

Абоян И.А., Пакус Д.И., Грачев С.В., Слюсарев С.Л., Пакус С.М., Гиоев А.З., Толмачев А.Н.

## Внеклеточный протеолиз в моче у пациентов с мышечно - неинвазивным раком мочевого пузыря после лазерной резекции “en-block”

МБУЗ Клинико-диагностический центр «Здоровье», г. Ростов-на-Дону

Aboyan I.A., Pakus D.I., Grachev S.V., Slusarev S.L., Pakus S.M., Gioev A.Z., Tolmachev A.N.

### Extracellular proteolysis in the urine of bladder cancer patients after laser resection en-block

#### Резюме

В моче 73 больных поверхностным раком мочевого пузыря (РМП) в стадиях TaNOMO и T1NOMO после лазерной резекции “en-block”, методом ИФА оценивали уровень матриксной металлопротеиназы-2,9 и их ингибиторов – TIMP-1 и TIMP-2. Показано, что развитие рецидива 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 после лазерной резекции “en-block”.

**Ключевые слова:** MMP-2,9 TIMP-1, TIMP-2, РМП, моча, лазерная резекция опухоли мочевого пузыря “en-block”

#### Summary

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 TaNOMO and T1NOMO after laser resection “en-block”, 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 is relevant.

**Keywords:** MMP-2,9, TIMP-1, TIMP-2, superficial BC, urine, laser resection bladder tumor “en-block”

#### Введение

Поверхностный неинвазивный рак мочевого пузыря (ПРМП) составляет 80% всех впервые выявленных случаев РМП и связан с высоким риском местного рецидива [1]. Стандартным методом выявления рецидива ПРМП является цистоскопия с последующей биопсией, однако, на сегодняшний день актуален поиск малоинвазивных и дистанционных методов диагностики и лечения рака мочевого пузыря. В МБУЗ КДЦ “Здоровье”, с 2015 года, в качестве стандартного метода лечения первичных опухолей мочевого пузыря, внедрена лазерная резекция “en-block”. С целью оценки возможного риска рецидива, все возрастающее значение приобретает поиск специфических маркеров рака мочевого пузыря. Биомаркеры мочи представляют собой потенциальную область интереса

раннего обнаружения и динамического наблюдения пациентов с раком мочевого пузыря. В последние годы 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

Таблица 1. Содержание в моче ММП и их ингибиторов в исследуемых группах

Группа	Количество чел овек в группе	Содержание в моче, пг/мкмолькреатинина,			
		ММП-2	TIMP-2	ММП-9	TIMP-1
Здоровые лица	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 лицами и больными РМП определена по критерию Манна-Уитни.*

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 ММП-2, ММП-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 ММП-9/TIMP-1 и размером опухоли.

В связи с этим, целью нашего 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 после лазерной резекции "en-block".

## Материалы и методы

В исследование были включены 73 пациента 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 лиц 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 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, BenderMedSystems), а также ингибиторов матриксных металлопротеиназ – TIMP-1

(BenderMedSystems) и TIMP-2 (R&D). Содержание исследуемых показателей в моче определяли с учетом эксcretируемого креатинина, что позволило достичь устранения различий диуреза.

У пациентов с РМП, после лазерной резекции "en-block", риск рецидива и прогрессии РМП рассчитывали после выполнения контрольной цистоскопии, трансуретральной резекции опухоли согласно системе EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer), которая учитывает количество опухолей, их размер, частоту предшествующих рецидивов, наличие карциномы insitu, 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 обсуждение

Уровни мочевой экскреции ММП-2 у больных РМП и у здоровых лиц представлены в таблице 1. У пациентов со стадией РМП Tа-T1 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 лицами был также повышен в 1,3 раза. 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).

Соотношение прироста ММП-2 и TIMP 2 у пациентов с РМП, по сравнению со здоровыми лицами (ΔММП-2/ΔTIMP-2) составило 2,2±0,13. То есть прирост ММП-2 у пациентов клинической группы по отношению к контролю был в 2 раза выше по сравнению с приростом TIMP-2. Таким образом, протеолитический потенциал ММП-2 был высоким, но не компенсировался активностью ингибитора TIMP-2.

Содержание в моче ММП-9 у больных поверхностным РМП было статистически значимо выше (в 2,5 раза) по сравнению со здоровыми лицами (табл. 1). Уровень ингибитора активности TIMP-1 был повышен в 1,5 раза в моче у больных РМП по сравнению со здоровыми ли-

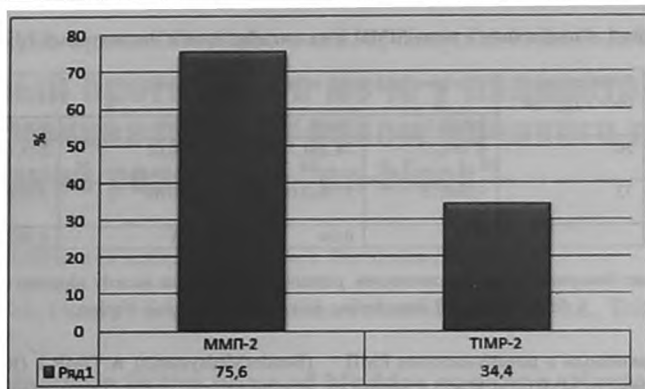


Рис. 1. Процентное повышение уровня ММП-2 и ТИМР-2 в моче у больных поверхностным РМП по сравнению со здоровыми лицами.

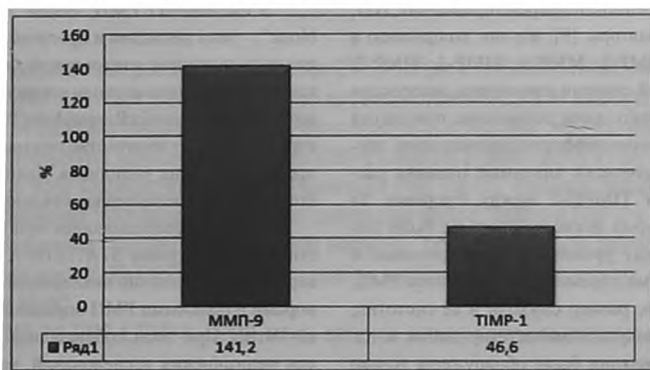


Рис. 2. Процентное повышение уровня ММП-9 и ТИМР-1 в моче у больных поверхностным РМП по сравнению со здоровыми лицами.

цами. Повышение уровня показателей ММП-9 и ТИМР-1 было неравномерным. Процентное повышение уровня мочевой экскреции ТИМР-1 у больных РМП по сравнению со здоровыми лицами составило 46,6% и было менее выраженным по сравнению с приростом содержания ММП-9 (рис. 2).

Соотношение прироста ММП-9 и ТИМР-1 у больных РМП, по сравнению со здоровыми лицами (ДММП-9/ДТИМР-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.

Кроме того, представляло интерес оценка экспрессии 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 Тa 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%.

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

Содержание ММП-9 в моче больных клинической группы исходно достоверно выше при стадии Т1 по сравнению с Тa, степени дифференцировки G2 по сравнению с G1, промежуточном прогнозе прогрессирования РМП по сравнению с благоприятным прогнозом (табл. 3).

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

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что развитие поверхностного РМП, после лазерной резекции "en-block", характеризуется активацией системы протеолиза внеклеточного матрикса, о чем свидетельствует повышенная экскреция ММП-2 и ММП-9, а также ТИМР-1 и ТИМР-2 с мочой. Одновременное повышение активности ММП и их ингибиторов является закономер-

Таблица 2. Мочевая экскреция ММП-2 и TIMP-2 у больных ПРМП  
в зависимости от характеристик основного заболевания

Параметр	ММП-2, пг/мкмолькреати нина	TIMP-2, пг/мкмолькреа тина	DMMP-2 DTIMP-2	p
<b>Стадия первичного РМП</b>				
Ta	7,0±0,19	38,5±2,1	1,94±0,04	ММП2 p=0,35 TIMP2 p=0,76
T1	7,5±0,41	35,9±2,5	3,04±0,06	
<b>Степень дифференцировки</b>				
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	
<b>Количество узлов</b>				
Монофокусные опухоли	7,1±0,25	35,2±1,4	2,95±0,13	ММП2 p=0,98 TIMP2 p=0,84
Многофокусные опухоли	7,4±0,43	38,6±2,0	2,18±0,11	
<b>Размеры образования</b>				
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	
<b>Прогноз</b>				
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	

Таблица 3. Мочевая экскреция ММП-9 и TIMP-1 у больных ПРМП  
в зависимости от характеристик основного заболевания

Параметр	ММП-9, пг/мкмолькреат инина	TIMP-1, пг/мкмолькреати нина	DMMP-9 DTIMP-1	p
<b>Стадия первичного РМП</b>				
Ta	0,79±0,07	349,2±27,1	4,2±0,13	ММП9 p=0,03 TIMP1 p=0,43
T1	0,91±0,06	378,9±25,5	2,6±0,09	
<b>Степень дифференцировки</b>				
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	
<b>Количество опухолей</b>				
Монофокусные опухоли	0,84±0,04	347,2±25,7	3,7±0,19	ММП9 p=0,95 TIMP1 p=0,88
Многофокусные опухоли	0,81±0,06	364,8±30,3	3,0±0,18	
<b>Размеры опухоли</b>				
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	
<b>Прогноз</b>				
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	

ным 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 MMP-9 является разрушение белков внеклеточного матрикса, а именно: расщепляются фибриллин, ламинин, желатин, декорин, эластин, коллагены IV, V, XI и XVI типов. Кроме

того, MMP-9 активирует трансформирующий фактор роста  $\beta$  и фактор некроза опухоли  $\alpha$ . По данным литературы, повышенная экспрессия желатиназы MMP-9 и MMP-2 часто наблюдается при инвазивных и высококачественных опухолях [8]. Однако нами была выявлена повышенная концентрация ММП-9 в моче уже при стадиях Ta 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, после лазерной резекции "en-block", и несет ли исходная оценка активности системы ММП-TIMP в моче диагностическую значимость для определения неопластического потенциала заболевания, что должно являться предметом дальнейших исследований. ■

Аболян И.А., Пакус Д.И., Грачев С.В., Слюсарев С.Л., Пакус С.М., Гиоев А.З., Толмачев А.Н., МБУЗ Клинико – диагностический центр «Здоровье», г. Ростов – на – Дону, Автор, ответственный за переписку - Пакус Сергей Михайлович – к.м.н., врач-уролог, отделения урологии МБУЗ КДЦ «Здоровье», г. Ростов-на-Дону. Адрес для переписки 344001 г. Ростов-на-Дону, пер. Днепровский 122/1 корпус «Г». Тел. 8(8632)223-45-10, e-mail: sergej.pakus@rambler.ru

## Литература:

1. Андреева Ю.Ю. Морфологические и молекулярно-биологические факторы прогноза рака мочевого пузыря. Автореферат на соискание учёной степени доктора медицинских наук // Москва. –2009. – 164 с.
2. Аполыхин О.И. Состояние оказания урологической помощи в России и задачи службы по реализации национального проекта «Здоровье». Пути улучшения образования уролога. М: Дипак, 2007. – 32 с.
3. Бабиченко И.И., Самоилов М.В., Кудрявцева Л.В. Иммуногистохимические особенности уротелиальных опухолей мочевого пузыря // Москва. Архив патологии. –2012. –№ 3. –С. 7–10.
4. 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. Научно-практический журнал. –2009. –Т 13. –№ 1. –С. 87–89.
5. Завалишина Л.Э., Франк Г.А., Андреева Ю.Ю. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы при уротелиальном раке мочевого пузыря и светлоклеточном раке почки // Материалы съезда онкологов. –2006. –С. 58.
6. Amirghofran Z., Monabati A., Khezri A., Malek-Hosseini Z. Apoptosis in transitional cell carcinoma of bladder its relation to proliferation and expression of p53 and bcl-2. // Pathol. Oncol. Res. –2004. –Vol.10(3). –P.154–158.
7. An J., Rettig M.B. Epidermal growth factor receptor inhibition sensitizes renal cell carcinoma cells to the cytotoxic effects of bortezomib. // Mol. Cancer Ther. –2007. –Vol.6(1). –P.61–69.
8. Babayan A., Andreeva Y., Zaletaev D., Nemtsova M. Molecular evidence supporting field effect in recurrent and primary multiple superficial bladder cancers. // Eur. J. Hum. Genet. –2010. –Vol.18(1). –P.163.
9. Birkedal-Hansen H., Moore W.G.I., Bodden M.K. Matrix metallo-proteinases: A review. // Crit. Rev. Oral Biol. Med. –1993. –Vol.4. –P.197.
10. Blasi F., Stoppelli M.P. Proteases and cancer invasion: from belief to certainty AACR. // Meeting on proteases and protease inhibitors in cancer. Biochimicaetbiophysicaacta. –Vol.142(3). –1998. –P.35–44.
11. Bogusiewicz M., Stryjecka-Zimmer M., Szymanski M. et al. Activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 in advanced laryngeal cancer // Otolaryngol. head neck. Surg. –2003. –Vol.128. –№1. –P.132–136.
12. Borden L.S., Clark P.E., Hall M.C. Bladder Cancer. // Curr. Opin. Oncol. –2005. –Vol.17. –P.275–280.
13. Boyd S. et al. Differential expression of stromal MMP-1, MMP-9 and TIMP-1 in basal cell carcinomas of immunosuppressed patients and controls. // Virchows Arch. –2008. –Vol.452(1). –P.83–90.
14. Burchardt M., Burchardt T., Shabsigh A. et al. Current concepts in biomarker technology for bladder cancers. // Clin. Chem. –2000. –Vol.46. –P.595–605.