

Е.С. Герштейн, Н.Е. Кушлинский

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Российская Федерация

Клинические перспективы исследования ассоциированных с опухолью протеаз и их тканевых ингибиторов у онкологических больных

Представлен обзор результатов собственных исследований и наиболее репрезентативных данных литературы о роли ассоциированных с опухолями протеолитических систем, участвующих в процессах инвазии, метастазирования и ангиогенеза, в диагностике и прогнозировании результатов лечения различных онкологических заболеваний. Основное внимание уделено ключевым матриксным металлопротеиназам (ММП) и их тканевым ингибиторам (ТИМП), а также компонентам системы активации плазминогена (uPA, PAI-1) в опухолях и периферической крови. В собственных исследованиях продемонстрировано повышение уровня экспрессии большинства ММП, uPA и PAI-1 в опухолях у 70–90% больных с различными новообразованиями по сравнению с окружающими гистологически неизменными тканями. Показано, что ММП-7 является перспективным серологическим маркером рака яичников и рака толстой кишки (РТК): уровень его чувствительности при 70% специфичности составляет около 70% для обеих локализаций. Наибольший интерес с клинической точки зрения представляет использование опухоль-ассоциированных протеаз в качестве прогностических факторов. Так, по результатам 5-летнего наблюдения показано, что высокие предоперационные уровни ММП-7 и ТИМП-1 в плазме крови являются независимыми факторами неблагоприятного прогноза РТК, а при однофакторном анализе обнаружено также неблагоприятное прогностическое значение высокого содержания ММП-7 в опухолевой ткани больных с диссеминированным процессом. Значимым фактором прогноза РТК III стадии является уровень PAI-1 в опухоли. В заключительной части обзора рассмотрены возможности использования опухоль-ассоциированных протеаз в качестве мишеней для молекулярно-направленной терапии.

Ключевые слова: система активации плазминогена, матриксные металлопротеиназы, тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ, опухоли человека, диагностика, прогноз.

16

Общие представления о роли ключевых, ассоциированных с опухолью, протеолитических систем в инвазии и метастазировании

Способность к инвазии окружающих тканей и метастазированию в отдаленные органы — одно из фундаменталь-

ных свойств злокачественных опухолей. На всех этапах инвазии и метастазирования опухолевая клетка находится в тесном контакте с внеклеточным матриксом (ВКМ), поэтому одним из главных молекулярных механизмов, лежащих в основе этих процессов, считается разрушение окружающей базальной мембраны ВКМ-ассоциированными

E.S. Gershtein, N.E. Kushlinskii

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow, Russian Federation

Clinical Prospects of Tumor-Associated Proteases and Their Tissue Inhibitors Investigation in Oncologic Patients

Review of authors' results and the most representative literature data on the role of tumor-associated proteolytic systems involved in invasion, metastasizing and angiogenic processes in diagnostics and prognosis in various oncologic diseases is presented in this paper. The main attention is paid to the key matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) as well as to the plasminogen activation system components (uPA, PAI-1) study in tumor tissues and peripheral blood. Personal results demonstrated an increase of most MMPs, uPA and PAI-1 expression in the tumors of 70–90% patients with various neoplasms as compared to histologically unchanged adjacent tissues. MMP-7 was shown to be a promising serologic marker of ovarian and colorectal cancer (CRC): its sensitivity at 70% specificity level comprised about 70% in both diseases. The greatest clinical interest should be paid to the implication of tumor-associated proteases as prognostic factors. Thus, results of 5-years monitoring have demonstrated that high preoperative serum MMP-7 and TIMP-1 levels were independent unfavorable prognostic factors for CRC and univariate analysis revealed unfavorable prognostic role of high tumor MMP-7 in patients with disseminated process. Tumor PAI-1 level was shown to be a valuable prognostic factor for stage III CRC. In the final part of the review possibilities and prospects of tumor-associated proteases usage as targets for specific molecular directed therapy are discussed.

Key words: plasminogen activation system, matrix metalloproteinases, tissue matrix metalloproteinase inhibitors, human tumors, diagnostics, prognosis.

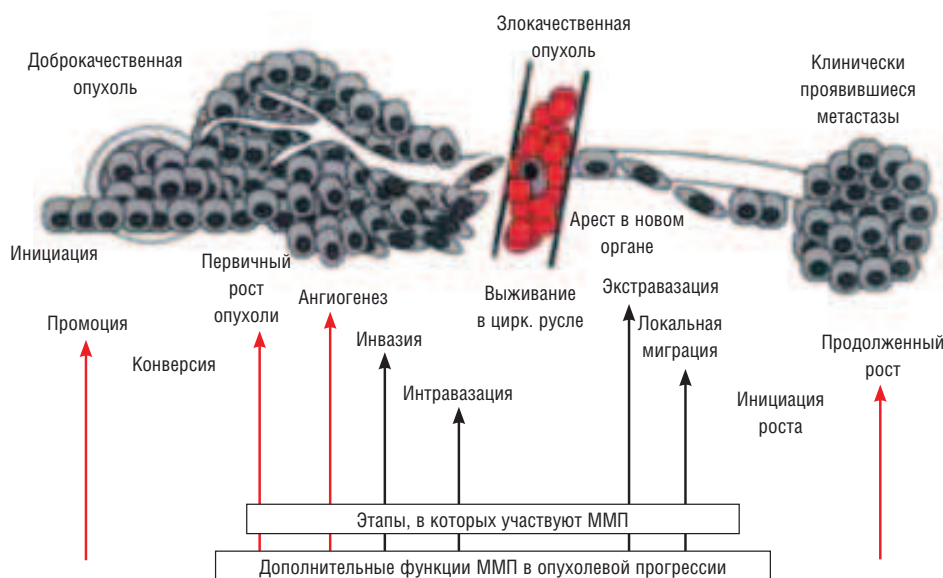


Рис. 1. Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) в опухолевой прогрессии [2].

с опухолью протеазами. Протеазы участвуют также в опухолевом ангиогенезе, способствуя распространению новых капиллярных сосудов. Дegrадация ВКМ — неотъемлемая часть не только опухолевой прогрессии, но и многих физиологических процессов, например, развития, роста и регенерации ткани. Однако в процессе канцерогенеза регуляторные пути, влияющие на деградацию ВКМ, как правило, нарушаются, и происходит патологическая экспрессия регуляторных белков, что помогает опухолевой клетке пройти все этапы метастазирования (рис. 1) [1, 2].

В настоящее время известно, что во все этапы прогрессирования опухолевого процесса вовлечены матриксные металлопротеиназы (ММП) — семейство, состоящее более чем из 20 секретируемых или связанных с поверхностью клетки цинк-зависимых эндопептидаз, способных к деградации практически всех компонентов ВКМ [3]. В зависимости от структурно-функциональных особенностей и субстратной специфичности ММП подразделяют на несколько подсемейств. Основными подсемействами ММП являются коллагеназы широкого спектра действия (например, ММП-1, 8, 13), желатиназы/специфические коллагеназы коллагена IV типа (ММП-2 и 9), стромелизины (например, ММП-3 и 10), матрилизины (ММП-7, ММП-26) и ММП мембранного типа [4, 5].

Активация ММП в межклеточном пространстве специфически подавляется эндогенными тканевыми ингибиторами (ТИМП), которые соединяются с цинк-связывающими участками активных ММП в эквимолярном соотношении. ТИМП образуют прочные комплексы как с активными формами ММП, так и с их секретируемыми проферментами, регулируя посредством этого их активность [6]. Семейство ТИМП состоит из 4 структурно родственных белков, 3 из которых — ТИМП-1, 2 и 4 — секретируются в растворимой форме, а 1 — ТИМП-3 — связан с ВКМ. ТИМП индуцируют изменения морфологии клетки, стимулируют рост некоторых типов клеток, участвуют в стероидогенезе и в развитии герминогенных клеток обоих полов. По своей структуре ТИМП высокоспецифичны к активному связывающему участку ММП (по принципу «ключ—замок») и ингибируют весь спектр ММП.

Роль ММП в прогрессии и метастазировании опухолей впервые была определена Liotta и соавт. в начале 1980-х гг., когда был обнаружен протеолиз коллагена IV типа в процессе инвазии и метастазирования меланомы кожи, и стало ясно, что он обусловлен главным образом протеолитической активностью ММП-2 и/или ММП-9 [7]. Первоначально предполагалось, что опухолевые клетки самостоятельно вырабатывают ММП, а стромальные клетки индуцируют секрецию ММП опухолями. Позднее была сформулирована концепция о том, что стромальные клетки сами также могут экспрессировать ММП. Анализ методом гибридизации *in situ* показал, что стромальные клетки экспрессируют ММП даже чаще, чем опухолевые [8, 9]. Выделение многих ММП клетками соединительной ткани, включая фибробласты и воспалительные клетки, является ответной реакцией на возникновение опухоли. Однако существуют исключения: например, матрилизин (ММП-7), как правило, экспрессируется эпителиальными клетками опухоли; в случае ММП-2 известно, что ее мРНК продуцируется преимущественно стромальными клетками, но сам фермент секретируется и активируется на границе опухолевой и нормальной ткани [10].

В экспериментальных исследованиях доказана взаимосвязь между повышением уровня экспрессии ММП опухолевыми и/или стромальными клетками с прогрессией, метастазированием и ангиогенезом [2, 11]. Для многих ММП и ТИМП продемонстрировано увеличение экспрессии в опухолях различного генеза, причем активация происходит по паракринному механизму с участием факторов роста и цитокинов, секретируемых инфильтрирующими опухоль макрофагами и лимфоцитами, а также клетками опухолевой стромы [2, 10]. В ряде ретроспективных клинических исследований отмечена повышенная экспрессия различных ММП в первичном опухолевом очаге и/или метастазах, ассоциированная со степенью дифференцировки опухоли, глубиной инвазии, развитием отдаленных метастазов, а также с плохим прогнозом и низкой выживаемостью больных с различными злокачественными новообразованиями [5, 10, 12]. В связи с этим различные представители семейства ММП рассматривают в настоящее время в качестве возмож-

ных биологических маркеров прогноза и лекарственной чувствительности злокачественных опухолей [13–21], а использование природных и синтетических ингибиторов ММП считается перспективным подходом к противоопухолевой терапии [2, 13].

В некоторых исследованиях также показано, что повышение содержания ММП в сыворотке/плазме крови онкологических больных коррелирует с активностью метастатического процесса и может рассматриваться как фактор неблагоприятного прогноза [22, 23]. В то же время известно, что растворимые ММП в периферической крови находятся в основном в форме профермента или в комплексе с природными ингибиторами, такими как ТИМП или α_2 -макроглобулин [24], поэтому повышенная экспрессия ММП часто сопровождается повышением уровня экспрессии соответствующих ТИМП [25], а функциональное значение циркулирующих в периферической крови ММП в прогрессии опухоли до конца не ясно.

Другая важная система, участвующая в регуляции инвазии и метастазирования, — протеолитический каскад активации плазминогена, играющий по отношению к системе ММП роль вышележащего эффектора [26]. В многоступенчатой цепочке протеаз, ведущей к разрушению внеклеточного матрикса, центральную роль играет активатор плазминогена урокиназного типа (uPA). Существенный вклад также вносит находящийся на поверхности клеток рецептор uPA, поскольку при связывании с ним способность uPA активировать плазминоген увеличивается. В целом процесс образования плазмина представляет собой циклическую амплификацию, регулируемую по механизму обратной связи (рис. 2). Помимо uPA в нем участвует также активатор тканевого типа (tPA), однако его роль при развитии опухолей, по-видимому, противоположна и сводится к разрушению опухолевых клеток и защите окружающих тканей. Активность uPA и tPA подавляется двумя белковыми ингибиторами, принадлежащими к семейству серпинов: PAI-1 и PAI-2. Полагают, что при опухолевом росте они также играют разную роль: PAI-1 защищает опухолевые клетки от саморазрушения, а PAI-2 тормозит протеолитические процессы во внеклеточном матриксе. Различные компоненты системы активации плазминогена могут находиться как на самих опухолевых клетках, так и на фибробластах стромы, инфильтрирующих опухоль лимфоцитах и макрофагах, эндоте-

альных клетках, поэтому можно считать, что процесс активации плазминогена носит преимущественно паракринный характер. Уровень и соотношение экспрессии компонентов системы активации плазминогена в опухолевой ткани может служить показателем метастатической и инвазивной активности опухоли, являясь вследствие этого биологически значимым фактором прогноза.

В многочисленных репрезентативных исследованиях продемонстрирована высокая прогностическая значимость uPA и PAI-1 при раке молочной железы (РМЖ): риск рецидивирования или метастазирования даже при ранних стадиях заболевания возрастает в 1,5–3 раза, если содержание этих белков превышает определенные пороговые значения [27]. Многофакторный анализ свидетельствует о том, что они являются независимыми факторами прогноза, причем уже имеется доказательная база I уровня: это проспективное рандомизированное кооперированное исследование, включившее около 600 больных с ранними стадиями РМЖ [28] и объединенный многофакторный анализ данных 18 исследовательских групп, включавший в целом 8377 больных [29]. В обоих исследованиях было показано, что высокие уровни uPA и PAI-1 являются независимыми факторами неблагоприятного прогноза, более значимыми, чем размер, степень злокачественности, рецепторный статус опухоли и возраст пациенток. В связи с этим их определение у больных с ранними стадиями РМЖ уже могло бы быть рекомендовано для определения подгрупп с повышенным риском рецидивирования и метастазирования, требующих более интенсивного лечения и наблюдения. В настоящее время проводится кооперированное многоцентровое исследование «NNBC 3-EuGore» [30, 31]. В него планируется вовлечь около 6000 пациенток, и по его результатам будет сделан окончательный вывод о целесообразности включения uPA и/или PAI-1 в схему обязательного обследования первичных больных РМЖ без метастазов в лимфатические узлы.

В некоторых клинико-лабораторных тестах, выполненных преимущественно иммуногистохимическим методом, продемонстрированы экспрессия uPA и PAI-1 в клетках рака толстой кишки (РТК) [32–35], а также присутствие растворимого рецептора uPA в сыворотке крови больных РТК [36, 37]. Показано, что uPA участвует в формировании сети новых сосудов в опухолях толстой кишки [38]. Также имеются указания на то, что наличие положительного окрашивания или высокая концентрация PAI-1 или uPA при количественном определении служат факторами неблагоприятного прогноза [26, 33, 39, 40]. В одной из ранних работ установлено [41], что наиболее значимым прогностическим фактором при РТК является отношение концентрации uPA в опухоли к концентрации tPA в окружающей слизистой оболочке толстой кишки.

Повышение уровня экспрессии компонентов системы активации плазминогена, в большей или меньшей степени взаимосвязанное с клиническими особенностями заболевания, отмечено и при некоторых других опухолях [27, 42]. Таким образом, являясь биологически значимыми факторами прогноза при различных новообразованиях, компоненты системы активации плазминогена могут стать мишенями молекулярно направленных антиметастатических препаратов, а для оценки перспективности их использования в клинической практике необходимо установить нозологические формы опухолей и группы больных, у которых можно ожидать наибольшего эффекта [43].

18

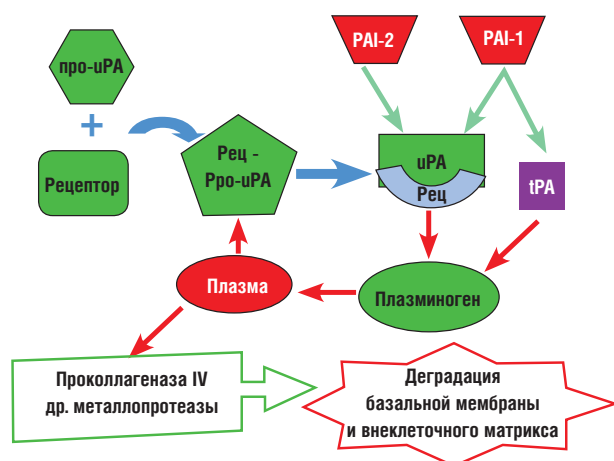


Рис. 2. Основные компоненты протеолитического каскада активации плазминогена.

Клиническое значение определения компонентов системы активации плазминогена в опухолях различных локализаций

Целью большого исследования, проведенного в лаборатории клинической биохимии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН в период с 1999 по 2005 г., была оценка роли uPA, PAI-1 и tPA при опухолях различных локализаций и их потенциального значения в качестве прогностических факторов и мишеней для новых схем противоопухолевой антиметастатической терапии. Все исследования проводились при сотрудничестве с соответствующими профильными клиническими отделениями и отделом патологической анатомии. Для определения концентрации изучаемых компонентов в цитозолях тканей использовали иммуноферментный «сэндвич»-анализ на основе 4 антител, разработанный в лаборатории эндокринологии Университета г. Наймеген (Нидерланды) [44].

Всего было обследовано 917 больных со злокачественными и доброкачественными опухолями различных локализаций: 102 больных РМЖ; 40 больных раком и 82 больных доброкачественными заболеваниями яичников; 58 больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ); 81 больной РТК; 97 больных раком желудка; 121 больная раком и 18 больных с гиперпластическими изменениями эндометрия; 44 больных раком пищевода; 65 больных опухолями и опухолеподобными поражениями костей различного гистологического строения; 40 больных раком слизистой оболочки полости рта; 44 больных меланомой и 19 — доброкачественными пигментными заболеваниями кожи; 44 больных раком и 102 пациента с аденомой и другими заболеваниями щитовидной железы. В большинстве случаев параллельно с опухолью была исследована гомологичная гистологически неизменная ткань.

Результаты детального анализа взаимосвязи изучаемых показателей с клиническими и морфологическими факторами прогноза для каждой локализации представлены в опубликованных ранее работах [45–56], поэтому в данной статье мы остановимся лишь на наиболее общих закономерностях и наиболее важных особенностях различных заболеваний.

Важнейшей общей закономерностью является тот факт, что значительное повышение тканевой концентрации uPA является практически универсальным свойством исследованных нами злокачественных опухолей. Причем не только в среднем, но и у каждого конкретного больного содержание uPA в опухоли, как правило, в несколько раз выше, чем в окружающей неизменной ткани. Аналогичные закономерности наблюдали и для PAI-1. Эти данные подтверждают теоретические представления о том, что усиление активации плазминогена по урокиназному типу способствует инвазивному росту, характерному для злокачественных опухолей. При этом опухолевые клетки эффективно защищают себя от саморазрушения за счет увеличения экспрессии ингибитора I-го типа. Изученные нами доброкачественные новообразования, как правило, имели промежуточные (между злокачественными опухолями и нормальными тканями) показатели концентрации uPA и PAI-1. Еще одной важной особенностью, характерной для большинства злокачественных опухолей, была положительная корреляционная взаимосвязь между уровнями uPA и PAI-1, а также положительная корреляция содержания uPA/PAI-1 и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в опухоли [49, 53].

Более сложную картину зафиксировали для tPA. Хотя средние концентрации этого белка в опухолевой ткани

обычно ниже, чем в окружающей, что соответствует его предполагаемой роли протектора нормальной ткани от прорастающих в нее опухолевых клеток, у отдельных больных достаточно часто можно было наблюдать и противоположное соотношение.

Таким образом, усиление экспрессии uPA и PAI-1 в опухолевой ткани происходит координировано и, как правило, не зависит от их уровня в окружающей неизменной ткани, в то время как экспрессия tPA в опухолях снижается независимо от изменений в экспрессии других компонентов системы активации плазминогена, но в определенной степени взаимосвязана с содержанием этого фермента в окружающей ткани.

Весьма разнообразно и неоднозначно оказалось соотношение изучаемых показателей со стадией заболевания и отдельными, формирующими ее индексами системы TNM. Так, при РМЖ отмечено 2 тенденции [51]: при относительно ранних стадиях заболевания (I–IIb) концентрации uPA и PAI-1 в опухолях возрастали с увеличением распространенности процесса, а при дальнейшем распространении процесса — снижались. Для tPA установлена противоположная тенденция: наибольшая концентрация этого фермента обнаружена в опухолях больных с I стадией, а наименьшая — в опухолях больных с IIIa стадией. По мере увеличения размера опухоли концентрация uPA постепенно снижалась от T₁ к T₄, а концентрация PAI-1 — достоверно увеличивалась от T₁ к T₃, но вновь снижалась при T₄. Концентрация tPA, напротив, достоверно снижалась при увеличении размеров опухоли от T₁ до T₃, но возрастала при T₄. Что касается статуса лимфатических узлов, то наибольшие концентрации uPA и PAI-1 и наименьшая концентрация tPA в первичной опухоли отмечены при единичных метастазах в подмышечные лимфатические узлы на стороне поражения (N₁).

При раке яичников достоверной корреляции концентрации uPA со стадией заболевания по классификации FIGO обнаружено не было. В то же время при изучении зависимости концентрации uPA от размера первичной опухоли наиболее высокие показатели зарегистрированы при опухолях среднего размера (от 5 до 20 см), что в определенной степени согласуется с гипотезой о наибольшем инвазивном потенциале опухолей на промежуточных стадиях распространения [52].

При НМРЛ мы не обнаружили достоверной взаимосвязи внутриопухолевых концентраций uPA, tPA и PAI-1 с клинической стадией, но при анализе взаимосвязи изучаемых показателей с отдельными индексами системы TNM оказалось, что уровни обоих активаторов плазминогена были достоверно выше в маленьких, неинвазивных опухолях (T₁), чем в более крупных (T₂–T₃), а концентрация PAI-1 не зависела от индекса T. С другой стороны, только содержание PAI-1 было достоверно повышено в первичных опухолях при множественных метастазах в лимфатические узлы (N₃).

В опухолях желудочно-кишечного тракта взаимосвязь концентрации uPA и PAI-1 со стадией заболевания также была неоднозначной. Так, при РТК эти показатели не зависели от стадии заболевания и были достоверно повышены по сравнению с нормальной слизистой оболочкой уже при относительно локализованном процессе (II стадия) [46]. В то же время при раке пищевода и uPA, и PAI-1 были достоверно повышены по сравнению с нормальной слизистой оболочкой только при распространенном процессе (III–IV стадия), при этом только уровень uPA был достоверно выше при IV по сравнению с более ранними стадиями [53]. При раке желудка I стадии и содержание uPA, и концентрация PAI-1 были

достоверно ниже, чем при более распространенном процессе, и практически не отличались от показателей неизменной слизистой оболочки [45].

В целом анализ взаимосвязи содержания компонентов системы активации плазминогена в опухолях с клинико-морфологическими особенностями заболевания подтверждает противоположную направленность изменений внутриопухолевой концентрации uPA и PAI-1 — с одной стороны, и tPA — с другой. При некоторых локализациях наибольшей инвазивностью и метастатическим потенциалом, если судить по уровню и соотношению изученных компонентов системы активации плазминогена, обладают опухоли на ранних этапах метастазирования. Отсутствие четкой взаимосвязи исследованных показателей с основными клинико-морфологическими факторами, характеризующими их инвазивную и метастатическую активность, не исключало их потенциальной роли в качестве независимых факторов прогноза выживаемости больных.

Действительно, сопоставив безрецидивную и общую выживаемость больных раком яичников с уровнем uPA в опухоли больше и меньше медианного значения (0,45 нг/мг белка), мы показали, что выживаемость больных с высоким уровнем uPA достоверно хуже, чем у больных с низким уровнем этого маркера. Показатель uPA сохранил свое прогностическое значение и при многофакторном анализе с использованием регрессионной модели Кокса с включением в число оцениваемых параметров также стадии заболевания, возраста и менопаузного статуса больных, гистологического типа и степени дифференцировки опухоли. Таким образом, uPA является важным прогностическим фактором для рака яичников, риск рецидива при его высокой концентрации в опухоли возрастает в 2,4 раза.

В ходе анализа выживаемости больных раком желудка в зависимости от содержания uPA пациенты были сначала разделены на 2 группы с использованием в качестве

порогового значения показателя медианы — 0,37 нг/мг белка. В первую группу вошли 52 больных с уровнем uPA выше медианы, во вторую — 45 пациентов с меньшим или равным медиане содержанием этого фермента в опухолевой ткани. Общая выживаемость пациентов первой группы была достоверно хуже, чем у больных второй группы (медианы выживаемости 13 и 17 мес, соответственно; $p < 0,05$). К концу первого года наблюдения в первой группе в живых оставались 53% пациентов, во второй — 61%. Общая 2-летняя выживаемость составила 20 и 22%, соответственно. Таким образом, различия в выживаемости наблюдались преимущественно в первый год после операции.

Оценена также выживаемость больных раком желудка в зависимости от содержания в опухолевой ткани PAI-1. Сначала все пациенты были также разделены на 2 группы на основании медианы концентрации данного ингибитора в опухоли (0,67 нг/мг белка). Общая выживаемость больных с уровнем PAI-1 больше медианы была достоверно меньше, чем у больных с более низким уровнем данного маркера: медианы составили 13 и 15 мес, соответственно.

На следующем этапе анализа больные были разделены на группы на основании показателя верхнего квартиля концентрации PAI-1 в опухолях (1,61 нг/мг белка). Анализ результатов наблюдения показал, что общая выживаемость пациентов с высоким уровнем PAI-1 в опухоли значительно хуже, чем у пациентов с низким уровнем маркера: медианы выживаемости — 10 и 17 мес, соответственно (рис. 3). Таким образом, при раке желудка значимым пороговым значением для uPA является показатель медианы, а для PAI-1 более показателен в прогностическом плане уровень верхнего квартиля.

Наиболее репрезентативные данные о прогностическом значении компонентов системы активации плазминогена получены для больных раком толстой кишки, которые были прослежены в течение более 10 лет после операции [57]. Пятилетняя выживаемость в общей группе пациентов составила 56%, 10-летняя — 49% (медиана выживаемости — 107 мес). В качестве пороговых значений первоначально мы рассматривали по 2 уровня для каждого маркера: показатель медианы и показатель верхнего квартиля концентрации в опухолевой ткани. Для uPA эти величины составили, соответственно, 1,38 и 2,91 нг/мг белка; для PAI-1 — 2,0 и 3,17 нг/мг белка; для tPA — 1,27 и 1,93 нг/мг белка. В общей группе пациентов достоверного влияния на выживаемость ни для одного из исследуемых маркеров не обнаружено, однако установлена выраженная тенденция к улучшению выживаемости пациентов с уровнем PAI-1 в опухоли ниже верхнего квартиля: 10-летняя выживаемость в этой группе составила 55%, а у пациентов с более высоким уровнем маркера — 27% ($p = 0,065$).

Далее мы отдельно проанализировали взаимосвязь изучаемых показателей с выживаемостью больных на различных клинических стадиях. В прослеженную группу вошли всего 2 пациента с I стадией заболевания и 4 — со II, все они оставались живы в течение всего периода наблюдения. Пятилетняя выживаемость больных с III стадией составила 65%, 10-летняя — 52% (медиана не достигнута). У больных с IV стадией как 5-, так и 10-летняя выживаемость достигла 30%, медиана — 25 мес.

Достоверное влияние на выживаемость больных РТК III стадии оказывал только уровень PAI-1 в опухоли: при содержании этого маркера равного или выше верхнего квартиля 10-летняя выживаемость пациентов была более

20

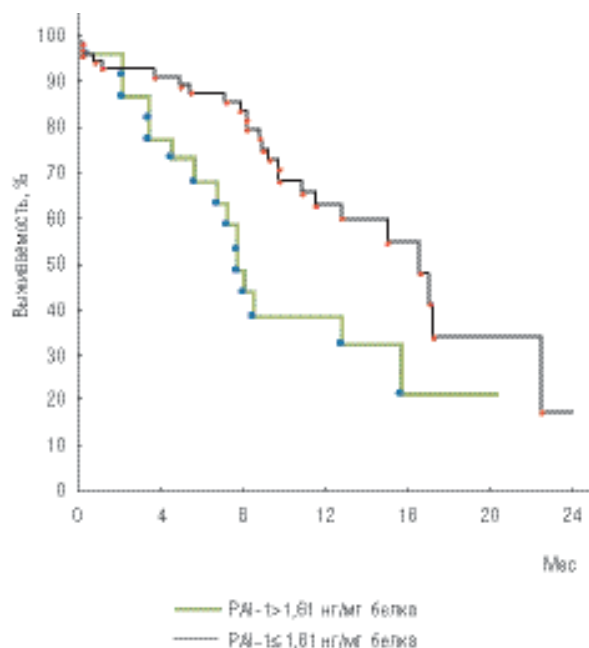


Рис. 3. Выживаемость больных раком желудка в зависимости от содержания PAI-1 в опухоли.

чем вдвое меньше, чем у пациентов с меньшим содержанием PAI-1. При этом если во всех остальных подгруппах медиана выживаемости либо не была достигнута за весь период наблюдения, либо превышала 100 мес, то в подгруппе больных с III стадией с уровнем PAI-1 $\geq 3,17$ нг/мг она составила всего 63 мес. Выживаемость больных с IV стадией достоверно не зависела от уровня экспрессии компонентов системы активации плазминогена в опухоли.

Дополнительно была проанализирована выживаемость пациентов с использованием в качестве пороговых значений уровней uPA и PAI-1, соответствующих верхней границе нормы (95% показателей неизменной слизистой оболочки; в обоих случаях — 4,0 нг/мг белка). Достоверных различий в зависимости от уровней uPA и в этом случае выявлено не было, а для PAI-1 выживаемость больных с высоким и низким уровнем маркера в опухоли различалась еще больше, чем при пороговом значении 3,17 нг/мг. При III стадии РТК 10-летняя выживаемость в подгруппе с низким уровнем PAI-1 составила 63%, а в подгруппе с высоким содержанием маркера в опухоли — всего 12%, медиана — 42 мес (рис. 4; $p=0,004$). При IV стадии РТК достоверных различий при этом пороговом значении обнаружено не было.

Поскольку в литературе приведены данные о том, что определенное влияние на выживаемость больных РТК может оказывать содержание компонентов системы активации плазминогена не только в опухоли, но и в окружающей неизменной слизистой оболочке [40], или соотношение различных показателей в опухоли и слизистой [41], нами проведен соответствующий анализ, в котором в качестве пороговых значений использовали медианные уровни соответствующих белков в неизменной слизистой оболочке. Достоверного влияния на выживаемость ни для одного из проанализированных параметров не обнаружено, однако как в общей группе пациентов, так и у больных с III стадией установлена выраженная тенденция к ухудшению выживаемости при низком уровне uPA (менее 0,24 нг/мг) в неизменной слизистой оболочке. Аналогичная закономерность продемонстрирована в работе Langenskiold и соавт. [40]. Соотношение уровней экспрессии uPA и tPA в самой опухоли, а также их соотношение в опухоли и неизменной слизистой оболочке толстой кишки не оказывало влияния на выживаемость исследованной нами группы больных.

При многофакторном анализе, включавшем основные клинико-морфологические характеристики РТК и исследованные биохимические показатели, прогностическое значение PAI-1 не сохранилось, независимыми прогностическими факторами оказались только стадия заболевания и степень дифференцировки опухоли.

Таким образом, анализ результатов собственных исследований и данных литературы свидетельствует о том, что наиболее перспективным для оценки прогноза различных онкологических заболеваний компонентом системы активации плазминогена можно считать PAI-1. При этом важно отметить, что содержание PAI-1 практически при всех исследованных локализациях достоверно повышено в опухолях по сравнению с окружающими гистологически неизменными тканями. Кроме того, высокая концентрация этого ингибитора в опухолевой ткани не только не снижает агрессивность, но и ухудшает течение заболевания у больных РТК, раком желудка и РМЖ. Эти клинические наблюдения подтверждают гипотезу о том, что при опухолевом росте PAI-1 защищает опухолевые клетки от саморазрушения под действием ассоциированных с ними протеаз.

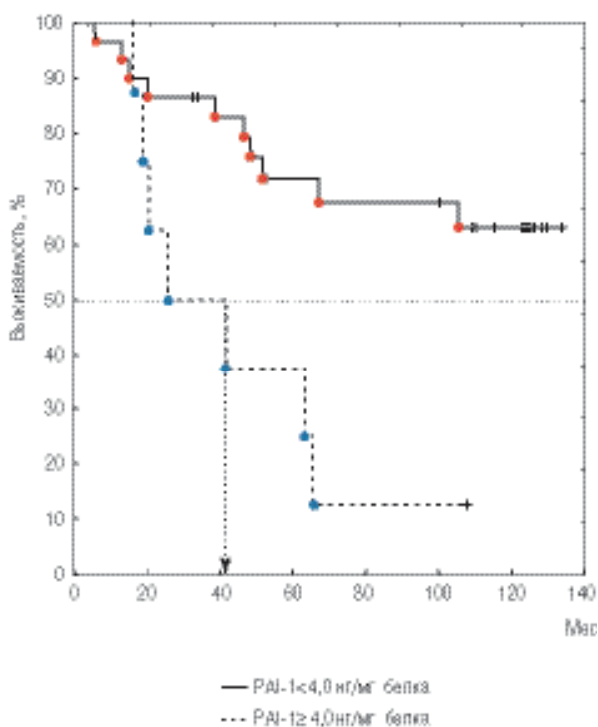


Рис. 4. Общая выживаемость больных раком толстой кишки III стадии в зависимости от содержания PAI-1 в опухоли. В качестве порогового значения использована величина верхней границы нормы. Стрелка указывает величину медианы выживаемости.

Клиническое значение определения содержания матричных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в опухолях и плазме/сыворотке крови больных с различными новообразованиями

В 2005 г. нами было начато новое исследование, цель которого состоит в сравнительной оценке содержания различных ММП и их тканевых ингибиторов в опухолях, окружающей гистологически неизменной ткани и плазме или сыворотке крови больных с различными онкологическими заболеваниями в зависимости от их клинико-морфологических особенностей для выявления наиболее перспективных прогностических и диагностических биологических маркеров.

К настоящему времени обследовано 102 больных опухолями яичников (67 — злокачественными, 11 — пограничными и 24 — доброкачественными) [58–60]; 99 больных РТК [61–64]; 95 — с раком желудка [65]; 45 — с РМЖ [66]; 54 — с опухолями и опухолеподобными поражениями костей [67]. У больных РТК, РМЖ и раком желудка параллельно с опухолью исследовали участок гистологически неизменной гомологичной ткани. Контрольную группу при исследовании показателей периферической крови в различных исследованиях составили от 10 до 40 практически здоровых доноров. Содержание маркеров в плазме или сыворотке крови и в лизатах тканей определяли стандартными наборами для прямого иммуноферментного анализа производства компаний «R&D Systems» и «Invitrogen» (США).

При исследовании тканевого содержания ММП наиболее часто отмечалось увеличение содержания ММП-7: концентрация этой протеиназы была повышена в опухо-

лях по сравнению с окружающей гистологически неизменной тканью у 88% больных РТК, у 70% больных раком желудка и у 76% больных РМЖ. Содержание ММП-7 также было достоверно выше в ткани рака яичников по сравнению с доброкачественными и пограничными опухолями. При сравнении опухолей и гистологически неизменных тканей при всех исследованных локализациях также обнаружено повышение уровня экспрессии ММП-2 у 90% больных РТК, у 80% больных раком желудка и у 91% больных РМЖ. В то же время при исследовании новообразований яичников установлена противоположная закономерность: уровень ММП-2 в доброкачественных опухолях оказался достоверно более высоким, чем в пограничных и злокачественных. У больных РТК и раком желудка достоверно повышена также и концентрация ММП-9 в опухолевой ткани. Продемонстрировано увеличение содержания ММП-3, ММП-13, ТИМП-1 и ТИМП-2 в опухолях больных РТК по сравнению с гистологически неизменной слизистой оболочкой толстой кишки. Однозначной взаимосвязи внутриопухолевых концентраций ММП и ТИМП с клинико-морфологическими особенностями исследованных онкологических заболеваний, характеризующих их инвазивный и метастатический потенциал и являющихся значимыми факторами прогноза, проследить не удалось.

22

Таким образом, увеличение экспрессии ММП-7, которая помимо разрушения компонентов внеклеточного матрикса участвует также в процессинге некоторых биологически важных молекул клеточной поверхности и в отличие от других ММП синтезируется преимущественно опухолевыми клетками, следует признать наиболее универсальным изменением в системе ММП-зависимого протеолиза, характерным для опухолей различного гистогенеза.

ММП-7 оказалась и перспективным серологическим маркером всех исследованных нами опухолей за исключением РМЖ. Ее содержание в сыворотке или плазме крови достоверно повышено у больных раком яичников, толстой кишки и желудка по сравнению с контрольной группой, а при раке яичников оно повышено также и по сравнению с показателями больных доброкачественными и пограничными опухолями. В наибольшей степени значение ММП-7 как серологического маркера проявилось при новообразованиях яичников: превышение верхней границы нормы (95% показателей контрольной группы — менее 4,67 нг/мл) отмечено у 38 из 49 первичных больных раком, т.е. чувствительность относительно контроля при 95% специфичности составила 78%. Чувствительность этого теста относительно доброкачественных и пограничных новообразований составила, соответственно, 37,5 и 64%. Кроме того, уровень ММП-7 в сыворотке крови достоверно положительно коррелировал с ключевыми показателями распространенности рака яичников: стадией заболевания по классификации FIGO, размером первичной опухоли по данным ультразвукового исследования, наличием и характером диссеминации по брюшине и метастазов в большом сальнике, наличием и объемом асцита, а также с уровнем классического сывороточного маркера рака яичников СА-125. В то же время при РТК оптимальное соотношение специфичности (70%) и чувствительности (71%) отмечено при использовании порогового уровня 1,8 нг/мл, а попытки увеличить специфичность за счет увеличения порогового значения до 95% процентиля нормы резко снижали чувствительность теста при данном заболевании.

Концентрации других ММП и ТИМП в сыворотке/плазме крови обследованных пациентов были либо недо-

стверно повышены, либо снижены (ММП-2 и ТИМП-2 — при раке яичников, ТИМП-1 — при РТК, ММП-9 — при раке желудка) по сравнению с показателями группы контроля. Значимых ассоциаций с клинико-морфологическими критериями распространенности процесса и прогноза заболеваний для большинства из них также не обнаружено.

Одной из важных задач нашего исследования было решение вопроса, в какой мере изменение продукции ММП и ТИМП в опухолевой ткани отражается на их концентрации в периферической крови. В общей группе больных новообразованиями яичников удалось установить не сильные, но достоверные положительные корреляции содержания всех трех ММП в сыворотке крови и опухолевой ткани (для ММП-2 — $r=0,31$, $p=0,020$; для ММП-7 — $r=0,29$, $p=0,006$; для ММП-9 — $r=0,24$, $p=0,019$), усилившиеся для ММП-7 и ММП-9 в группе больных раком ($r=0,35$; $p=0,022$ и $r=0,36$; $p=0,020$, соответственно) и не проявившиеся у больных доброкачественными и пограничными новообразованиями яичников. Таким образом, можно предположить, что у больных раком яичников концентрация ММП-7 и -9 в периферической крови в определенной степени отражает уровень экспрессии этих белков в опухолевой ткани, а при доброкачественных и пограничных новообразованиях яичников сывороточные ММП, скорее всего, имеют неопухолевое происхождение. У больных РТК положительная корреляция циркулирующих и внутриопухолевых концентраций обнаружена только для ММП-9, а у больных раком желудка — только для ММП-7; у больных РМЖ значимых корреляций не обнаружено.

У больных РТК и РМЖ кровь на исследование брали дважды: до начала лечения и через 5–27 сут после операции. После удаления опухоли происходили разнонаправленные изменения содержания маркеров у отдельных больных; результирующие этих изменений также были разнообразны. Так, уровень ММП-7 в плазме крови больных РТК после удаления первичной опухоли достоверно превышал дооперационный показатель и еще более увеличивался по сравнению с нормальным значением. Содержание ТИМП-1 у этих пациентов снижалось, что для данного показателя соответствовало нормализации, а концентрации ММП-9 и ММП-2 в плазме крови после удаления первичной опухоли не отличались от предоперационных. У больных РМЖ исходно сниженный по сравнению с контролем уровень ММП-9 в сыворотке крови повысился после операции у 85% больных, концентрации других маркеров достоверно не изменялись. В целом характер изменений содержания ММП и ТИМП в периферической крови онкологических больных после удаления первичной опухоли свидетельствует о неопухолевом происхождении по крайней мере части циркулирующих белков.

Как и при исследовании компонентов системы активации плазминогена, отсутствие четкой взаимосвязи содержания ММП и ТИМП в опухолях с ключевыми клинико-морфологическими характеристиками не исключало их потенциальной роли в качестве независимых факторов прогноза выживаемости больных. Перспективными в плане прогнозирования исхода болезни могли стать и концентрации этих маркеров в периферической крови.

К настоящему времени нам удалось проанализировать прогностическое значение исследованных показателей у больных РТК, которые были прослежены в течение более 5 лет [64, 68]. Всего за это время умерло 24 из 99 больных, 5-летняя выживаемость составила 76,8%, медиана выживаемости достигнута не была. Для 54 пациентов

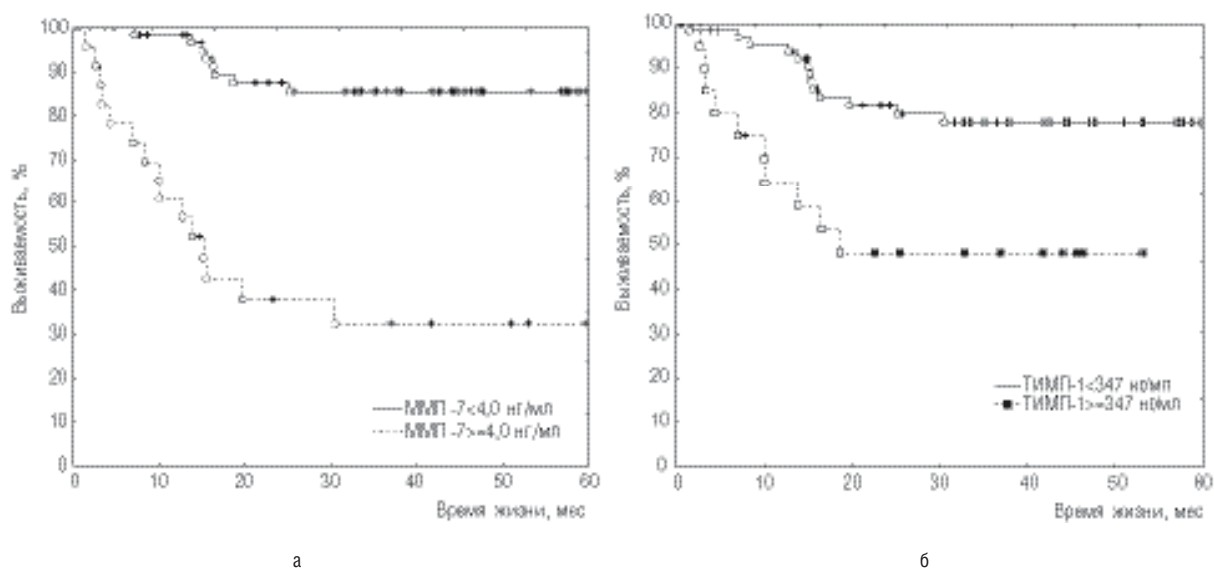


Рис. 5. Выживаемость больных раком толстой кишки в зависимости от содержания ММП-7 (а) и ТИМП-1 (б) в плазме крови.

удалось получить информацию о наличии или отсутствии рецидива. Всего было зарегистрировано 13 рецидивов (5-летняя выживаемость — 70%), что было недостаточным для дальнейшего статистического анализа безрецидивной выживаемости в отдельных подгруппах.

В качестве дискриминационных уровней для оценки влияния ММП/ТИМП на общую выживаемость пациентов были выбраны показатели верхних квартилей исследованной выборки. Оказалось, что уровень экспрессии данных маркеров в опухоли (пороговые значения для ММП-2 — 54,4, для ММП-7 — 7,8, для ММП-9 — 169, для ТИМП-1 — 169 нг/мг белка) достоверно не влияет на выживаемость в общей группе пациентов, однако высокостатистическое влияние на выживаемость больных РТК оказывали показатели ММП-7 ($p = 0,00001$) и ТИМП-1 ($p = 0,009$) в плазме крови, взятой до оперативного вмешательства (рис. 5). При этом высокие концентрации обоих маркеров оказались факторами неблагоприятного прогноза: при содержании ММП-7 равном или выше 4,0 нг/мл 5-летняя выживаемость пациентов составила 32,6% (медиана — 15 мес), а при более низком содержании этого маркера — 85,8%. Для ТИМП-1 соответствующие показатели в подгруппах с высоким и низким уровнем (пороговое значение — 347 нг/мл) составили 48,5 (медиана — 18,3 мес) и 77,6%. Таким образом, при анализе всей группы пациентов без учета их клинико-морфологических особенностей наиболее значимым прогностическим фактором оказался предоперационный уровень ММП-7 в плазме крови.

Интересно отметить, что прогноз РТК достоверно зависел и от характера изменения концентрации ММП-7 в плазме крови после удаления опухоли: он был более благоприятным у тех пациентов, у которых уровень маркера после операции возрастал (5-летняя выживаемость 80% по сравнению с 57% у больных со снизившимся уровнем ММП-7). Можно предположить, что содержание ММП-7 снижается после операции в том случае, когда соответствующий белок в плазме крови имеет преимущественно опухолевое происхождение, и именно у таких пациентов ухудшается прогноз заболевания.

Далее было изучено, каким образом концентрация ММП и ТИМП в плазме крови и опухоли влияет

на выживаемость в подгруппах с различной распространенностью опухолевого процесса. Для этого пациенты были разделены на 3 подгруппы: 1-я — пациенты без метастазов ($T_{1-4}N_0M_0$; $n = 41$); 2-я — больные с метастазами только в лимфатические узлы ($T_{1-4}N_+M_0$; $n = 23$); 3-я — больные с диссеминированным процессом ($T_{1-4}N_{0+}M_+$; $n = 23$).

В 1-й подгруппе общая 5-летняя выживаемость составила 91%. При исследовании взаимосвязи с маркерами достоверные различия установлены только для подгрупп с различным уровнем ММП-7 в плазме крови, причем кумулятивная 5-летняя выживаемость больных с низким содержанием ММП-7 составила 100%, а выживаемость пациентов с высоким уровнем маркера — всего 60% ($p = 0,0003$). Всего за время наблюдения умерли 3 пациента этой подгруппы, и все они имели высокое содержание ММП-7 в плазме крови. Во 2-й подгруппе (общая выживаемость — 74%) ни один из маркеров не оказывал значимого влияния на выживаемость. В то же время выживаемость больных с диссеминированным процессом зависела не только от концентрации ММП-7 в плазме крови, но и от содержания этой протеазы в опухоли. В подгруппе с низким содержанием ММП-7 в опухоли (менее 7,8 нг/мг белка) медиана выживаемости составила 19,6 мес, а при уровне ММП-7 выше этого значения — 9,2 мес (рис. 6; $p = 0,03$).

У пациентов с высокой концентрацией ММП-7 в плазме крови умерли или выбыли из наблюдения в течение первых 2 лет после циторедуктивной операции, и их 2-летняя выживаемость составила всего 12% (медиана — 8 мес), а выживаемость пациентов с низкой концентрацией ММП-7 в плазме была равна 65% ($p = 0,007$) и приближалась к показателям радикально оперированных больных без отдаленных метастазов. У больных диссеминированным РТК проявилось и прогностическое значение содержания ТИМП-1 в плазме крови: при низком уровне маркера медиана выживаемости не была достигнута, а при высоком она составила всего 10 мес; 2-летняя выживаемость, соответственно, — 57 и 11% ($p = 0,01$). В целом 5-летняя выживаемость обследованных больных диссеминированным раком составила 37%, медиана — 17 мес.

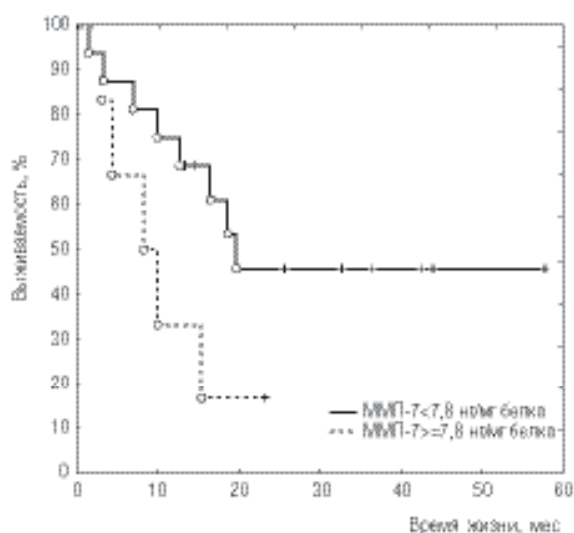


Рис. 6. Выживаемость больных диссеминированным раком толстой кишки в зависимости от содержания ММП-7 в опухоли.

24

При многофакторном анализе, включавшем стадию заболевания, локализацию, гистологическое строение (степень дифференцировки), глубину инвазии опухоли, наличие лимфогенных или отдаленных метастазов, а также все исследованные биохимические показатели, концентрации ММП-7 и ТИМП-1 в плазме крови оказались независимыми факторами прогноза общей выживаемости больных РТК наряду с показателем отдаленного метастазирования.

Матричные металлопротеиназы и компоненты системы активации плазминогена как потенциальные мишени для таргетной терапии

На экспериментальных моделях разработано несколько подходов к использованию ММП в качестве мишеней для противоопухолевой терапии:

- блокирование синтеза ММП;
- подавление взаимодействия ММП с молекулами, направляющими их к клеточной поверхности и межклеточному пространству;
- ингибирование ферментативной активности ММП.

Прямое подавление синтеза ММП осуществляется с помощью трансфекции в клетки антисмысловых (ас) мРНК или олигонуклеотидов. В частности, показано, что антисмысловая мРНК к ММП-9 снижает инвазивность культивируемых клеток рака яичников и их прикрепление к поверхностям, покрытым фибронектином [69]. Использование ас-мРНК против ММП-7 снижало количество этого фермента в культивируемых клетках рака яичников и подавляло их инвазию, индуцированную лизофосфатидиловой кислотой [70]. Ас-мРНК против мембранной ММП 1-го типа подавляли не только инвазию, но и пролиферацию культуры клеток рака яичников SW626 [71, 72]. Однако вопрос о возможности использования подобных технологий в клинической практике пока остается открытым. Кроме того, на уровень экспрессии ММП могут опосредованно повлиять препараты, направленные на передачу сигналов различных тирозинкиназных рецепторов (факторов роста, цитокинов) [73]. Так, установлено, что в регуляции экспрессии и активности ММП в клет-

ках рака яичников участвуют такие сигнальные системы, как PI3K/Akt [74–77], Raf/Ras [78], циклооксигеназная [79] и др.

Подавление взаимодействия ММП с белками клеточной поверхности также может заблокировать важные для инвазии проявления их активности в межклеточном пространстве. Перспективной мишенью в этом плане является взаимодействие с интегринами и кадгеринами, способствующее слущиванию клеток рака яичников с поверхности опухоли, их диссеминации по брюшине и образованию асцита [80–82].

Ингибирование ферментативной активности ММП — самый прямой путь влияния на их проинвазивную и прометастатическую активность. Первоначально наиболее очевидным подходом представлялось использование их природных тканевых ингибиторов. В экспериментальных исследованиях был даже продемонстрирован противоопухолевый эффект ТИМП-2 и ТИМП-4 [83, 84], однако возможности системного введения ТИМП ограничены тем, что они обладают независимой от ММП проангиогенной и проангиогенной активностью [6, 11, 24]. В связи с этим разрабатывают синтетические высокоспецифичные ингибиторы ММП (большинство из них — производные гидроксамовой кислоты), которые могли бы достигать эффективных концентраций в крови и вызывать регрессию опухоли. Клинические испытания проводили 5 ингибиторов ММП [22]: маримастат — исследовался при ранних стадиях рака поджелудочной железы; BMS-275291 — при прогрессирующем немелкоклеточном раке легкого; приномастат — при ранних стадиях различных солидных опухолей; метастат (тетрациклиновые ингибиторы ММП) — при саркоме Капоши; неовастат — при неоперабельном раке почки. Однако при применении этих препаратов возникло много различных проблем. Уже ранние исследования I фазы показали, что длительное введение ингибиторов ММП сопряжено с появлением мышечных болей у 30% больных и воспалительных процессов, которые не наблюдались в доклинических исследованиях. Маримастат и приномастат показали минимальный эффект у больных с диссеминацией. Клинические испытания VAY-129566 были прекращены на ранних этапах из-за низкой выживаемости больных. Следует также отметить, что ингибиторы ММП — цитостатические препараты, и их биологическая активность во II фазе клинических испытаний определялась не по уменьшению размеров опухоли, а по снижению темпов возрастания концентрации опухолевых маркеров в сыворотке крови больных (в частности, для маримастата). Большинство препаратов сразу после испытаний I фазы изучали во II/III фазе без проведения исследований на небольших группах больных. Возможно, именно по этим причинам результаты III фазы клинических испытаний ингибиторов ММП оказались неудовлетворительными. В большинстве испытаний данные препараты оказались неэффективными, а в ряде случаев даже ухудшали результаты химиотерапии.

Предполагается, что неэффективность синтетических ингибиторов ММП может объясняться либо включением в исследование больных на поздних стадиях опухолевого процесса, либо тем, что препараты имели низкую специфичность и, возможно, ингибировали и ММП с собственной противоопухолевой активностью, либо высокой частотой ревматоидоподобных воспалительных реакций, что ограничивало возможность продолжить лечение препаратом в эффективных дозах. Осложнения имели обратимый характер, но ограничивали возможность использования доз, продемонстрировавших эффективность

в доклинических исследованиях, поэтому в последующем их пришлось снизить. До сих пор остается нерешенным и вопрос о том, какие ММП связаны с появлением побочных реакций (мышечные боли), а какие являются мишенью для противоопухолевой терапии.

В настоящее время разрабатывают ингибиторы ММП следующего поколения, обладающие высокой специфичностью к ММП одного типа [85]. Кроме того, изучение спектра, уровня и соотношения экспрессии различных видов ММП и их тканевых ингибиторов, их биологического и прогностического значения может также оказать-

ся полезным для разработки и эффективного применения новых ингибиторов ММП, специфичных для опухолей определенной локализации и/или для конкретного больного.

Компоненты системы активации плазминогена, в первую очередь uPA, также рассматривают в качестве возможных мишеней противоопухолевой терапии [86], однако прямое ингибирование этих ферментов может привести к серьезным побочным эффектам, т.к. они играют важную роль в системе свертывания крови, участвуя в фибринолизе.

REFERENCES

1. Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM: Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* 2008, 214(3):283–293.
2. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000, 18(5):1135–1149.
3. Malesud CJ: Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006, 11:1696–1701.
4. Visse R, Nagase H: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003, 92(8):827–839.
5. Westermarck J, Kahari VM: Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999, 13(8):781–792.
6. Ramnath N, Creaven PJ: Matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Oncol Rep* 2004, 6(2):96–102.
7. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980, 284(5751):67–68.
8. Furuya M, Ishikura H, Nemori R, Shibata M, Fujimoto S, Yoshiki T: Clarification of the active gelatinolytic sites in human ovarian neoplasms using in situ zymography. *Hum Pathol* 2001, 32(2):163–168.
9. Kamat AA, Fletcher M, Gruman LM, Mueller P, Lopez A, Landen CN, Jr., Han L, Gershenson DM, Sood AK: The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006, 12(6):1707–1714.
10. Deryugina EI, Quigley JP: Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006, 25(1):9–34.
11. Deryugina EI, Quigley JP: Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions. *Biochim Biophys Acta* 2010, 1803(1):103–120.
12. Duffy MJ: Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res* 1996, 2(4):613–618.
13. Zucker S, Vacirca J: Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004, 23(1–2):101–117.
14. Collins HM, Morris TM, Watson SA: Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinases and membrane type-1-matrix metalloproteinase. *Br J Cancer* 2001, 84(12):1664–1670.
15. Chan CC, Menges M, Orzechowski HD, Orendain N, Pistorius G, Feifel G, Zeitz M, Stallmach A: Increased matrix metalloproteinase 2 concentration and transcript expression in advanced colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis* 2001, 16(3):133–140.
16. Damodharan U, Ganesan R, Radhakrishnan UC: Expression of MMP2 and MMP9 (gelatinases A and B) in human colon cancer cells. *Appl Biochem Biotechnol* 2011, 165(5–6):1245–1252.
17. Higashiguchi T, Hotta T, Takifuji K, Yokoyama S, Matsuda K, Tominaga T, Oku Y, Yamaue H: Clinical impact of matrix metalloproteinase-7 mRNA expression in the invasive front and inner surface of tumor tissues in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2007, 50(10):1585–1593.
18. Hong SW, Kang YK, Lee B, Lee WY, Jang YG, Paik IW, Lee H: Matrix metalloproteinase-2 and -7 expression in colorectal cancer. *J Korean Soc Coloproctol* 2011, 27(3):133–139.
19. Hurst NG, Stocken DD, Wilson S, Keh C, Wakelam MJ, Ismail T: Elevated serum matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) concentration predicts the presence of colorectal neoplasia in symptomatic patients. *Br J Cancer* 2007, 97(7):971–977.
20. Islekel H, Oktay G, Terzi C, Canda AE, Fuzun M, Kupelioglu A: Matrix metalloproteinase-9,-3 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables. *Cell Biochem Funct* 2007, 25(4):433–441.
21. Delektorskaya V.V., Perevoshchikov A.G., Golovkov D.A., Kushlinskii N.E. Prognostic significance of matrix metalloproteinase expression in colon adenocarcinomas and their metastases. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine - Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 2007, 143(4):434–438.
22. Egeblad M, Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002, 2(3):161–174.
23. Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo MS, Kellokumpu-Lehtinen P, Kahari VM, Pyrhonen S: High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2005, 11(14):5158–5166.
24. Baker AH, Edwards DR, Murphy G: Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002, 115(Pt 19):3719–3727.
25. Jumper C, Cobos E, Lox C: Determination of the serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in patients with either advanced small-cell lung cancer or non-small-cell lung cancer prior to treatment. *Respir Med* 2004, 98(2):173–177.
26. Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ: Plasminogen activator system, vascular endothelial growth factor, and colorectal cancer progression. *Mol Pathol* 2000, 53(6):307–312.
27. Duffy MJ, Duggan C: The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin Biochem* 2004, 37(7):541–548.
28. Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M: Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93(12):913–920.
29. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Ferno M, Eppenberger-Castori S et al: Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2002, 94(2):116–128.
30. Schmidt M, Victor A, Bratzel D, Boehm D, Cotarello C, Lebrecht A, Siggelkow W, Hengstler JG, Elsasser A, Gehrman M et al: Long-term outcome prediction by clinicopathological risk classification algorithms in node-negative breast cancer—comparison between Adjuvant!, St Gallen, and a novel risk algorithm used in the prospective randomized Node-Negative-Breast Cancer-3 (NNBC-3) trial. *Ann Oncol* 2009, 20(2):258–264.
31. Annecke K, Schmitt M, Euler U, Zerm M, Paepke D, Paepke S, von Minckwitz G, Thomssen C, Harbeck N: uPA and PAI-1

- in breast cancer: review of their clinical utility and current validation in the prospective NNBC-3 trial. *Adv Clin Chem* 2008, 45:31–45.
32. Fujii T, Obara T, Tanno S, Ura H, Kohgo Y: Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 as a prognostic factor in human colorectal carcinomas. *Hepatogastroenterology* 1999, 46(28):2299–2308.
 33. Herszenyi L, Farinati F, Cardin R, Istvan G, Molnar LD, Hritz I, De Paoli M, Plebani M, Tulassay Z: Tumor marker utility and prognostic relevance of cathepsin B, cathepsin L, urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, CEA and CA 19-9 in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2008, 8:194.
 34. Baker EA, Leaper DJ: The plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in colorectal cancer: relationship to tumour pathology. *Eur J Cancer* 2003, 39(7):981–988.
 35. Kim TD, Song KS, Li G, Choi H, Park HD, Lim K, Hwang BD, Yoon WH: Activity and expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinases in human colorectal cancer. *BMC Cancer* 2006, 6:211.
 36. Fernebro E, Madsen RR, Ferno M, Brunner N, Bendahl P, Christensen IJ, Johnson A, Nilbert M: Prognostic importance of the soluble plasminogen activator receptor, suPAR, in plasma from rectal cancer patients. *Eur J Cancer* 2001, 37(4):486–491.
 37. Herszenyi L, Istvan G, Cardin R, De Paoli M, Plebani M, Tulassay Z, Farinati F: Serum cathepsin B and plasma urokinase-type plasminogen activator levels in gastrointestinal tract cancers. *Eur J Cancer Prev* 2008, 17(5):438–445.
 38. Zlobec I, Holler S, Tornillo L, Terracciano L, Lugli A: Combined histomorphologic and immunohistochemical phenotype to predict the presence of vascular invasion in colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2009, 52(6):1114–1121.
 39. Minoo P, Baker K, Baumhoer D, Terracciano L, Lugli A, Zlobec I: Urokinase-type plasminogen activator is a marker of aggressive phenotype and an independent prognostic factor in mismatch repair-proficient colorectal cancer. *Hum Pathol* 2010, 41(1):70–78.
 40. Langenskiold M, Holmdahl L, Angenete E, Falk P, Nordgren S, Ivarsson ML: Differential prognostic impact of uPA and PAI-1 in colon and rectal cancer. *Tumour Biol* 2009, 30(4):210–220.
 41. Verspaget HW, Sier CF, Ganesh S, Griffioen G, Lamers CB: Prognostic value of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995, 31A(7-8):1105–1109.
 42. Begum FD, Hogdall CK, Kjaer SK, Christensen L, Blaakaer J, Bock JE, Glud E, Hoyer-Hansen G, Ring-Larsen H, Hogdall EV: The prognostic value of plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) levels in stage III ovarian cancer patients. *Anticancer Res* 2004, 24(3b):1981–1985.
 43. Jacobsen B, Ploug M: The urokinase receptor and its structural homologue C4.4A in human cancer: expression, prognosis and pharmacological inhibition. *Curr Med Chem* 2008, 15(25):2559–2573.
 44. Grebenshikov N, Geurts-Moespot A, De Witte H, Heuvel J, Leake R, Sweep F, Benraad T: A sensitive and robust assay for urokinase and tissue-type plasminogen activators (uPA and tPA) and their inhibitor type I (PAI-1) in breast tumor cytosols. *Int J Biol Markers* 1997, 12(1):6–14.
 45. Gershtein E.S., Shcherbakov A.M., Kaz'min A.I., Ognerubov N.A., Kushlinskii N.E.: Urokinase and tissue type plasminogen activators and their type I inhibitor PAI-1 in gastric cancer. *Problems in oncology - Voprosy onkologii* 2003, 49(2):165–169.
 46. Gershtein E.S., Prorokov V.V., Golubchenko O.V., Kushlinskii N.E.: Urokinase and tissue type plasminogen activators and their type I inhibitor PAI-1 in colon cancer: correlation with the main clinico-morphological factors. *Journal of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS - Vestnik Rossiiskogo onkologicheskogo nauchnogo tsentra im. N.N. Blokhina RAMN* 2002; 2:31–36.
 47. Gershtein E.S., Medvedeva S.V., Babkina I.V., Kushlinskii N.E., Trapeznikov N.N.: Urokinase and tissue type plasminogen activators and their type I inhibitor PAI-1 in melanomas and benign pigmented skin lesions. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine - Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 2001, 132(7):71–76.
 48. Gershtein E.S., Kushlinskii N.E., Talaeva Sh.Zh., Sandybaev M.N.: Role of the plasminogen activation system in human tumors. *Molecular medicine - Molekulyarnaya meditsina* 2007; 1:4–8.
 49. Gershtein E.S., Gritsaenko E.V., Shcherbakov M.E., Shcherbakov A.M., Ognerubov N.A., Kushlinskii N.E.: Vascular endothelial growth factor and plasminogen activation system components in endometrial carcinoma and hyperplasia. *Problems in oncology - Voprosy onkologii* 2003, 49(6):725–729.
 50. Gershtein E.S., Kushlinskii N.E.: Urokinase and tissue type plasminogen activators and their type I inhibitor PAI-1 in human tumors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine - Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 2001, 131(1):81–87.
 51. Gershtein E.S., Mamedov U.R., Kostyleva O.I., Kushlinskii N.E.: The immunoenzyme determination of plasminogen activators and their inhibitor in breast tumors: the connection to clinico-morphological prognostic factors. *Clinical laboratory diagnostics - Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2000; 3:16–21.
 52. Gershtein E.S., Nikogosyan S.O., Kozachenko V.P., Kushlinskii N.E.: Urokinase -type plasminogen activator in ovarian tumors: relationship with clinico-morphological factors and prognosis. *Journal of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS - Vestnik Rossiiskogo onkologicheskogo nauchnogo tsentra im. N.N. Blokhina RAMN* 2001; 1:30–35.
 53. Gershtein E.S., Shcherbakov A.M., Goncharov D.Yu., Poddubnaya I.V., Kushlinskii N.E.: Plasminogen activation system components in esophageal cancer: relationship with main clinico-morphological factors. *Journal of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS - Vestnik Rossiiskogo onkologicheskogo nauchnogo tsentra im. N.N. Blokhina RAMN* 2002; 4:20–24.
 54. Kushlinskii N.E., Kazantseva I.A., Gershtein E.S., Khartidi T.Yu., Lyakina L.T., Kalinin A.P.: Urokinase and tissue type plasminogen activators and their inhibitor in thyroid gland diseases. *The Problems of Endocrinology - Problemy endokrinologii* 2004, 50(3):25–29.
 55. Kushlinskii N.E., Yusifov A.I., Gershtein E.S., Solov'ev Yu.N., Trapeznikov N.N.: Plasminogen activators and their inhibitor in bone tumors and tumor-like damages. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine - Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 2001, 132(2):180–182.
 56. Gershtein E.S., Batsev A.F., Matyakin E.G., Kushlinskii N.E.: Urokinase and tissue type plasminogen activators and their PAI-1 inhibitor in tumors of patients with oral mucosal cancer: relationship with the main clinico - morphological factors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine - Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 2010, 149(3):323–326.
 57. Gershtein E.S., Prorokov V.V., Kushlinskii N.E.: Prognostic significance of urokinase and tissue type plasminogen activators and their inhibitor PAI-1 in the tumors of patients with colon cancer: 10-year follow-up results. *Technologies of living systems - Tekhnologii zhivyykh sistem* 2011; 3:42–49.
 58. Gershtein E.S., Kushlinskii D.N., Levkina N.V., Tereshkina I.V., Nosov V.B., Laktionov K.P.: Relationship between the expression of VEGF signal components and matrix metalloproteinases in ovarian tumors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine - Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 2011, 151(4):431–435.
 59. Gershtein E.S., Levkina N.V., Digaeva M.A., Laktionov K.P., Tereshkina I.V., Kushlinskii D.N.: Matrix metalloproteinases 2, 7, and 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 in tumors and serum of patients with ovarian neoplasms. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine - Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 2010, 149(5):562–565.
 60. Gershtein E.S., Levkina N.V., Kushlinskii D.N., Tereshkina I.V., Kryuk Yu.V.: Clinical prospects of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors study in ovarian cancer patients. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry - Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii* 2011; 10:27–34

61. Gershtein E.S., Korotkova E.A., Shcherbakov A.M., Prorokov V.V., Golovkov D.A., Kushlinskii N.E.: Matrix metalloproteinases 7 and 9 and their types 1 and 4 tissue inhibitors in tumors and plasma of patients with colorectal cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine - Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 2007, 143(3):438–441.
62. Gershtein E.S., Korotkova E.A., Prorokov V.V., Kushlinskii N.E.: Matrix metalloproteinases 2, 3, 13 and their tissue inhibitor-2 in tumors and plasma of patients with colorectal cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine - Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 2008, 145(3):337–341.
63. Korotkova E.A., Gershtein E.S., Prorokov V.V., Kushlinskii N.E.: Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in colorectal cancer: correlation with clinico - morphological factors. *Problems in oncology - Voprosy onkologii* 2009, 55(2):171–176.
64. Korotkova E.A., Gershtein E.S., Prorokov V.V., Kushlinskii N.E.: Clinical prospects of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors studies in patients with colorectal cancer. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry - Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii* 2012; 10: 41–46.
65. Gershtein E.S., Li S., Ryabov A.B., Dvorova E.K., Yurchenko A.A., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E., Davydov M.I.: Comparative enzyme immunoassay of matrix metalloproteinases-2, -7, -9 and their tissue inhibitor-2 in tumors and plasma of patients with gastric cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine - Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 2009, 148(12):660–663.
66. Katunina A.I., Gershtein E.S., Ermilova V.D., Tereshkina I.V., Nazarenko A.Yu., Tuleulova A.A., Dvorova E.K., Karabekova Z.K., Gritskevich M.V., Berezov T.T. Matrix metalloproteinases 2, 7, and 9 in tumors and serum of patients with breast cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine - Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 2011, 151(3):334–338.
67. Kushlinskii N.E., Solov'ev Yu.N., Babkina I.V., Gershtein E.S., Bulycheva I.V.: Matrix metalloproteinases 2, 7, 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in the serum of patients with bone tumors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine - Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 2010, 149(2):194–196.
68. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Korotkova E.A., Prorokov V.V.: Prognostic role of tumor-associated proteases in colorectal cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine - Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 2012, 154(9):350–355.
69. Hu XX, Li L, Li DR, Zhang W, Tang BJ: Inhibitory effects of antisense MMP-9 oligodeoxynucleotides on invasiveness and adherence of ovarian cancer cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2006, 28(9):662–665.
70. Wang FQ, Smicun Y, Calluzzo N, Fishman DA: Inhibition of matrilysin expression by antisense or RNA interference decreases lysophosphatidic acid-induced epithelial ovarian cancer invasion. *Mol Cancer Res* 2006, 4(11):831–841.
71. Wu M, Xu G, Xi L, Wei J, Song A, Han Z, Zhou J, Wang S, Zhu T, Zhang A *et al*: Down-regulation of MT1-MMP expression suppresses tumor cell invasion in metastatic human SW626 ovarian cancer cells. *Oncol Rep* 2006, 15(2):501–505.
72. Wu M, Shi Y, Xi L, Li Q, Liao GN, Han ZQ, Lu YP, Ma D: Construction of antisense MT1-MMP vector and its inhibitory effects on invasion of human ovarian cancer cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005, 25(6):715–717.
73. Gershtein E.S., Kushlinskii N.E.: Current views of the mechanisms responsible for signal transmission of growth factors as the basis of effective molecularly directed antitumor therapy. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry - Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii* 2007; 1:4–9.
74. Ellerbroek SM, Halbleib JM, Benavidez M, Warmka JK, Wattenberg EV, Stack MS, Hudson LG: Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Res* 2001, 61(5):1855–1861.
75. Nicosia SV, Bai W, Cheng JQ, Coppola D, Kruk PA: Oncogenic pathways implicated in ovarian epithelial cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003, 17(4):927–943.
76. Zhou HY, Wong AS: Activation of p70S6K induces expression of matrix metalloproteinase 9 associated with hepatocyte growth factor-mediated invasion in human ovarian cancer cells. *Endocrinology* 2006, 147(5):2557–2566.
77. Choi JH, Choi KC, Auersperg N, Leung PC: Gonadotropins activate proteolysis and increase invasion through protein kinase A and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2006, 66(7):3912–3920.
78. Ulku AS, Schafer R, Der CJ: Essential role of Raf in Ras transformation and deregulation of matrix metalloproteinase expression in ovarian epithelial cells. *Mol Cancer Res* 2003, 1(14):1077–1088.
79. Lau MT, Wong AS, Leung PC: Gonadotropins induce tumor cell migration and invasion by increasing cyclooxygenases expression and prostaglandin E(2) production in human ovarian cancer cells. *Endocrinology* 2010, 151(7):2985–2993.
80. Symowicz J, Adley BP, Gleason KJ, Johnson JJ, Ghosh S, Fishman DA, Hudson LG, Stack MS: Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 2007, 67(5):2030–2039.
81. Sawada K, Radjabi AR, Shinomiya N, Kistner E, Kenny H, Becker AR, Turkyilmaz MA, Salgia R, Yamada SD, Vande Woude GF *et al*: c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion. *Cancer Res* 2007, 67(4):1670–1679.
82. Shield K, Riley C, Quinn MA, Rice GE, Ackland ML, Ahmed N: Alpha2beta1 integrin affects metastatic potential of ovarian carcinoma spheroids by supporting disaggregation and proteolysis. *J Carcinog* 2007, 6:11.
83. Celiker MY, Wang M, Atsidaftos E, Liu X, Liu YE, Jiang Y, Valderama E, Goldberg ID, Shi YE: Inhibition of Wilms' tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA. *Oncogene* 2001, 20(32):4337–4343.
84. Brand K, Baker AH, Perez-Canto A, Possling A, Sacharjat M, Geheeb M, Arnold W: Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 into the liver tissue. *Cancer Res* 2000, 60(20):5723–5730.
85. Murphy G, Nagase H: Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 2008, 29(5):290–308.
86. Cakarovski K, Leung JY, Restall C, Carin-Carlson A, Yang E, Perlmutter P, Anderson R, Medcalf R, Dear AE: Novel inhibitors of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase expression in metastatic cancer cell lines. *Int J Cancer* 2004, 110(4):610–616.

CONTACT INFORMATION

Gershtein Elena Sergeevna, PhD, Professor, Leading Research Worker, the Clinical Biochemistry Laboratory, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS
Address: 115478, Moscow, Kashirskoye Highway 24; **tel.:** (499) 324-11-59; **e-mail:** esgershtein@gmail.com
Kushlinskii Nikolai Evgen'evich, PhD, Professor, RAMS cor. member, Head of the Clinical Biochemistry Laboratory, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS
Address: 115478, Moscow, Kashirskoye Highway 24; **tel.:** (499) 324-11-59; **e-mail:** biochimia@mtu-net.ru