

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**ММП-9, ММП-2, VEGF И VEGFR2 КАК ФАКТОРЫ ИНВАЗИИ И АНГИОГЕНЕЗА ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ***Памяти профессора Н.И. Соловьевой (17.01.1934 – 28.05.2022)**О.С. Тимошенко*, Е.В. Кугаевская, Т.А. Гуреева*Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича,
Москва, 119121, ул. Погодинская, 10; *e-mail: ryzhakova.olga@list.ru

Деструкция ткани и ангиогенез играют важную роль в прогрессии злокачественных опухолей. Они отвечают за рост и развитие опухоли, ее способность к инвазии и метастазированию. Ключевая роль в деструктивных процессах отводится матриксным металлопротеиназам (ММП), которые способны расщеплять практически все компоненты соединительнотканного матрикса (СТМ). Желатиназы ММП-2 и ММП-9 гидролизуют коллаген IV типа – основу базальных мембран, – освобождая тем самым из СТМ различные биологически активные молекулы, включая эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) – ключевой регулятор ангиогенеза. Его действие реализуется рецепторами VEGF-VEGFR. В данной работе исследовали экспрессию ММП-2, ММП-9, VEGF и VEGFR2 на ранних и более поздних стадиях плоскоклеточной карциномы шейки матки (ПКШМ). Работа проведена на клиническом материале (образцы опухолевой и морфологически нормальной ткани, окружающей опухоль), полученном от пациентов с наличием или отсутствием метастазов в регионарные лимфоузлы. Мы показали, что при ПКШМ существенная экспрессия ММП-9 наблюдается в опухолях уже на ранних стадиях опухолевой прогрессии. На более поздних стадиях заболевания (при обнаружении у пациентов метастазов в регионарные лимфоузлы) заметно повышается экспрессия ММП-2, VEGF и VEGFR2 как в опухоли, так и в морфологически нормальной ткани, окружающей опухоль, что вносит дополнительный вклад в процессы деструкции, ангиогенеза и метастазирования. Мы предполагаем, что ММП-2, VEGF и VEGFR2 могут рассматриваться в качестве маркеров неблагоприятного течения ПКШМ.

Ключевые слова: : ММП-2; ММП-9; VEGF; рецептор VEGF; опухолевая прогрессия; плоскоклеточная карцинома шейки матки

DOI: 10.18097/BMCRM00187**ВВЕДЕНИЕ**

Основными процессами, вовлеченными в опухолевую прогрессию, являются деструкция и ангиогенез, которые отвечают за рост и развитие опухоли, степень ее васкуляризации, способность к инвазии и метастазированию. Опухолевая инвазия и метастазирование начинаются с разрушения протеолитическими ферментами внеклеточного соединительнотканного матрикса (СТМ), окружающей опухоль, что запускает процесс перемещения опухолевых клеток в соседние ткани [1]. Ключевая роль в деструктивных процессах отводится матриксным металлопротеиназам (ММП) [2]. Следует отметить, что ММП также участвуют в различных биологических и физиологических процессах, освобождая из СТМ целый ряд биоактивных молекул – гормонов, факторов роста и цитокинов [3]. Семейство ММП включает 23 цинк-зависимых фермента с общими функциональными и структурными компонентами. Различное распределение ММП внутри клеток позволяет разделить их на ММП мембранного типа (MT-ММП) и секретируемые ММП, а специфичность действия в отношении компонентов СТМ – на коллагеназы, желатиназы, стромелизины и матрилизины [4]. В целом, ММП способны расщеплять все основные компоненты СТМ, включая коллагены IV, III, V, I типов, а также желатин, эластин, фибронектин, витронектин и др. [4]. Существенная роль в развитии процессов инвазии и ангиогенеза отводится желатиназам А и В (ММП-2 и

ММП-9), которые способны гидролизовать коллаген IV типа – основу базальных мембран, освобождая тем самым из СТМ различные факторы роста, такие как эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF), трансформирующие факторы роста (TGF-альфа, TGF-бета), фактор роста фибробластов (FGF) и целый ряд других [5, 6]. В настоящее время установлено, что ММП играют роль на всех стадиях опухолевой прогрессии, влияя на множество биологических функций, включая модификацию сигнальных путей, регуляцию цитокинов, участвующих в иммунном ответе и опухолевом росте, в частности, путем индуцирования ангиогенеза [7]. Повышенная экспрессия ММП обнаружена в целом ряде злокачественных опухолей, однако их спектр зависит от стадии развития опухоли, от вида опухоли и ткани. Следует отметить, что увеличение экспрессии ММП (в том числе ММП-2 и ММП-9) может наблюдаться в морфологически нормальной ткани, окружающей опухоль, что способствует опухолевой прогрессии [5, 6].

Эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) и его рецепторы (VEGFR) играют важнейшую роль как в физиологическом, так и в патологическом ангиогенезе [8]. Семейство VEGF включает семь членов, имеющих гомодимерную структуру. В организме человека экспрессируется пять белков этого семейства: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и плацентарный фактор роста (PlGF). VEGF-A (или просто VEGF) играет наиболее важную роль в организме человека. Он является ключевым



Таблица 1. Характеристика клинического материала. Данные получены из историй болезни пациентов

Номер пациента	TNM	Клиническая стадия
1, 2	T2bN1M0	III
3-5	T1bN1M0	III
6-14	T1bN0M0	I

Таблица 2. Последовательность праймеров, использованных в работе

ММП-9	прямой	5'GATCATTCCTCAGTGCCGGA3'
	обратный	5'TTCAGGGCGAGGACCATAGA3'
ММП-2	прямой	5'GAGTTGGCAGTGCAATACCT3'
	обратный	5'GCCATCCTTCTCAAAGTTGT3'
VEGF	прямой	5'ATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGT3'
	обратный	5'TGGCCTTGGTGAGGTTTGATCC3'
VEGFR2	прямой	5'TGCCTACCTCACCTGTTTC3'
	обратный	5'GGCTCTTTCGCTTACTGTTC3'
GAPDH	прямой	5'ACCACAGTCCATGCCATCAC3'
	обратный	5'TCCACCACCCTGTTGCTGTA3'

регулятором ангиогенеза [8]. Его действие направлено в основном на эндотелиальные клетки сосудов; кроме того, он оказывает влияние на ряд других типов клеток, например, стимулирует процесс миграции моноцитов, макрофагов и раковых клеток, что играет важную роль в канцерогенезе [9]. Избыточная экспрессия VEGF наблюдается в большинстве опухолей [10]. Белки семейства VEGF реализуют свои биологические эффекты при взаимодействии с рецепторами трех типов – VEGFR1 (или Flt-1), VEGFR2 (или KDR/Flk-1) и VEGFR3 (или Flt-4), которые представляют собой трансмембранные белки, обладающие тирозинкиназной активностью. Тирозинкиназы, входящие в состав каждого типа VEGFR, различаются, поэтому последующий сигналинг зависит от типа вовлеченного рецептора [10]. Основным медиатором биологического действия VEGF-A является VEGFR2. На моделях *in vivo* показано, что антитела к VEGFR2 ингибируют рост как первичных, так и метастатических опухолей, что указывает на решающую роль VEGFR2 в опухолевом ангиогенезе. В настоящее время VEGF-A и VEGFR2 являются основными мишенями антиангиогенной терапии [11].

Изучение экспрессии ММП при плоскоклеточной карциноме шейки матки (ПКШМ) проводится как в системах *in vitro* – на различных клеточных культурах рака шейки матки [12, 13], – так и на образцах опухолевых тканей [14]. Эксперименты, проводимые на культуре клеток, показывают, что взаимодействие опухолевых клеток с клетками опухолевого микроокружения может приводить к активации ММП и дальнейшей опухолевой прогрессии [13]. Целью данной работы было изучение взаимосвязи экспрессии основных факторов деструкции и ангиогенеза – ММП-2, ММП-9, VEGF и VEGFR2 при ранних и более поздних стадиях ПКШМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинический материал

В работе был использован операционный материал, полученный от 14 пациентов с диагнозом ПКШМ, находившихся на лечении в НМИЦ онкологии

им. Н.Н. Блохина. Возраст пациентов варьировал от 28 до 48 лет. Все случаи были классифицированы по TNM клинической классификации опухолей в соответствии с требованиями международного союза по борьбе с раком (UICC) (табл. 1). Во всех образцах карцином экспрессировался ген E7 HPV16. У 5 пациентов выявлены метастазы в регионарных лимфатических узлах (пациенты № 1-5). Операционный материал немедленно замораживали и хранили в жидком азоте. В работе были использованы 28 образцов тканей: 14 парных образцов, включающих плоскоклеточную карциному шейки матки и прилегающую к опухоли морфологически нормальную ткань.

Выделение РНК, синтез кДНК

Выделение суммарной РНК из тканей проводили с использованием набора SV Total RNA Isolation System («Promega», США), обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов MMLV RT kit («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. кДНК синтезировали с использованием случайных гексапраймеров, конечная концентрация РНК-матрицы – 50 нг/мкл. До использования образцы кДНК хранили при температуре -20°C.

ПЦР в реальном времени

Для подбора специфических праймеров были использованы данные GeneBank Nucleotide Sequence Database. Для оценки структуры праймеров использовали программу Oligo 4.1 Primer Analysis Software. Точное значение температуры подбирали экспериментальным путем. Подбор праймеров осуществлен с учетом интронно-экзонной структуры гена, чтобы избежать искажения результатов ПЦР возможными примесями геномной ДНК. Состав праймеров, использованных в данной работе, приведён в таблице 2. Условия реакции: 95°C – 5 мин.; 40 циклов: денатурация – 95°C, 45 сек.; отжиг – 60°C, 45 сек.; элонгация – 72°C, 45 сек.; далее 72°C – 10 мин. Концентрация каждого праймера – 0.3 мкМ. Реакцию проводили с использованием ПЦР-смеси qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген»).

Уровни экспрессии генов были нормализованы по отношению к референсному гену домашнего хозяйства *GAPDH* (глицеральдегидфосфатдегидрогеназа). Для сравнительного анализа использовали метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [15].

Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическую (ИГХ) реакцию проводили по стандартному методу [16] с некоторыми модификациями. Образцы опухолей фиксировали раствором 10% нейтрального формалина в течение 24 ч, затем обезживали и пропитывали парафином в автоматизированном режиме в аппарате STP120 («Thermo Fisher Scientific», США). Срезы толщиной 4 мкм готовили на высокоадгезивных стеклах. Депарафинирование проводили по стандартной технологии. Восстановление антигенной активности проводили при температуре 97°C в течение 20 мин в цитратном буфере (10 мМ, pH 6.0). Использовали моноклональные антитела к ММП-2, ММП-9, VEGF, VEGFR2 («LabVision», США) в готовом разведении. ИГХ реакции проводили в автоматизированном режиме в иммуногистостейнере Avtosteiner («Dako», Дания). В качестве детекционной системы использовали систему Envision («Dako»), в качестве хромогена – 3,3' диаминобензидин. Затем срезы докрашивали гематоксилином. Микроскопирование проводили на микроскопе Leica Q 550 («Leica Microsystems», Германия). Интенсивность (выраженность) реакции оценивали полуколичественным способом по шкале от 0 до 3: 0 – отсутствие реакции, 1+ – слабая реакция, 2+ – умеренная реакция, 3+ – сильная реакция.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование генной экспрессии ММП-9, ММП-2, VEGF и VEGFR2 в образцах опухолевой и морфологически нормальной ткани

Все исследуемые образцы были разделены на две группы: группа №1(N+) – парные образцы тканей (1-5), взятые от пациентов с метастазами в регионарных лимфоузлах, и группа №2(N-) – парные образцы тканей (6-14), взятые у пациентов без метастазов.

Экспрессия ММП-9 была обнаружена во всех образцах двух групп (рис. 1 А). В большинстве случаев она была выше в опухолевой ткани (образцы 1-3, 6, 8, 10, 12, 13). В морфологически нормальной ткани экспрессия ММП-9 была в основном на низком уровне, однако в трех образцах (4, 5, 14) ее уровень был выше, чем в опухолевой ткани. В трех парных образцах группы №2(N-) (7, 9, 11) существенных различий в экспрессии ММП-9 не наблюдалось. Следует отметить, что во всех парных образцах группы №1(N+) наблюдалась существенная разница между уровнями экспрессии ММП-9 в опухолевой и морфологически нормальной ткани, в то время как в группе №2(N-) подобные различия наблюдались менее чем в половине случаев.

Экспрессия ММП-2 была обнаружена во всех образцах групп №1(N+) и №2(N-) (рис. 1, Б). В большинстве парных образцов группы №1(N+) (1, 2, 4, 5) экспрессия ММП-2 была существенно выше в опухолевой ткани. Кроме того, в этой группе наблюдались самые значительные различия уровней экспрессии ММП-2 в образцах опухолевой и морфологически нормальной ткани. В группе №2(N-)

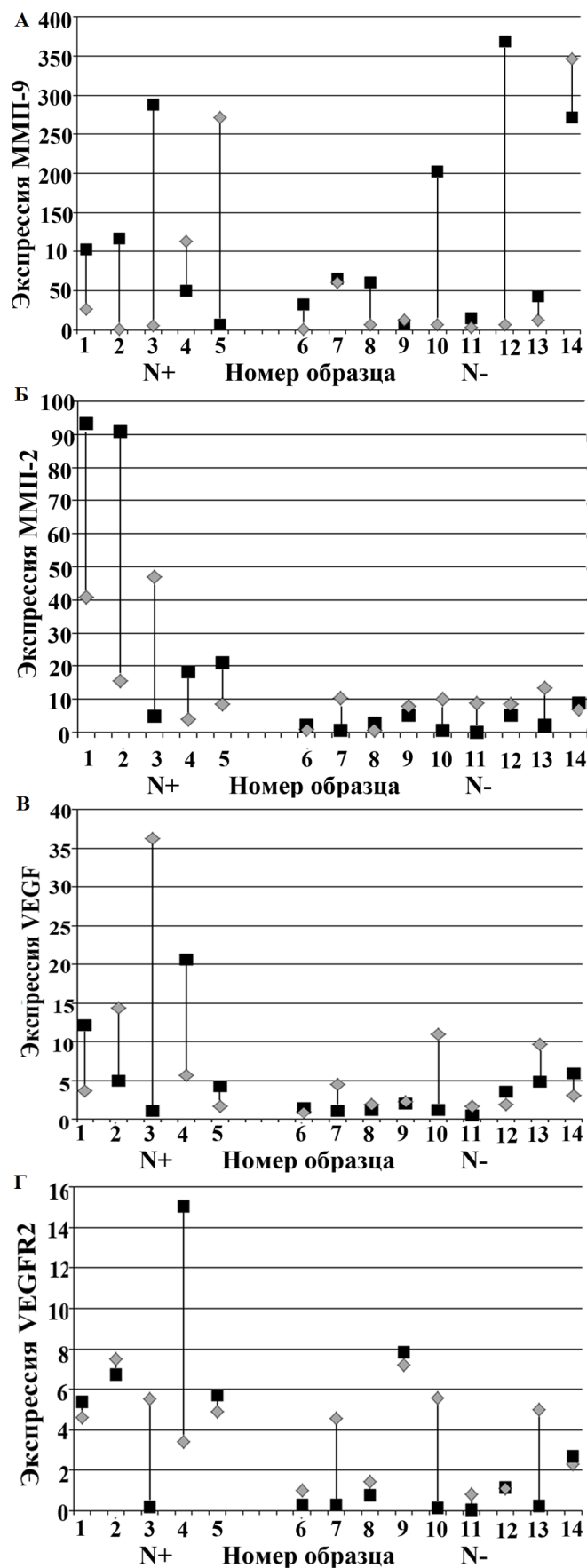


Рисунок 1. Экспрессия ММП-9, ММП-2, VEGF, VEGFR2 в образцах опухолевой и прилегающей морфологически нормальной ткани. Вертикальной линией объединены парные образцы: ■ - опухолевая ткань, ◆ - морфологически нормальная ткань. N+ – парные образцы тканей из группы №1 (взятые от пациентов с метастазами в регионарных лимфоузлах), N- – парные образцы тканей и группа №2 (взятые у пациентов без метастазов).

уровень экспрессии ММП-2 практически во всех образцах был ниже, чем в группе №1(N+). В большинстве парных образцов этой группы (7, 9-13) экспрессия ММП-2 была выше в морфологически нормальной ткани.

Экспрессия VEGF была обнаружена во всех образцах групп №1(N+) и №2(N-) (рис. 1 В). В половине парных образцов обеих групп (5, 6, 8, 9, 11, 12, 14) уровни экспрессии VEGF в опухолевой и морфологически нормальной ткани были близкими. В четырех парных образцах группы №1(N+) (1-4) наблюдались существенные различия в экспрессии VEGF – в двух случаях она была выше в опухолевой ткани (1, 4), в двух других – в морфологически нормальной ткани (2, 3); самая высокая экспрессия VEGF наблюдалась в образце нормальной ткани (3) и образце опухолевой ткани (4). В большинстве парных образцов группы №2(N-) экспрессия VEGF различались незначительно.

Экспрессия VEGFR2 была обнаружена во всех образцах групп №1(N+) и №2(N-) (рис. 1 Г). В девяти парных образцах обеих групп (1, 2, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14) уровни экспрессии VEGFR2 в опухолевой и морфологически нормальной ткани различались незначительно; в трех парных образцах из группы №1(N+) (1, 2, 5) и одном парном образце из группы №2(N-) (9) экспрессия VEGFR2 была на более высоком уровне в обоих видах ткани. Значительные различия между уровнями экспрессии наблюдались в пяти парных образцах обеих групп (3, 4, 7, 10, 13); в четырех из них (3, 7, 10, 13) экспрессия VEGFR2 была значительно выше в морфологически нормальной ткани, в одном образце (4) из группы №1(N+) – в опухоли, где ее уровень был наивысшим среди всех образцов.

Суммируя полученные результаты, следует отметить, что существенные различия между уровнями экспрессии ММП-9, ММП-2 и VEGF в опухолевой и морфологически нормальной ткани наблюдались в большинстве парных образцов группы №1(N+), в то время как в большинстве парных образцов группы №2(N-) уровни экспрессии ММП-9, ММП-2 и VEGF различались значительно меньше (рис. 1, Б, В). Экспрессия VEGFR2 в большинстве парных образцов группы №1(N+) была выше, чем в парных образцах группы №2(N-) (рис. 1 Г). Более чем в половине парных образцов обеих групп не наблюдалось существенных различий между уровнями экспрессии VEGFR2 в опухолевой и морфологически нормальной ткани. Уровень экспрессии VEGFR2 был выше в тех образцах тканей (опухолевых или морфологически нормальных), в которых наблюдался и более высокий уровень экспрессии VEGF (рис. 1 В, Г).

Иммуногистохимическое исследование образцов опухолевой ткани.

Исследование экспрессии ММП-2, ММП-9, VEGF и VEGFR2 на уровне белка проведено методом ИГХ во всех опухолевых образцах групп №1(N+) и №2(N-). В качестве примера для каждого объекта исследования представлены фрагменты опухолевой ткани, интенсивность окрашивания которых наиболее типична для данной группы образцов (рис. 2).

Экспрессия ММП-9 в образцах обеих групп была преимущественно на высоком уровне (3+/2+) (рис. 2 А1, А2). Экспрессия ММП-2 в четырех из пяти образцов группы №1(N+) была максимальная (2+/3+) (рис. 2 Б1); в восьми образцах группы №2(N-) – отсутствовала

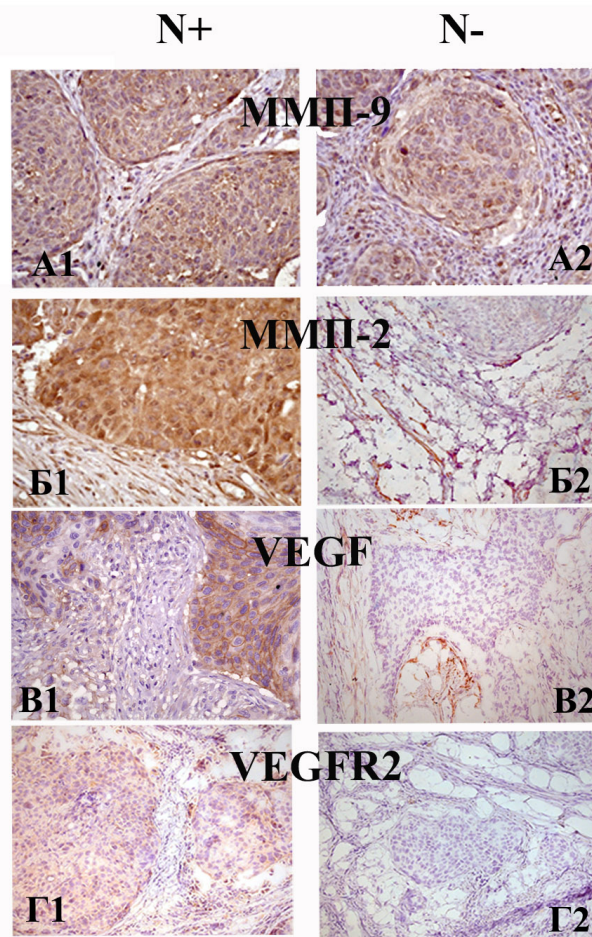


Рисунок 2. Экспрессия ММП-9, ММП-2, VEGF, VEGFR2 в образцах плоскоклеточной карциномы шейки матки. Увеличение $\times 400$. Интенсивность реакции 3+ - образцы А1, А2, Б1, В1; интенсивность реакции 2+ - образец Г1; интенсивность реакции 1+ - образцы Б1, В1; интенсивность реакции 0 - образец Г1.

или находилась на низком уровне (0/1+) (рис. 2 Б2), и только в одном образце экспрессия была выше (2+). Экспрессия VEGF наблюдалась во всех образцах группы №1(N+): в трёх – на уровне 3+ (рис. 2 В1), в двух – на уровне 1+; в группе №2(N-) в пяти образцах экспрессия либо отсутствовала, либо была на низком уровне (0/1+) (рис. 2 В2), в четырёх образцах была на уровне 2+. Экспрессия VEGFR2 в четырёх образцах группы №1(N+) была на уровне 2+/3+ (рис. 2 Г1), в одном образце – на уровне 1+; в образцах группы №2(N-) в семи случаях экспрессия была на уровне 0/1+ (рис. 2 Г2), в двух случаях – на уровне 2+/3+.

ОБСУЖДЕНИЕ

Протеиназы играют важнейшую роль во множестве процессов, происходящих в течение опухолевой прогрессии; они функционируют как обширная протеолитическая сеть, включающая различные системы ферментов, находящиеся как в опухолевых тканях, так и в различных структурных компонентах опухолевого микроокружения [17]. Основными протеиназами, отвечающими за деградацию и ремоделирование СТМ во время опухолевой прогрессии, являются ММП [2, 18]. Они экспрессируются как опухолевыми клетками, так и клетками окружающих тканей, клетками опухолевых сосудов, опухоль-ассоциированными фибробластами и макрофагами, что способствует процессам

инвазии и метастазирования [19, 20]. Одна из ключевых ролей в этих процессах отводится MMP-2 и MMP-9 [21]. Гидролизуют коллаген IV типа, они освобождают из СТМ множество биоактивных молекул, в том числе VEGF, имеющий решающее значение для процесса ангиогенеза [8]. Гиперэкспрессия VEGF наблюдается в большинстве опухолей человека, в том числе при ПКШМ, где коррелирует с инвазивностью, метастазированием, плотностью сосудов, рецидивами и негативным прогнозом [22, 23].

Ранее нами было показано, что при ПКШМ повышенная экспрессия и активность ряда MMP наблюдается как в опухолевых тканях (MMP-1, MMP-14 и MMP-9), так и в прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани (экспрессия MMP-1, MMP-2 и MMP-9) [24]. Мы предположили, что повышенная экспрессия MMP-2 и MMP-9 в морфологически нормальной ткани является неблагоприятным прогностическим фактором, поскольку может вносить дополнительный вклад в опухолевую прогрессию и способствовать развитию метастазирования, повышая секрецию VEGF при разрушении внеклеточного СТМ. Взаимосвязь между уровнями экспрессии VEGF, MMP-2 и MMP-9 в опухолях и выживаемостью пациентов была продемонстрирована при колоректальном раке и раке желудка [25, 26], а также при раке шейки матки [14, 27]. Однако экспрессия этих объектов была исследована только в опухолевых тканях (включая строму), но не в прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани.

Сравнительный анализ генной экспрессии MMP-9, MMP-2 и VEGF показал, что практически во всех парных образцах группы №1(N+), полученных от пациентов с метастазами в регионарных лимфоузлах, наблюдается существенная разница в уровнях экспрессии в зависимости от типа ткани (рис. 1 А, Б, В). В большинстве парных образцов этой группы экспрессия MMP-9, MMP-2 преобладала в опухолевой ткани, где достигала наивысших значений, в то время как экспрессия VEGF в половине парных образцов была выше в морфологически нормальной ткани. И, наоборот, в образцах группы №2(N-), полученных от пациентов без метастазов, значительные различия в уровнях экспрессии MMP-9 наблюдались менее чем в половине парных образцов, уровни экспрессии MMP-2 различались не существенно, а в случае VEGF – единично. Экспрессия VEGFR2 в большинстве парных образцов группы №1(N+) была выше, чем в парных образцах группы №2(N-) (рис. 1 Г). Практически во всех парных образцах группы №2(N-), где наблюдалась разница в экспрессии VEGFR2, уровни ее были выше в морфологически нормальной ткани. Следует отметить, что уровень экспрессии VEGFR2 был выше в тех образцах тканей (опухолевых или морфологически нормальных), в которых наблюдался и более высокий уровень экспрессии VEGF (рис. 1 В, Г). Данные ИГХ исследования экспрессии MMP-9, MMP-2, VEGF и VEGFR2 в опухолевых образцах в целом согласуются результатами генного анализа этих объектов (рис.2).

Таким образом, мы обнаружили, что уровень экспрессии MMP-9 был выше в опухолевой ткани пациентов независимо от наличия или отсутствия у них метастазов, хотя в нескольких случаях экспрессия MMP-9 была выше в морфологически нормальной ткани (рис. 1 А). ИГХ анализ образцов опухолевых тканей пациентов обеих групп (с метастазами и без метастазов) показал, что экспрессия MMP-9 практически во всех случаях была на высоком уровне

(рис. 2 А1, А2). Эти данные согласуются с результатами более раннего исследования, в котором мы показали, что при ПКШМ наблюдается увеличение экспрессии MMP-9 в большинстве опухолей, а уровень экспрессии отражает метастатический и инвазивный потенциал опухоли [28]. Гиперэкспрессия MMP-9 в опухолях при ПКШМ была продемонстрирована также в ряде других исследований в тканях карцином шейки матки и образцах опухолей, находящихся на разных стадиях дифференцировки [29].

Представленные нами данные показывают, что в отличие от MMP-9, у большинства пациентов, имеющих метастазы, экспрессия MMP-2 в опухолевой ткани была значительно повышена по сравнению с окружающей тканью, в то время как у пациентов без метастазов существенных различий не наблюдалось (рис. 1, Б). Сравнение экспрессии MMP-2 в опухолевых тканях пациентов, проведенное методом ИГХ, показало, что экспрессия MMP-2 была ярко выражена у пациентов с метастазированием и находилась на низком уровне или отсутствовала у пациентов без метастазов (рис.2, Б1, Б2). Предполагается, что повышенная экспрессия MMP-2 в опухолях связана с плохим прогнозом при некоторых типах желудочно-кишечного и гинекологического рака [14, 30, 31]. Как и в случае MMP-9, у нескольких пациентов мы наблюдали повышенный уровень экспрессии MMP-2 в морфологически нормальной ткани, однако существенная разница была отмечена лишь в одном случае – в тканях пациента с метастазами (рис. 1 Б). Есть данные, что при инвазивной карциноме шейки матки экспрессия MMP-2 в клетках стромы, окружающей опухоль и находящейся в контакте с прилегающими тканями, постепенно растет по мере опухолевой прогрессии и коррелирует с клинической стадией заболевания [32]. Другие исследования, касающиеся экспрессии MMP и их эндогенных регуляторов при ПКШМ, показывают, что высокий уровень экспрессии MMP-2 в ткани стромы в значительной степени связан с плохой выживаемостью больных [14]. Таким образом, при ПКШМ неблагоприятным маркером течения заболевания может служить не только повышенная экспрессия MMP-2 в опухоли, но также и в окружающей ткани.

Мы показали, что при ПКШМ существенная экспрессия VEGF наблюдалась не только в опухолевой, но и в морфологически нормальной ткани пациентов, имеющих метастазы; у большинства пациентов разница между уровнями экспрессии VEGF в опухоли и окружающей ткани была значительной (рис. 1, В). В тканях пациентов второй группы (не имеющих метастазы), экспрессия различалась не существенно, хотя в нескольких случаях более высокая экспрессия VEGF наблюдалась в морфологически нормальной ткани (рис. 1, В). Следует отметить, что характер различий в уровнях экспрессии VEGF в опухолевых и морфологически нормальных тканях пациентов обеих групп (с метастазами и без них) был близок к таковому, наблюдающемуся в случае экспрессии MMP-2, но не MMP-9 (рис. 1, В, Б, А); у пациентов с более высоким уровнем экспрессии VEGF в опухоли (по сравнению с окружающей тканью) уровень экспрессии MMP-2 был также выше в опухолевой ткани. ИГХ анализ экспрессии VEGF в опухолях показал, она была хорошо выражена более чем в половине образцов, полученных от пациентов с метастазами (рис. 2 В1), в то время как в аналогичных тканях пациентов без метастазов экспрессия была в основном слабой или отсутствовала (рис. 2 В2). О гиперэкспрессии VEGF в

опухолевых тканях при раке шейки матки сообщалось также в ряде других публикаций [33].

Представленное исследование показывает, что при ПКШМ экспрессия VEGFR2 в опухолевых и окружающих опухоль тканях большинства пациентов с метастазами была выше, чем у пациентов без метастазов (рис. 1 Г). Следует отметить, что характер различий в уровнях экспрессии VEGFR2 в опухолевых и морфологически нормальных тканях пациентов обеих групп (с метастазами и без них) был близок к таковому, наблюдающемуся в случае экспрессии VEGF (рис. 1 В, Г). ИГХ анализ опухолевых тканей показал, что у большинства пациентов с метастазами экспрессия VEGFR2 была ярко выраженной, а у пациентов без метастазов экспрессия была в основном слабой или отсутствовала (рис. 2 Г1, Г2). Полученные результаты согласуются с данными других авторов, которые обнаружили корреляцию между повышением сывороточной экспрессии VEGF и VEGFR2 и снижением выживаемости пациентов при инвазивной карциноме шейки матки [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами данные показывают, что при ПКШМ существенная экспрессия MMP-9 наблюдается в опухолях уже на ранних стадиях опухолевой прогрессии, что способствует увеличению инвазивного потенциала опухоли. В отличие от MMP-9, экспрессия MMP-2, VEGF и VEGFR2 заметно повышается на более поздних стадиях опухолевой прогрессии (при обнаружении у пациентов метастазов в регионарные лимфоузлы) как в самой опухоли, так в морфологически нормальной ткани, окружающей опухоль, что вносит дополнительный вклад в процессы деструкции, ангиогенеза и метастазирования. Мы предполагаем, что MMP-2, VEGF и VEGFR2 могут рассматриваться в качестве неблагоприятных маркеров течения ПКШМ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№ 122022800499-5)

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Образцы плоскоклеточных карцином шейки матки были получены от пациенток НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в патологоанатомическом отделении согласно правилам этического комитета центра.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Wyganowska-Świątkowska, M., Tarnowski, M., Murtagh, D., Skrzypczak-Jankun, E., Jankun, J. (2019) Proteolysis is the most fundamental property of malignancy and its inhibition may be used therapeutically (Review). *Int. J. Mol. Med.*, **43**(1), 15-25. DOI:10.3892/ijmm.2018.3983
- Cabral-Pacheco, G.A., Garza-Veloz, I., Castruita-De la Rosa, C., Ramirez-Acuña, J.M., Perez-Romero, B.A., Guerrero-Rodriguez, J.F., Martinez-Avil, N., Martinez-Fierro, M.L. (2020) The roles of matrix metalloproteinases and their

- Inhibitors in human diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(24), 9739. DOI:10.3390/ijms21249739
- Kapoor, C., Vaideya, S., Wadhwan, V., Kaur, G., Pathak, A. (2016) Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J. Cancer Res. Ther.*, **12**(1), 28-35. DOI:10.4103/0973-1482.157337
- Laronha, H., Caldeira, J. (2020) Structure and function of human matrix metalloproteinases. *Cells*, **9**(5), 1076. DOI:10.3390/cells9051076
- Gialeli, C., Theocharis, A.D., Karamanos, N.K. (2011) Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.*, **278**(1), 16-27. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x
- Bauvois, B. (2012) New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochem. Biophys. Acta*, **1825**(1), 29-36. DOI:10.1016/j.bbcan
- Dufour, A., Overall, C.M. (2013) Missing the target: matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer. *Trends Pharm. Sci.*, **34**(4), 233-242. DOI:10.1016/j.tips.2013.02.004
- Melincovici, C.S., Boşca, A.B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I.M., Roman, A.L., Mişu, C.M. (2018) Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, **59**(2), 455-467.
- Karaman, S., Leppänen, V.M., Alitalo, K. (2018) Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Development*, **145**(14), dev151019. DOI:10.1242/dev.151019
- Roskoski, R.Jr. (2007) Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **62**(3), 179-213. DOI:10.1016/j.critrevonc.2007.01.006
- Gao, F., Yang, C. (2020) Anti-VEGF/VEGFR2 monoclonal antibodies and their combinations with PD-1/PD-L1 inhibitors in clinic. *Curr. Cancer Drug. Targets*, **20**(1), 3-18. DOI:10.2174/1568009619666191114110359
- Schröpfer, A., Kammerer, U., Kapp, M., Diel, J., Feix, S., Acker, J. (2010) Expression pattern of matrix metalloproteinases in human gynecological cancer cell lines. *BMC Cancer*, **10**, 553. DOI:10.1186/1471-2407-10-553
- Sato, T., Sakaia, T., Noguchi, Y., Hirakawa, M.T.S., Ito, A. (2004) Tumor-stromal cell contact promotes invasion of human uterine cervical carcinoma cells by augmenting the expression and activation of stromal matrix metalloproteinases. *Gynecol. Oncol.*, **92**(1), 47-56. DOI:10.1016/j.ygyno.2003.09.012
- Azevedo Martins, J.M., Rabelo-Santos, S.H., do Amaral Westin, M.C., Zeferino, L.C. (2020) Tumoral and stromal expression of MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, and VEGF-A in cervical cancer patient survival: a competing risk analysis. *BMC Cancer*, **20**(1), 660. DOI:10.1186/s12885-020-07150-3
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., Lin, X. (2013) An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat. Bioinforma. Biomath.*, **3**(3), 71-85.
- Dabbs, D.J. (2006) *Diagnostic Immunohistochemistry*, 2nd ed. Elsevier, Philadelphia.
- Breznik, B., Motaln, H., Lah Turnšek, T. (2017) Proteases and cytokines as mediators of interactions between cancer and stromal cells in tumours. *Biol. Chem.* **398**(7), 709-719. DOI:10.1515/hsz-2016-0283
- Brown, G.T., Murray, G.I. (2015) Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J. Pathol.*, **237**(3), 273-281. DOI:10.1002/path.4586
- Qiao, Y., Wan, J., Zhou, L., Ma, W., Yang, Y., Luo, W., Yu, Z., Wang, H. (2018) Stimuli responsive nanotherapeutics for precision drug delivery and cancer therapy. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **11**(1), e1527. DOI:10.1002/wnan.1527
- Cun, X., Li, M., Wang, S., Wang, Y., Wang, J., Lu, Z., Yang, R., Tang, X., Zhang, Z., He, Q. (2018) A size switchable nanoplatfor for targeting the tumor microenvironment and deep tumor penetration. *Nanoscale*, **10**(21), 9935-9948. DOI:10.1039/c8nr00640g
- Daniele, A., Abbate, I., Oakley, C., Casamassima, P., Savino, E., Casamassima, A., Sciortino, G., Fazio, V., Gadaleta-Caldarola, G., Catino, A., Giotta, F., De Luca, R., Divella, R. (2016) Clinical and prognostic role of matrix metalloproteinase-2, -9 and their inhibitors in breast cancer and liver diseases: A review. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **77**(Pt A), 91-101. DOI:10.1016/j.biocel.2016.06.002
- Kerbel, R.S. (2008) Tumor angiogenesis. *N. Engl. J. Med.*, **358**(19), 2039-2049. DOI:10.1056/NEJMra0706596
- Tewari, K.S., Sill, M.W., Long, H.J. 3rd, Penson, R.T., Huang, H., Ramondetta, L.M., Landrum, L.M., Oaknin, A., Reid, T.J., Leitao, M.M., Michael, H.E., Monk, B.J. (2014) Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *N. Engl. J. Med.*, **370**(8), 734-743. DOI:10.1056/NEJMoa1309748
- Solovyeva, N.I., Timoshenko, O.S., Gureeva, T.A., Kugaevskaya, E.V. (2015) Matrix metalloproteinases and their endogenous regulators in squamous cervical carcinoma (review of the own data). *Biomeditsinskaya Khimiya*, **61**(6), 694-704. DOI:10.18097/PBMC20156106694
- Araújo, R.F. Jr., Lira, G.A., Vilaça, J.A., Guedes, H.G., Leitão, M.C., Lucena, H.F., Ramos, C.C. (2015) Prognostic and diagnostic implications of MMP-2, MMP-9, and VEGF-α expressions in colorectal cancer. *Pathol. Res. Pract.*, **211**(1), 71-77. DOI:10.1016/j.prp.2014.09.007

26. Zheng, H., Takahashi, H., Murai, Y., Cui, Z., Nomoto, K., Niwa, H., Tsuneyama, K., Takano, Y. (2006) Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Anticancer Res.*, **26**(5A), 3579-3583.
27. Sawada, M., Oishi, T., Komatsu, H., Sato, S., Chikumi, J., Nonaka, M., Kudoh, A., Osaku, D., Harada, T. (2019) Serum vascular endothelial growth factor A and vascular endothelial growth factor receptor 2 as prognostic biomarkers for uterine cervical cancer. *Int. J. Clin. Oncol.*, **24**(12), 1612-1619. DOI:10.1007/s10147-019-01495-x
28. Solovyeva, N.I., Timoshenko, O.S., Kugaevskaya, E.V., Andreeva, Yu.Yu., Zavalishina, L.E. (2014) Key enzymes of degradation and angiogenesis as factors of tumor progression for squamous cell cervical carcinoma. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **40**(6), 688-696. DOI:10.1134/S1068162014060144
29. Brummer, O., Böhmer, G., Hollwitz, B., Flemming, P., Petry, K.U., Kühnle, H. (2002) MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation - an immunohistochemical study. *Gynecol. Oncol.*, **84**(2), 222-227. DOI:10.1006/gyno.2001.6413
30. Wang, H.L., Zhou, P.Y., Zhang, Y., Liu, P. (2014) Relationships between abnormal MMP2 expression and prognosis in gastric cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Cancer Biother. Radiopharm.*, **29**(4), 166-172. DOI:10.1089/cbr.2014.1608
31. Lu, X., Duan, L., Xie, H., Lu, X., Lu, D., Lu, D., Jiang, N., Chen, Y. (2016) Evaluation of MMP-9 and MMP-2 and their suppressor TIMP-1 and TIMP-2 in adenocarcinoma of esophagogastric junction. *Onco. Targets Ther.*, **9**, 4343-4349. DOI:10.2147/OTT.S99580
32. Fernandes, T., de Angelo-Andrade, L.A., Morais, S.S., Pinto, G.A., Chagas, C.A., Maria-Engler, S.S., Zeférino, L.C. (2008) Stromal cells play a role in cervical cancer progression mediated by MMP-2 protein. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, **29**(4), 341-344.
33. Mandić, A., Usaj Knezevic, S., Kapić Ivković, T. (2014) Tissue expression of VEGF in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J. BUON*, **19**(4), 958-64.
34. Sawada M., Oishi T., Komatsu, H., Sato, S., Chikumi, J., Nonaka, M., Kudoh, A., Osaku D., Harada, T. (2019) Serum vascular endothelial growth factor A and vascular endothelial growth factor receptor 2 as prognostic biomarkers for uterine cervical cancer. *Int. J. Clin. Oncol.*, **24**(12), 1612-1619. DOI:10.1007/s10147-019-01495-x

Поступила: 16.11.2022
 После доработки: 25.11.2022
 Принята к публикации: 29.11.2022

MMP-9, MMP-2, VEGF AND VEGFR-2 AS FACTORS OF INVASION AND ANGIOGENESIS IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE CERVIX

In memory of Professor Nina I. Solovyova (17.01.1934 – 28.05.2022)

O.S. Timoshenko, E.V. Kugaevskaya, T.A. Gureeva*

Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: ryzhakova.olga@list.ru

Tissue destruction and angiogenesis play an important role in malignant tumor progression. They are responsible for the tumor growth and progress and its ability to invade and metastasize. The key role in the destructive processes belongs to matrix metalloproteinases (MMPs), which are able to cleave almost all components of the extracellular matrix (ECM). Gelatinases MMP-2 and MMP-9 hydrolyze type IV collagen, the main component of basement membranes, thereby releasing various biologically active molecules from ECM, including vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF is a key regulator of angiogenesis. The main mediator of the biological action of VEGF is its receptor VEGFR2. This study was aimed at assessing the relationship between the expression of the main factors of tissue destruction and angiogenesis - MMP-2, MMP-9, VEGF and VEGFR2 in the early and later stages of cervical squamous cell carcinoma (CSCC). The work was performed using samples of tumor and surrounding morphologically normal tissue, obtained from patients with or without metastases to regional lymph nodes. We have shown that MMP-9 is significantly expressed in tumors in CSCC already at the early stages of tumor progression. At later stages of the disease (when metastases to regional lymph nodes are detected in patients), the expression of MMP-2, VEGF and VEGFR2 increases markedly both in the tumor and in the morphologically normal tissue surrounding the tumor and makes an additional contribution to the processes of destruction, angiogenesis and metastasis. We assume that MMP-2, VEGF and VEGFR2 can be considered as negative markers of the course of CSCC.

Key words: MMP-2; MMP-9; VEGF; VEGF receptor; tumor progression; squamous cell carcinoma of the cervix

FUNDING

The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) (№ 122022800499-5).

Received: 16.11.2022, revised: 25.11.2022, accepted: 29.11.2022