

УДК 577.156:152.3.4*24`142

Н. В. Мотрук¹, молод. наук. співроб., **І. Л. Вовчук**², канд. біол. наук, доц.

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,

¹ кафедра фізіології людини і тварин,

² кафедра біохімії,

вул. Дворянська 2, Одеса, 65026, Україна. Тел: (0482) 68-78-75

e-mail: irvov@mail.ru

АКТИВНІСТЬ МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ-2 В ТКАНИНАХ ДОБРОЯКІСНИХ ТА ЗЛОЯКІСНИХ НОВОУТВОРЕНЬ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Досліджена активність матриксної металопротеїнази-2 (ММП-2) тканин молочної залози з доброякісними та злоякісними пухлинами. Встановлено підвищення активності ММП-2 за наявності пухлинного процесу. В тканині доброякісних новоутворень підвищення активності ферменту прямопропорційне проліферативному потенціалу пухлинних клітин, а в тканині злоякісних пухлин — зворотньопропорційне ступеню диференціації клітин пухлини. Встановлені вікові особливості активності ММП-2 в немалігнізованій тканині молочної залози та за наявності доброякісного та злоякісного процесу.

Ключові слова: матриксна металопротеїназа-2, молочна залоза, пухлина.

Матриксна металопротеїназа-2 (ММП-2) або желатиназа А — (КФ 3.4.24.24) — Zn^{2+} -залежна ендопептидаза, що належить до родини металопротеїназ позаклітинного матриксу (ММП) [1, 2].

Вона синтезується як препробілок з молекулярною масою 72 кДа і секретується в інтерстиційний простір у вигляді проферменту, що містить сигнальний пептид з 18–20 амінокислотних залишків, який руйнується під час секреції [1, 3].

Матриксна металопротеїназа-2 у звичайних умовах знаходиться в тканині у невеликих кількостях [1]. На рівні транскрипції синтез ММП-2 регулюється цитокінінами, гормонами, факторами росту й іншими біологічно активними сполуками [2, 3]. Основними фізіологічними активаторами цієї металопротеїнази в нормальних та неопластичних клітинах є мембранозв'язанні ММП (МЗ-ММП), головним чином МЗ1-ММП [1, 4]. Проформа ферменту, як звичайна ендопептидаза, активується аутокаталітично та під впливом синтетичного субстрату — 4-АРМА (4-амінофенілмеркуріацетату) і не активується протеїназами інших класів за каскадним механізмом активації [5]. У збереженні ферменту в латентній формі істотну роль відіграють ендогенні інгібітори. Ідентифіковано специфічний тканинний інгібітор цього ферменту — ТІМП-2, що може зв'язуватись із С-кінцевим доменом проММП-2 з утворенням неактивного комплексу [6, 7].

Матриксна металопротеїназа-2 характеризується досить поширеною субстратною специфічністю стосовно природних і синтетичних субстратів. Вона може розщеплювати желатини, колагени I, IV, V, VII, X, XI типів, фібронектин, ламінін, аггрікан, еластин, вітронектин, про-МММ-9, про-ММП-13, тенасцин-С-білок та ін. [1, 2, 8].

In vivo ММП-2 синтезується багатьма нормальними та пухлинними клітинами. Висока активність ферменту в нормальних тканинах людини встановлена в стромальних клітинах ендометрію, печінки, нирок, аорти, молочних залоз та ін. [2].

Підвищення експресії ММП-2 встановлено в клітинах карцином молочної залози [9], голови та шиї [10], прямої кишки [11], шлунку [12], яєчників [5] та в клітинах меланоми [13].

Однак, в науковій літературі відсутні результати досліджень активності ММП-2 в тканинах доброякісних новоутворень молочної залози, не досліджені вікові особливості прояву активності ММП-2 у тканинах молочної залози при пухлинному процесі. Незважаючи на те, що, за даними літератури, ММП-2 є одним із ключових ферментів у процесах інвазії й метастазування, до теперішнього часу не досліджена активність ММП-2 за доброякісної патології молочної залози та в злоякісних новоутвореннях з різним ступенем диференціації пухлинних клітин.

Мета роботи — дослідження активності матриксної металопротеїнази-2 в тканинах молочної залози за наявності доброякісних та злоякісних новоутворень з урахуванням вікових особливостей жіночого організму.

Матеріали і методи

Досліджували зразки немалігнізованих та пухлинних тканин молочної залози, вилучених операційним шляхом у жінок, які не отримували медикаментозного доопераційного лікування. Патоморфологічні діагнози були верифіковані за міжнародною класифікацією ВОЗ із визначенням морфологічного стану і ступеня диференціації трансформованих клітин пухлинної тканини [14].

Тканини гомогенізували в 0,9% розчині NaCl (у співвідношенні 1:10) і центрифугували (12000 обертів/хв при +4°C) протягом 45 хвилин.

У супернатанті визначали активність ММП-2 методом Bradshaw R. S. [15] по гідролізу 0,04%-го розчину желатини та вміст білка методом Lowry [16]. Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 570 нм, відносну активність ферменту виражали в мкмоль гліцину на мг тканини за 1 хв інкубації при 37°C, питому активність — в нмоль гліцину на мг білка. Статистичну значимість відмінностей між вибірками визначали за допомогою t-критерія Ст'юдента [17].

Результати та їх обговорення

Нами встановлена значна зміна активності ферменту в тканинах доброякісних новоутворень молочної залози залежно від особливос-

тей досліджуваного патологічного процесу (рис. 1). У порівнянні з показниками активності ММП-2 немалігнізованої тканини молочної залози максимальне збільшення відносної (в середньому в 1,5 рази) і питомої (в середньому в 2,2 рази) активностей ММП-2 встановлено в тканині проліферуючої ФКХ (фіброзно-кістозної хвороби), ускладненої папіломатозом, що може бути пояснено підвищеною секрецією ММП-2 за інтенсивних проліферативних процесів.

Навпаки, у зразках непроліферуючої ФКХ показники відносної й питомої активності ММП-2 були нижчими в 3,5 і 2,4 рази, ніж в немалігнізованій тканині, і в середньому в 5,8 рази нижчими, ніж у випадку проліферуючої форми ФКХ.

У тканинах інтраканалікулярної фіброаденоми (ФБА) показники відносної й питомої активності ММП-2 були також нижчими в середньому в 1,4 рази, ніж у тканині без патології. В порівнянні із проліферуючою ФКХ і відносна, і питома активність ферменту знижувалася в середньому в 3 рази.

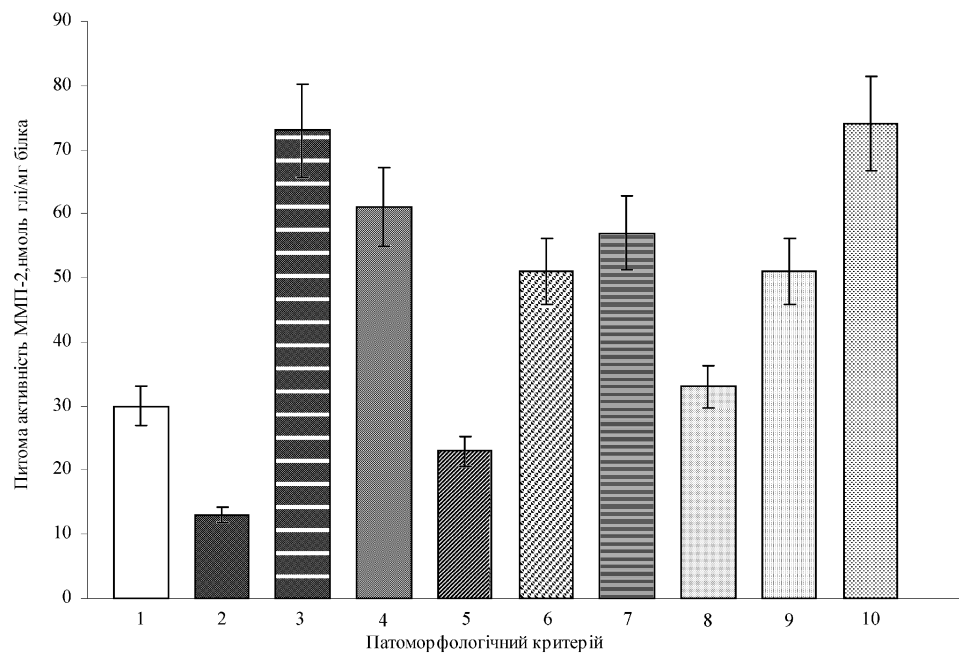


Рис. 1. Питома активність ММП-2 немалігнізованої та пухлинної тканини молочної залози

Примітки: 1. — немалігнізована тканина молочної залози; 2 — фіброзно-кістозна хвороба непроліферуюча; 3 — фіброзно-кістозна хвороба проліферуюча; 4 — фіброзно-кістозна хвороба проліферуюча + папіломатоз; 5 — інтраканалікулярна ФБА; 6 — периканалікулярна ФБА; 7 — доброякісна листовидна пухлина; 8 — високодиференційована форма інфільтруючого протокового раку (І П Р); 9 — помірнодиференційована форма І П Р; 10 — низькодиференційована форма І П Р.

Імовірно, активність даного ферменту пригнічується його ендogenousним інгібітором — ТІМП-2 або секреція ММП-2 при цих патологіях знижена у порівнянні з інтенсивно проліферуючими тканинами.

У тканинах інфільтруючого протокового раку молочної залози з різним ступенем диференціації пухлинних клітин спостерігається збільшення відносної і питомої активності ММП-2 в середньому вдвічі у порівнянні з тканинами без патології.

Нами встановлено, що зниження ступеня диференціації пухлинних клітин характеризується істотним зростанням відносної й питомої активності ММП-2. Цей факт можна пояснити його зв'язуванням з рецепторами вітронектину на поверхні клітин пухлини, що дозволяє регулювати ріст і диференціацію клітин, як було показано Turck J. з спів. [18] на клітинах нирок щурів. Крім того, можлива активація латентних форм цієї металопротеїнази під впливом ферментів, які секретуються клітинами сполучної тканини, залученими до процесу пухлиноутворення.

Слід зазначити, що високодиференційована форма інфільтруючого протокового раку характеризується зниженням активності ММП-2 у порівнянні як з немалігнізованими тканинами, так і з іншими формами злоякісних новоутворень.

У випадку низькодиференційованої форми ІПР активність досліджуваного ферменту в тканині була дещо вищою, ніж у тканинах проліферуючої ФКХ.

В табл. 1 наведені результати порівняльного аналізу активності ММП-2 в тканинах неураженої молочної залози та в зразках доброякісних і злоякісних новоутворень у жінок різного віку.

В немалігнізованій тканині молочної залози у жінок похилого віку відносна активність ММП-2 збільшувалась в 1,5–2,0 рази у порівнянні з активністю ферменту у немалігнізованій тканині молочної залози жінок репродуктивного віку. Аналогічні дані були отримані щодо питомої активності ферменту, максимальні показники якої були у жінок похилого віку (більше 70 років).

В порівнянні з показниками немалігнізованої тканини у доброякісних новоутвореннях молочної залози відносна та питома активність ММП-2 була вищою в 2,9 і 3,6 рази тільки у жінок віком від 41 до 50 років, а в інших вікових групах — вірогідно нижчою.

За наявності злоякісного процесу в межах однієї вікової групи активність ферменту практично не відрізняється від показників тканини без патології, але була в 2 рази вищою у жінок віком від 51 до 60 років.

У межах однієї вікової групи (41–50 років) активність ММП-2 в тканинах молочної залози максимальна за наявності доброякісних пухлин. У жінок у віці від 51–70 років відносна й питома активність досліджуваного ферменту різко зростає (в середньому в 6,6 рази) в тканинах злоякісних новоутворень у порівнянні з доброякісними пухлинами.

Таблиця 1
Активність ММП-2 у тканинах молочної залози жінок різного віку

Вік	n	Концентрація білка (г білка /г тканини)	Відносна активність ММП-2 (мкмоль глі/мг тканини)	Питома активність ММП-2 (нмоль глі/мг білка)
Немалігнізована тканина молочної залози				
21-30	—	—	—	—
31-40	12	0.055±0.006	2.0 ± 0.18	40.0 ± 3.8
41-50	15	0.061±0.007	1.0 ± 0.09	31.0 ± 2.9
51-60	17	0.069±0.007	2.8 ± 0.26	13.0 ± 1.1
61-70	15	0.060±0.007	3.0 ± 0.28	55.0 ± 5.2
71 і більше	17	0.048±0.005	2.9 ± 0.27	68.0 ± 6.5
Доброякісні новоутворення				
21-30	13	0.074± 0.007	0.4 ± 0.37	56.0 ± 5.4
31-40	22	0.098± 0.008	2.0 ± 1.80	21.0 ± 1.9
41-50	55	0.076± 0.007	5.0 ± 0.47↑	73.0 ± 7.1 ↑
51-60	12	0.077± 0.007	0.9 ± 0.08↓	12.0 ± 1.0↓
61-70	10	0.070± 0.006	1.0 ± 0.98↓	17.0 ± 1.5↓
71 і більше	—	—	—	—
Злоякісні пухлини				
21-30	5	0.065±0.007	5.0 ± 0.47	75.0 ± 7.3
31-40	—	—	—	—
41-50	14	0.064±0.007	3.0 ± 0.28 ↑	54.0 ± 5.2 ↑
51-60	38	0.087±0.009	7.0 ± 0.67↑*	75.0 ± 7.2 ↑*
61-70	15	0.080±0.009	4.4 ± 0.41*	56.0 ± 5.4 *
71 і більше	8	0.080±0.009	4.0 ± 3.7	13.0 ± 1.1

Примітки: * — вірогідне збільшення активності ферменту за патології у порівнянні з немалігнізованою тканиною; ↑ — вірогідна різниця між показниками тканин злоякісних пухлин молочної залози і тканинами доброякісних новоутворень у жінок однієї вікової групи.

Висновки:

1. За доброякісних новоутворень молочної залози найбільша активність матричної металопротеїнази-2 спостерігається в інтенсивно проліферуючій тканині.

2. В тканинах інфільтруючої протокової форми раку молочної залози активність ферменту змінюється зворотнопропорційно ступеню диференціації пухлинних клітин.
3. Найбільша питома активність ММП-2 у жінок з доброякісними патологіями молочної залози виявлена у преклімактеричний період (41-50 років), а за наявності злоякісних пухлин — в клімактеричному віці (51-60 років).

Література

1. Соловьева Н. И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции // Биоорг. химия. — 1998. — Т. 24, № 4. — С. 245-255.
2. Хасигов З. П., Подобед О. В., Кюева С. А. и др. Металлопротеиназы матрикса нормальных тканей человека // Биохимия. — 2001. — Т. 66, № 2. — С. 167-179.
3. Соловьева Н. И. Основные металлопротеиназы соединительно-тканного матрикса // Биоорг. химия. — 1994. — Т. 20, № 2. — С. 143-152.
4. Purification of progelatinase A and B by continuous-elution electrophoresis / A. G. Remacle, E. N. Baramova, U. H. Weidle, H. W. Krell, J. M. Foidart // Protein. Exper. Purif. — 1995. — Vol. 6, N 4. — P. 417-422.
5. Schmalfeldt B., Prechtel D., Harting K. et al. Increased expression of matrix metalloproteinases (mmp)- 2, (mmp)- 9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer // Clin. Cancer. Res. — 2001. — Vol. 7, N 8. — P. 2396-2404.
6. Bode W., Maskos K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases // Biol. Chem. — 2003. — Vol. 268, N 19. — P. 863-872.
7. Miyazaki K., Funahashi K., Numata Y. et al. Purification and characterization of a two-chain form of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) type 2 and a low molecular weight TIMP-like protein // J Biol. Chem. — 1993. — Vol. 384, N 6. — P. 14387-14393.
8. Луценко С. В., Кисилев С. М., Северин С. Е. Молекулярные механизмы опухолевого ангиогенеза // Биохимия. — 2003. — Т. 68, № 3. — С. 349-365.
9. The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis / B. Tetu, J. Brisson, C. S. Wang, H. Lapointe // Breast Cancer Res. — 2006. — Vol. 8, N 3. — P. R28.
10. Matrix metalloproteinase-2 concentrations in squamous cell carcinoma of the head and neck and its clinical significance / R. Kawata, T. Shinomiya, N. Yasuda, H. Takenaka, Y. Murakami // Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho. — 1996. — Vol. 99, N 2. — P. 299-305.
11. Pjulsan R., Pignatelli M., Stetler-Stevenson W. G. Stromal expression of 72-kDa typeIV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia // Am. J. Pathol. — 1992. — N 141. — P. 389-396.
12. Allgayer H., Babic R., Beyer B. C. et al Prognostic relevance of MMP-2 (72-kDa collagenase IV) in gastric cancer // Oncology. — 1998. — Vol. 55, N 2. — P. 152-160.
13. Ray J. M., Stetler-Stevenson W. G. Gelatinase A activity directly modulates melanoma cell adhesion and spreading // EMBO J. — 1995. — Vol. 14, N 5. — P. 908-917.
14. Всемирная Организация Здравоохранения // Материалы ежегодных отчетов. — С.Пб., 1981. — 286 с.
15. Bradshaw R. S., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci USA. — 1969. — Vol. 63. — P. 1389-1394.
16. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. I. Rosenbrough, A. Z. Fan, R. J. Randol // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.
17. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Высш. Школа. — 1967. — 326 с.

18. *Turch J., Pollock A. S., Lee L. K. et al. Matrix Metalloproteinase-2 (Gelatinase A) Regulates Glomerular Mesangial Cell Proliferation and Differentiation // J Biol. Chem. — 1996. — Vol. 271, N 25. — P. 15074–15083.*

Н. В. Мотрук¹, І. Л. Вовчук²

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,

¹ кафедра физиологии человека и животных,

² кафедра биохимии,

ул. Дворянская 2, Одесса, 65026, Украина. Тел: (0482) 68-78-75 e-mail:

irvov@mail.ru

АКТИВНОСТЬ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 В ТКАНЯХ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме

Исследована активность матриксной металлопротеиназы-2 (ММП-2) в тканях доброкачественных и злокачественных новообразований молочной железы. Установлено увеличение активности ММП-2 при наличии опухолевого процесса. В тканях доброкачественных новообразований повышение активности фермента прямо пропорционально пролиферативному потенциалу клеток опухоли молочной железы, а в тканях злокачественных новообразований — обратнопропорционально степени дифференциации опухолевых клеток. Установлены возрастные особенности активности ММП-2 в немалигнизированной ткани молочной железы и при наличии доброкачественного и злокачественного процесса.

Ключевые слова: матриксная металлопротеиназа-2, молочная железа, опухоль.

N. V. Motruk¹, I. L. Vovchuk²

Odessa National I. I. Mechnikov University,

¹ Department of Human and Animal Physiology,

² Department of Biochemistry,

Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine. Tel: (0482) 68-78-75, e-mail:

irvov@mail.ru

ACTIVITY OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 IN THE TISSUE OF BENIGNANT AND MALIGNANT BREAST TUMORS

Summary

The subject of investigation was metalloproteinases activity in the matrix of breast tissues with benignant and malignant pathology. It has been established that MMP-2 activity increases at tumor process. At the presence of benignant pathology in the breast tissue the enzyme activity changes depending on the proliferating potential of tumor cells, while in malignant tumors the activity is inversely propotional to the level of tumor cells differentiation. Age differences in MMP-2 activity were shown in the non-pathologic breast tissue and at the benignant and malignant tumors.

Keywords: matrix metalloproteinase-2, mamalian gland, tumor.