Прогностическая значимость определения металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов у больных плоскоклеточным раком органов головы и шеи

Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л., Черемисина О.В., Чижевская С.Ю., Шишкин Д.А.

НИИ онкологии СО РАМН, г. Томск

Проведено комплексное изучение содержания матриксных металлопротеиназ ММП-2 и ММП-9 и их тканевых ингибиторов ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови с целью выявления показателей, значимых для прогноза общей, безметастатической и безрецидивной выживаемости больных плоскоклеточным раком органов головы и шеи. Установлено, что высокий уровень содержания ТИМП-1 и ММП-9 в сыворотке крови является признаком плохого прогноза двухлетней общей, безрецидивной и безметастатической выживаемости больных с плоскоклеточным раком органов головы и шеи. Высокая вероятность возникновения метастазов у больных с опухолями головы и шеи связана с высокими уровнями как металлопротеаз-2 и -9, так и ингибиторов ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови, исследованной до начала лечения.

***Ключевые слова**: матриксные металлопротеиназы, тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ, плоскоклеточные карциномы головы и шеи, прогноз.*

Prognostic significance of determination of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors of patients with head and neck squamous cell carcinoma

Klisho E.V., Kondakova I.V., Choinzonov E.L., Cheremisina O.V., Chizhevskaya S.Yu., Shishkin D.A.

Cancer Research Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk

The concentrations of serum matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and their tissue inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) were studied with the aim to assess the overall, metastasis-free and recurrence-free survivals for head and neck cancer patients. High serum TIMP-1 and MMP-9 levels were found to be associated with poor prognosis for 2-year overall, recurrence-free and metastasis-free survivals of head and neck cancer patients. High risk for metastasis in head and neck cancer patients was related to elevated levels of MMP-2 and MMP-9 and high levels of TIMP-1 and TIMP-2 in blood serum investigated prior to treatment.

***Key words:** matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, head and neck squamous cell carcinoma, prognosis.*

ВВЕДЕНИЕ

Ежегодно в мире регистрируется свыше 500 000 новых случаев злокачественных опухолей головы и шеи и более 270 000 больных умирает от этого грозного заболевания [12, 32]. Смертность от плоскоклеточных карцином головы и шеи (ПКГШ) составляет около 50%, а 40% пациентов умирают в первые два года после завершения лечения от местного рецидива и прогрессирования заболевания [2, 12, 32]. Выбор методов лечения ПКГШ зависит от клинико-морфологических параметров опухоли, однако при ранних стадиях опухолевого процесса этих прогностических критериев часто бывает недостаточно. Для решения подобных практических задач возникает потребность в дополнительных молекулярных прогностических маркерах, которые могли бы отражать фактическое состояние опухолевой прогрессии и определять объективный прогноз развития заболевания. Среди большой группы прогностических молекулярных факторов особое место занимают матриксные металлопротеиназы (ММП) благодаря своим уникальным свойствам участвовать на всех этапах опухолевой прогрессии [3, 23, 36].

Семейство ММП включает около 30 представителей нескольких классов, однако только желатиназы (ММП-2 и ММП-9) способны гидролизовать основной структурный белок базальной мембраны – коллаген IV типа и участвовать в реализации инвазивного и метастатического потенциала опухолей [9, 23, 35]. Установлено, что тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ (ТИМП) играют важную роль в развитии опухолей различной локализации [15, 16]. В настоящее время выявлена прогностическая значимость определения экспрессии ММП-2 и ММП-9 при раке простаты [42] и желудка [21]. Определение уровня ММП-2, ММП-9 и ТИМП-1 в сыворотке крови дает достоверный прогноз выживаемости при раке легкого [39], а уровня ММП-2 – при раке желудка [20]. Установлена прогностическая значимость определения уровня активности ММП-9 при раке кишечника [8] и почек [17], ТИМП-1 при раке яичников [28]. В отношении ПКГШ работ по выявлению прогностической значимости определения ММП и ТИМП в крови или опухолевой ткани пока немного, однако в этом направлении ведется активный поиск.

Повышенную экспрессию ММП-2 в ткани опухолей головы и шеи по сравнению со здоровой слизистой оболочкой наблюдал ряд исследователей [7, 18, 24, 34, 35, 38]. Результаты позволили считать наличие этого фермента в опухоли индикатором злокачественности ПКГШ. В последующем была выявлена корреляция между уровнем экспрессии ММП-2 и наличием лимфогенных метастазов [10, 18, 19, 24, 38, 41]. Экспрессия ММР-2 в значительной степени была связана и с отдаленными

метастатическими опухолевым поражениями [41]. Следует отметить, что к настоящему времени определена прогностическая значимость ММП-2 у больных ПКГШ, Высокий уровень экспрессии фермента в опухолевой ткани или его активности в сыворотке крови является маркером плохого прогноза общей выживаемости [10, 40, 41], а высокий уровень про-ММР-2 в плазме – показателем низкой 5-летней выживаемости независимо от пола, возраста и стадии заболевания [37].

Было установлено, что концентрация ММР-9 в крови у больных ПКГШ выше, чем у здоровых людей [5, 27, 29], а уровни экспрессии ММР-9 в опухолевой ткани выше, чем в образцах нормальной слизистой оболочки органов головы и шеи [7, 19, 38]. Кроме того, у больных ПКГШ была выявлена связь между уровнями экспрессии ММР-9 и наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах [24]. При инвазивных формах опухолевого роста наблюдалась увеличенная экспрессия ММР-9 в гистологических препаратах [14], также была обнаружена положительная корреляционная связь между сосудистой инвазией и активацией ММР-9 [19]. Исследования последних лет доказали важную роль ММП-9 как регулятора опухолевого ангиогенеза, поддерживающего интравазацию опухолевых клеток при ПКГШ [11, 25, 29]. Поэтому у пациентов с высокой активностью ММР-9 в опухолях наблюдалось более короткое время жизни без рецидивов, чем у пациентов с низкой активностью фермента в опухолевой ткани [25, 40]. Кроме того, у пациентов без метастазов в регионарных лимфатических узлах иммуногистохимическим методом выявлена положительная экспрессия ММР-9, которая была связана с низкой выживаемостью пациентов [33].

В ряде исследований проведен сравнительный анализ по выявлению прогностической значимости определения ММП-2 и ММП-9 у больных ПКГШ, который показал, что определение уровня ММП-9 может играть более важную роль, чем определение ММП-2 в качестве полезного предсказательного маркера для клинического контроля за пациентами с данной локализацией опухолевого процесса [13, 29].

Рассматривая роль металлопротеаз в опухолевой прогрессии нельзя не уделить внимание их тканевым ингибиторам, которые также принимают участие в прогрессии злокачественных опухолей головы и шеи. Сегодня известно 4 представителя семейства тканевых ингибиторов металлопротеаз: ТИМП-1, ТИМП-2, ТИМП-3 и ТИМП-4, из которых наиболее изучены ТИМП-1 и ТИМП-2 [35]. Показано, что у больных ПКГШ в опухолевой ткани уровни ТИМП-1 значительно выше, чем в образцах нормальной слизистой оболочки [24], а экспрессия ТИМП-1 в опухолевых гистологических

препаратах выше при N0, чем в случаях с регионарными метастазами [14]. Ранее нами было установлено значительное повышение уровня ТИМП-1 в сыворотке крови больных с опухолями головы и шеи по сравнению с уровнем ингибитора в крови здоровых лиц. Содержание ТИМП-1 в сыворотке крови не зависело от размеров новообразования, но было связано с регионарным метастазированием [4, 5].

ТИМП-2 был идентифицирован рядом исследователей во всех изучаемых опухолевых и смежных тканевых образцах карцином головы и шеи [6]. Другие исследователи находили ТИМП-2 только в опухолевых клетках [31]. Экспрессия ТИМП-2 коррелировала с местной инвазией опухолей головы и шеи [26], была связана с локальным и отдаленным метастатическим поражением и плохим прогнозом у пациентов с опухолями языка [41]. Анализ выживаемости объединенной группы всех локализаций опухолей головы и шеи не выявил значительных различий между временем жизни пациентов в группах с разными уровнями экспрессии ТИМП-2 [10], однако при исследовании только ранних стадий (Т1-2) ПКГШ было показано значение высокой экспрессии ТИМП-2 для прогноза развития опухолевых метастазов и снижения времени жизни этих больных [16].

Подводя итог современным данным о роли металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в прогнозе развития злокачественных опухолей головы и шеи, следует отметить, что в работах были использованы разные методы исследований на небольших группах больных. Кроме того, исследования серологических уровней металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов у больных с опухолями головы и шеи в качестве прогностических критериев представлены лишь единичными работами. Поэтому целью нашей исследования явилось комплексное изучение содержания ММП-2, ММП-9 и их тканевых ингибиторов ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови для выявления показателей, значимых для прогноза общей, безметастатической и безрецидивной выживаемости больных ПКГШ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены у 112 больных со злокачественными опухолями головы и шеи (гортань, глотка, органы полости рта, полости носа и придаточных пазух) в стадии Т1-3N0-3M0 (Т1 – 13% пациентов, Т2 – 26%, Т3 – 61% больных) с сентября 2003 г. по август 2007 г. Возраст больных – от 31 до 77 лет (средний возраст 55,7 лет). Гистологическая структура опухоли – плоскоклеточный рак разной степени дифференцировки (высокодифференцированный – 31%, умеренно дифференцированный – 47%, низкодифференцированный – 22%). По поводу основного заболевания пациентам проведено комбинированное лечение (предоперационная

химиолучевая терапия и операция), в самостоятельном варианте – лучевая терапия по радикальной программе или оперативное вмешательство.

Срок наблюдения за больными – от 1 до 53 мес. Материалом для исследования послужила сыворотка крови больных, забранная до начала лечения. Сыворотку хранили при -50°С не более 6 мес. и размораживали не более 1 раза для исследования уровня ферментов. Исследование уровня ММП-2, ММП-9, ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови проводили с использованием наборов для твердофазного иммуноферментного анализа (Human Human MMP-9 Quantikine ELISA Kit, Human Human TIMP-1 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, USA) на ИФА-анализаторе ANTHOS 2020 (Австрия).

Статистический анализ был проведен с использованием программы STATISTICA 6.0. Для оценки прогностической значимости определения ферментов и ингибиторов в сыворотке крови больных ПКГШ использовали однофакторный анализ прогностической значимости признаков, который был выполнен с использованием критерия Гехана-Вилкоксона и log-рангового критерия. Сравнение выживаемости в группах проводили с помощью критерия Гехана-Вилкоксона и log-рангового критерия. Показатели 2-летней общей, безрецидивной и безметастатической выживаемости оценивали с помощью построения кривых выживаемости по методу Каплана-Майера. Статистически значимыми считались различия при $p<0,05$ [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При наблюдении в течение 53 мес. с момента постановки диагноза за 112 больными ПКГШ отмечено прогрессирование опухолевого процесса у 34 (30,4%) больных за счет развития рецидивов опухоли в период от 2 до 40 мес. (14 мес. в среднем) и у 21 (18,8%) пациента за счет формирования регионарных метастазов (срок обнаружения метастазов от 2 до 26 мес., в среднем 10,9 мес.). Смерть наступила у 61 (54,5%) больного в период от 1 до 38 мес. (в среднем через 15 мес.).

В представленном исследовании была выявлена прогностическая значимость всех четырех изучаемых параметров и определены пороговые уровни значения показателей в сыворотке крови, превышение которых сопровождалось статистически достоверным снижением показателей выживаемости больных ПКГШ.

При оценке 2-летней общей выживаемости были выявлены два статистически значимых критерия: уровень содержания ТИМП-1 и ММП-9 в сыворотке крови. Так, общая выживаемость была достоверно выше у больных ПКГШ при уровне ТИМП-1 в сыворотке крови до 230 нг/мл, чем у больных с более высоким содержанием ингибитора ($p=0,039$, тест Gehan's Wilcoxon; $n=102$) (*рис. 1А*). Кроме того, общая выживаемость была достоверно выше у больных ПКГШ при уровне фермента в

сыворотке крови до 550 нг/мл по сравнению с больными с более высоким содержанием фермента (p=0,009, тест Gehan's Wilcoxon; p=0,016, тест Log-Rank; n=89) (*рис. 2А*). Таким образом, высокие концентрации ТИМП-1 и ММП-9 в сыворотке крови достоверно ухудшают прогноз общей 2-летней выживаемости.

Учитывая, что прогрессирование опухолевого процесса у 30,4% больных происходило за счет развития рецидивов опухоли, была проведена оценка безрецидивной выживаемости данной категории пациентов. При оценке прогностической значимости металлопротеиназ у больных ПКГШ было выявлено, что статистически значимыми критериями в отношении безрецидивной выживаемости также являются ТИМП-1 и ММП-9. Так, безрецидивная выживаемость была достоверно выше у больных при уровне содержания ингибитора в сыворотке крови ниже 230 нг/мл, чем у больных с более высоким содержанием ингибитора (p=0,027, тест Gehan's Wilcoxon; p=0,007, тест Log-Rank; n=103) (*рис. 1В*), и при уровне содержания фермента в сыворотке крови ниже 550 нг/мл по сравнению с больными с более высоким содержанием ММП-9 (p=0,031, тест Gehan's Wilcoxon; p=0,022, тест Log-Rank; n=91) (*рис. 2В*). Таким образом, рецидивы чаще выявлялись среди больных, в сыворотке крови которых содержались высокие уровни ТИМП-1 и ММП-9.

Нами был проведен анализ безметастатической выживаемости больных ПКГШ и выявлено четыре значимых критерия и их пороговые концентрации:

1. ТИМП-1: безметастатическая выживаемость оказалась достоверно выше у больных при уровне содержания ингибитора в сыворотке крови до 230 нг/мл, чем у больных с более высоким содержанием ингибитора (p=0,030, тест Gehan's Wilcoxon; p=0,002, тест Log-Rank; n=103) (*рис. 1Б*);
2. ТИМП-2: безметастатическая выживаемость оказалась достоверно выше у больных при уровне содержания ингибитора в сыворотке крови до 120 нг/мл, чем у больных с более высоким содержанием ингибитора (p=0,034, тест Gehan's Wilcoxon; p=0,004, тест Log-Rank; n=52) (*рис. 3*);
3. ММП-2: безметастатическая выживаемость оказалась достоверно выше у больных с уровнем содержания фермента в сыворотке крови до 250 нг/мл, чем у больных с более высоким содержанием фермента (p=0,022, тест Log-Rank; n=52) (*рис. 4*);
4. ММП-9: безметастатическая выживаемость оказалась достоверно выше у больных при уровне содержания фермента в сыворотке крови менее 550 нг/мл, чем у больных с высоким содержанием фермента (p=0,004, тест Gehan's Wilcoxon; p=0,002, тест Log-Rank; n=90) (р*ис. 2Б*).

Таким образом, метастазы появлялись чаще у тех больных ПКГШ, у которых в сыворотке крови до лечения обнаруживается более 120 нг/мл ТИМП-2, более 550 нг/мл ММП-9, более 230 нг/мл ТИМП-1 и более 250 нг/мл ММП-2.

Подводя итог, следует отметить, что на показатели общей, безрецидивной и безметастатической выживаемости больных ПКГШ оказывает наибольшее влияние фоновый уровень содержания ТИМП-1 и ММП-9 в сыворотке крови. Более агрессивный характер течения заболевания отмечается у больных ПКГШ с содержанием фермента более 550 нг/мл и содержанием ингибитора более 230 нг/мл в сыворотке крови. В работах ряда исследователей также отмечалась роль высокой активности ММР-9 у пациентов ПКГШ при более коротком времени безрецидивной выживаемости [25, 40], однако значимость ТИМП-1 как прогностического критерия нами показана впервые.

Высокие концентрации всех четырех изучаемых параметров в сыворотке крови у больных ПКГШ связаны с большей вероятностью возникновения метастазов. Следует отметить, что в работах других авторов указывается на прогностическое значение возникновения опухолевых метастазов только высокого содержания ТИМП-2 [16]. Учитывая, что среди 4 выявленных значимых критериев достоверность безметастатической выживаемости оказалась максимальной у больных с низким содержанием ТИМП-2 ($p=0,004$, тест Log-Rank; $n=52$) (*рис. 3*), можно предположить, что вклад этого ингибитора в вероятность возникновения метастазов действительно велик.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что высокие уровни тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ ТИМП-1 и матриксной металлопротеиназы ММП-9 в сыворотке крови являются признаком плохого прогноза 2-летней общей, безрецидивной и безметастатической выживаемости больных плоскоклеточным раком органов головы и шеи. Высокая вероятность возникновения регионарных метастазов у больных злокачественными опухолями головы и шеи связана с высоким содержанием как металлопротеиназ ММП-2 и ММП-9, так и их ингибиторов ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови, исследованной до начала противоопухолевого лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. ***Боровиков В.П., Боровиков П.П.*** М: Филин, 1998; 608.
2. ***Кицманюк З.Д., Чойнзонов Е.Л., Новиков В.А., Карасева В.В.*** Томск: STT, 1998; 384.

3. ***Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л., Васильева О.С.*** Бюллетень СО РАМН 2005; 2: 82-91.
4. ***Клишо Е.В., Савенкова О.В., Кондакова И.В. и др.*** Вопросы онкологии 2007; 53 (1): 26-31.
5. ***Кондакова И.В., Клишо Е.В., Савенкова О.В. и др.*** Вестник Национальной академии наук Белоруссии 2008; 2: 88-92.
6. ***Birkedal-Hansen B., Pavelic Z.P., Gluckman J.L.*** Oral Dis 2000; 6: 376-382.
7. ***Bogusiewicz M., Stryjecka-Zimmer M., Szymanski M.*** Otolaryngol Head Neck 2003; 128 (1): 132-136.
8. ***Cho Y.B., Lee W.Y., Song S.Y. et al.*** Hum Pathol 2007; 38 (11): 1603-1610.
9. ***Christofory G.*** Nature 2006; 441: 444-450.
10. ***Danilewicz M., Sikorska B., Wagrowska-Danilewicz M.*** Med Sci Monit 2003; 9 (3): 42-47.
11. ***Franchi A., Santucci M., Masini E. et al.*** Cancer 2002; 95 (9): 1902-1910.
12. ***Grandis J.R., Pietenpol J.A.,Greenberger J.S.*** Cancer Res 2004; 64 (21): 8126-8129.
13. ***Hong S.D., Hong S.P., Lee J.I., Lim C.Y.*** Oral Oncol 2000; 36 (2): 207-213.
14. ***Ikebe T., Shinohara M., Takeuchi H.*** Clin Exp Metastasis 1999; 4: 315-323.
15. ***Jiang J., Goldberg I.D., Shi Y.E.*** Oncogene 2002; 21: 2245-2252.
16. ***Katayama A., Bandoh N., Kishibe K. et al.*** Clin Cancer Res 2004; 10 (2): 634-640.
17. ***Kawamura K., Kamiya N., Suyama T. et al.*** J Urol 2004; 172: 1480-1484.
18. ***Kawata R., Shimada T., Maruyama S. et al.*** Acta Otolaryngol 2002; 122 (1): 101-106.
19. ***Koyama H., Iwata H., Kuwabara Y.*** Eur J Cancer 2000; 16: 2164-2170.
20. ***Leppä S., Saarto T., Vehmanen L. et al.*** Clin Cancer Res 2004; 10 (3): 1057-1063.
21. ***Li H.C., Cao D.C., Liu Y. et al.*** Breast Cancer Res Treat 2004; 88 (1): 75-85.
22. ***Liu W.W., Zeng Z.Y., Wu Q.L. et al.*** Otolaringol Head Neck Surg 2005; 132 (3): 395-400.
23. ***Lynch C.C., Matrisian L.M.*** Differentiation 2002; 70: 561-573.
24. ***O-Charoenrat P, Rhys-Evans P.H., Eccles S.A.*** Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2001; 127 (7): 813-820.
25. ***O-Charoenrat P., Rhys-Evans P., Modjtahedi H. et al.*** Int J Cancer 2000; 86 (3): 307-317.
26. ***Ondruschka C., Buhtz P., Motsch C. et al.*** Pathol Res Pract 2002; 198 (8): 509-515.
27. ***Ranuncolo S.M., Matos E., Loria D. et al.*** Cancer 2002; 94 (5): 1483-1491.
28. ***Rauvala M., Puistola U., Turpeenniemi-Hujanen T.*** Gynecol Oncol 2005; 99 (3): 656-663.

29. ***Riedel F., Gotte K., Schwalb J., Hormann K.*** Anticancer Res 2000; 5A: 3045-3049.
30. ***Ruokolainen H., Paakko P., Turpeenniemi-Hujanen T.*** Clin Cancer Res 2005; 11: 3257-3264.
31. ***Shimada T., Nakamura H., Yamashita K. et al.*** Clin Exp Metastasis 2000; 18 (2): 179-188.
32. ***Stewart B.W., Kleihues P.*** World Cancer Report. Geneva: International Agency for Research on Cancer, 2003; 232-236.
33. ***Vicente J.C., Fresno M.F., Villalain L.*** Oral Oncol 2005; 41 (3): 283-293.
34. ***Vuotila T., Ylikontiola L., Sorsa T.*** J Oral Pathol Med 2002; 31 (6): 329-338.
35. ***Werner J.A., Rathcke I.O., Mandic R.*** Clin Exp Metastasis 2002; 19 (4): 275-282.
36. ***Wiegand S., Dunne A.A., Muller H.H. et al.*** Cancer 2005; 104: 94-100.
37. ***Wong T.S., Kwong D.L., Sham J.S. et al.*** Eur J Surg Oncol 2004; 30 (5): 560-564.
38. ***Xu Y.P., Zhao X.Q., Sommer K., Moubayed P.*** J Zhejiang Univ Sci 2003; 4: 491-501.
39. ***Ylisirnio S., Hoyhtya M., Turpeenniemi-Hujanen T.*** Anticancer Res 2000; 2B: 1311-1316.
40. ***Yorioka C.W., Coletta R.D., Alves F. et al.*** Int J Oncol 2002; 20 (1): 189-194.
41. ***Yoshizaki T., Maruyama Y., Sato H., Furukawa M.*** Int J Cancer 2001; 95 (1): 44-50.
42. ***Zhong W.D., Han Z.D., He H.C., Bi X.C. et al***. Oncology 2008; 75 (3-4): 230-236.

Подписи к рисункам

Рис. 1. Общая (А), безметастатическая (Б) и безрецидивная (В) выживаемость больных ПКГШ в зависимости от порогового уровня ТИМП-1 в сыворотке крови, равного 230 нг/мл.

Рис. 2. Общая (А), безметастатическая (Б) и безрецидивная (В) выживаемость больных ПКГШ в зависимости от порогового уровня ММП-9 в сыворотке крови, равного 550 нг/мл.

Рис. 3. Безметастатическая выживаемость больных ПКГШ в зависимости от порогового уровня ТИМП-2 в сыворотке крови, равного 120 нг/мл.

Рис. 4. Безметастатическая выживаемость больных ПКГШ в зависимости от порогового уровня ММП-2 в сыворотке крови, равного 250 нг/мл.