровень позитивности ММП-2 в раке положительно коррелирует с длительностью жизни пациентов после верификации диагноза ($r = 0,38$; $p = 0,0098$).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Boyle, P. Cancer incidence and mortality in Europe / P. Boyle, J. Ferlay // Ann. Oncol. — 2005. — Vol. 16. — P. 481–488.
- Global cancer statistics / A. Jemal [et al.] // CA Cancer J Clin. — 2011. — P. 61–69.

3. Subnuclear proteomics in colorectal cancer: identification of proteins enriched in the nuclear matrix fraction and regulation in adenoma to carcinoma progression / J. Albrethsen [et al.] // *Mol Cell Proteomics*. — 2010. — Vol. 9. — P. 988–1005.

4. Rundhaug, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis / J. E. Rundhaug, // *J. Cell Mol.* — 2005. — Vol. 9. — P. 267–285.

5. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression / S. Jodele [et al.] // *Cancer Metastasis Rev.* — 2006. — Vol. 25. — P. 35–43.

6. Kalluri, R. Fibroblasts in cancer / R. Kalluri, M. Zeisberg // *Nat Rev Cancer*. — 2006. — Vol. 6. — P. 392–401.

7. O-Charoenrat, P. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck / P. O-Charoenrat, P. H. Rhys-Evans, S. A. Eccles // *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* — 2001. — Vol. 7. — P. 813–820.

8. Матриксные металлопротеиназы 2, 3, 13 и их тканевой ингибитор 2-го типа в опухолях и плазме крови больных раком

толстой кишки / Е. С. Герштейн [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2008. — Т. 145, № 3. — С. 337–341.

9. Экспрессия матриксных металлопротеиназ и послеоперационный прогноз при раке толстой кишки / Д. А. Головкин [и др.] // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии: кварталный научно-практический журнал*. — 2009. — № 2. — С. 52–55.

10. Ассоциированные с опухолью протеазы — прогностические маркеры колоректального рака / Е. С. Герштейн [и др.] // *Клиническая лабораторная диагностика*. — 2013. — № 10. — С. 5–10.

11. American Joint Committee on Cancer / F. L. Greene [et al.] // *AJCC Cancer Staging Manual*. — 6th ed. — New York: Springer-Verlag, 2002.

12. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in bile as a marker of liver metastasis in colorectal cancer / N. Okada [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. — 2001. — Vol. 288, № 1. — P. 212–216.

Поступила 29.06.2015

УДК 575.117.5 575.113.2

ВКЛАД ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ p.P72R (*TP53*) И p.V353A (*HMMR*) В ГЕНЕЗ СПОРАДИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В. Н. Кипень¹, С. Б. Мельнов¹, Р. М. Смолякова²

¹Международный государственный экологический университет имени А. Д. Сахарова, г. Минск

²Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н. Н. Александрова, г. Минск

Цель: изучить вклад полиморфных вариантов p.P72R (*TP53*) и p.V353A (*HMMR*) в генез спорадических форм рака молочной железы у пациентов из Республики Беларусь.

Материалы и методы. В исследование были включены 169 пациентов со спорадической формой РМЖ, молекулярно-генетический анализ проводили с помощью ПДРФ-анализа и ПААГ-электрофореза.

Результаты. Проведен анализ полиморфных вариантов p.72R (*TP53*, rs1042522) и p.V353A (*HMMR*, rs299290) у пациентов с раком молочной железы из Республики Беларусь. Определены частоты распространенности генотипов и аллелей в группе пациентов с РМЖ и в группе сравнения, а также проведено сравнение полученных результатов с данными ESP Cohort Populations. Проанализирована связь результатов генотипирования с клинико-морфологическими характеристиками опухолей. Установлены статистически значимые различия ($p = 0,029$) между частотой распространенности генотипа CC (*TP53*, p.R72P) и уровнем экспрессии Her-2/neu в группе пациентов с РМЖ. Генотип CT (*HMMR*, p.V353A) ассоциирован с эстрогенотрицательными опухолями молочной железы ($p = 0,016$).

Заключение. Полиморфные варианты p.72R (*TP53*, rs1042522) и p.V353A (*HMMR*, rs299290) не оказывают существенного модифицирующего влияния на риск развития спорадических случаев рака молочной железы, но в то же время имеет место связь между наличием определенного генотипа и клинико-морфологическими характеристиками опухолей.

Ключевые слова: рак молочной железы, полиморфизм, риск развития заболевания, TP53, HMMR, эстрогеновые и прогестероновые рецепторы, Her-2/neu, молекулярный подтип опухолей.

THE CONTRIBUTION OF POLYMORPHIC VARIANTS P.P72R (*TP53*) AND P.V353A (*HMMR*) IN THE GENESIS OF SPORADIC BREAST CANCER

V. N. Kipen¹, S. B. Melnov¹, R. M. Smolyakova²

¹International Sakharov Environmental University, Minsk

²Scientific Research Institute of Oncology and Medical Radiology named after N. N. Alexandrov, Minsk

Aim: to study the contribution of *TP53* and *HMMR* genes to the genesis of sporadic forms of breast cancer in patients from Belarus.

Material and methods. The study included 169 patients with sporadic breast cancer, molecular genetic analysis was performed by RFLP analysis and PAGE electrophoresis.

Results. The polymorphic variants p.72R (*TP53*, rs1042522) and p.V353A (*HMMR*, rs299290) in patients with breast cancer from Belarus were analyzed. The frequencies of genotypes and alleles prevalence in patients with breast cancer (and in the comparison group) and compared the results with the data by ESP Cohort Populations. The relation of the results of genotyping to the clinical and morphological characteristics of the tumor was analyzed. The study revealed statistically significant differences ($p = 0.029$) between the frequency of the prevalence of the geno-