

УДК 616-006.3

ТКАНЕВЫЕ ИНГИБИТОРЫ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ I И II ТИПА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОПУХОЛЯМИ КОСТЕЙ

Черномаз И.С., Бабкина И.В., Герштейн Е.С., Кузнецов И.Н., Булычева И.В.,
Соловьев Ю.Н., Алиев М.Д., Кушлинский Н.Е.

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478, г. Москва, Каширское ш., д. 24

Ключевые слова: опухоли костей, ТИМП-1, ТИМП-2, общая выживаемость, прогноз

Актуальность. Доказано участие матриксных металлопротеиназ (ММП) и их тканевых ингибиторов (ТИМП) в патогенезе заболеваний различной этиологии, в том числе и при опухолевой трансформации, а также в процессах инвазии и метастазирования. Участие ТИМП-1 и ТИМП-2 в процессах роста и прогрессирования остеосаркомы продемонстрировали в экспериментальных исследованиях на линиях клеток U-2OS, MG-63 и OS-732. Клинических работ по данной проблеме при опухолях костей немного, но в них показаны отличия в экспрессии ММП и ТИМП в опухоли и окружающих нормальных тканях.

Цель исследования. Изучить содержание тканевых ингибиторов ММП ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови больных первичными злокачественными и пограничными новообразованиями костей и практически здоровых людей соответствующего возраста для выявления возможной взаимосвязи с морфологическим строением опухоли и прогнозом заболевания.

Материалы и методы. Обследованы 128 больных опухолями костей (69 мужчин, 59 женщин) и 42 практически здоровых донора соответствующего возраста и пола. У всех больных диагноз установлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования опухоли. Злокачественные опухоли костей диагностированы у 108 (84%), пограничные опухоли костей – у 20 (16%) больных. Исследования ТИМП-1, ТИМП-2 проведены иммуноферментным методом в сыворотке крови больных до начала специфического лечения с помощью реактивов фирмы «R&D» (США).

Результаты. У больных злокачественными и пограничными опухолями костей выявлены достоверно более высокие концентрации ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови по сравнению с контролем, не зависящие от стадии заболевания, гистологического строения, степени дифференцировки и локализации опухоли в костях различного строения. По данным многофакторного анализа, пороговые уровни ТИМП-1 более 343 нг/мл и ТИМП-2 более 120 нг/мл можно рассматривать в качестве значимых и независимых факторов прогноза общей выживаемости больных саркомами костей.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности проведения дальнейших исследований ТИМП-1 и ТИМП-2 в периферической крови при новообразованиях костей для изучения возможности их использования в качестве маркеров прогноза заболевания.

Введение

Матриксные металлопротеиназы (ММП) – семейство ферментов, функция которых связана с обменом белков внеклеточного матрикса (ВКМ) [1]. Все ММП секретируются в неактивной форме, способны участвовать в гидролизе ВКМ, а подавляется их каталитическая активность специфическими тканевыми ингибиторами (ТИМП) [2, 3]. Известно 4 типа ТИМП, полагают, что любой из белков может ингибировать любую ММП, но с разной степенью выраженности в разных тканях [3–5]. Считается, что ТИМП образуют комплекс с ММП в соотношении 1:1, а при отщеплении ТИМП происходит активация ММП. Многочисленными исследованиями доказано их участие в патогенезе заболеваний

различной этиологии, в том числе и при онкологических заболеваниях, а также в процессах инвазии и метастазирования.

В экспериментальных исследованиях показано, что механизм противоопухолевого эффекта отдельных химиопрепаратов на клетки остеосаркомы линии U-2OS, отличающиеся агрессивным ростом, состоит в том числе и в повышении экспрессии ТИМП-1 и ТИМП-2 [6]. Причастность ТИМП-2 к росту и прогрессированию остеосаркомы продемонстрирована также в линиях клеток MG-63 и OS-732 [7].

Клинических исследований при опухолях костей не много, но в них показано, что уровни экспрессии ММП-2 и ТИМП-3 в опухоли и окружающих тканях при гигантоклеточной опухоли кости зависят от размера опухоли, клинической стадии заболевания, вовлечения в опухолевый процесс лимфатических узлов и могут служить факторами прогноза возникновения рецидивов [8]. При хондросаркоме в процессах прогрессирования принимает участие ТИМП-3 и

Адрес для корреспонденции

Кушлинский Николай Евгеньевич
E-mail: kne3108@gmail.com

ММП-2, по данным одних авторов [9], и ММП-1, ММП-13 и ТИМП-1 — по данным других [10].

В более ранних исследованиях нами показано, что экспрессия ММП-2, ММП-9 и ТИМП-1 может иметь связь с патогенетическими изменениями, связанными с ростом и метастазированием сарком костей в целом и остеосаркомы в частности, а также может служить предметом дальнейших исследований по определению уровней этих показателей и их значения в прогнозе злокачественных новообразований костей [11].

Цель исследования состояла в изучении содержания ТИМП-1 и ТИМП-2 в наиболее доступном биологическом материале — сыворотке крови больных первичными злокачественными и пограничными новообразованиями костей, а также практически здоровых людей соответствующего возраста и пола для выявления возможной взаимосвязи с гистологическим строением опухоли и прогнозом заболевания.

Материалы и методы

Обследованы 128 больных первичными опухолями костей (69 мужчин и 59 женщин) и 42 практически здоровых донора соответствующего возраста. У всех больных диагноз установлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования опухоли согласно «Международной гистологической классификации опухолей человека» (ВОЗ, 2014). Злокачественные опухоли костей выявлены у 108 (84%), пограничные опухоли костей — у 20 (16%) больных. Группа пограничных опухолей костей была представлена гигантоклеточной опухолью кости (ГКО). Группа злокачественных опухолей включала остеосаркому (58), саркому Юинга (15), хондросаркому (29), низкодифференцированную плеоморфную саркому кости (3) и хордому (3).

Определение концентрации ТИМП-1 и ТИМП-2 проводили иммуноферментным методом в образцах сыворотки крови до лечения с помощью реактивов фирмы «R&D» (США). Статистический анализ полученных результатов выполняли с помощью программы «Statistica» 7.0.

Результаты

Содержание ТИМП-1 в сыворотке крови практически здоровых людей (группа контроля) было достоверно ниже, чем у пациентов с пограничной ГКО и саркомами костей (табл. 1). Достоверных

различий в содержании ТИМП-1 в крови пациентов с пограничными и злокачественными опухолями не отметили. Максимальный уровень ТИМП-1 (1299 нг/мл), более чем в 3 раза превышающий наибольшее значение маркера в контроле, выявлен у пациентки в возрасте 26 лет с остеосаркомой низкой степени дифференцировки, локализованной в малоберцовой кости.

Уровни ТИМП-2 в сыворотке крови больных саркомами костей и ГКО были достоверно выше, чем в группе контроля ($p < 0,0001$; см. табл. 1).

Обратная корреляция между уровнями ТИМП-1 и возрастом выявлена только в группе контроля ($r_s = -0,32$; $p = 0,036$), а при новообразованиях костей она отсутствовала. Корреляционной зависимости между уровнями ТИМП-2 в сыворотке крови и возрастом не выявлено.

Анализ взаимосвязи уровней ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови с гистологическим строением сарком костей представлен в табл. 2. При хондросаркоме уровни ТИМП-1 в сыворотке крови были сходны с показателями практически здоровых людей (соответственно 297 и 296 нг/мл по медиане). При других наиболее распространенных вариантах сарком костей (остеосаркома и саркома Юинга) содержание ТИМП-1 в крови было достоверно выше, чем в контрольной группе. Кроме того, концентрация ТИМП-1 была значимо выше при саркоме Юинга по сравнению с остеосаркомой (медианы 442 и 368 нг/мл соответственно; $p = 0,013$).

Показатели ТИМП-2 при всех видах опухолей значимо отличались от таковых в контрольной группе (см. табл. 2), наибольшие значения маркера обнаружены при саркоме Юинга (медиана 165 нг/мл).

Концентрации ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови больных злокачественными опухолями костей значимо не зависели от стадии заболевания, гистологического строения (табл. 3) и степени дифференцировки опухоли.

При сравнении содержания ТИМП-1 в сыворотке крови больных пограничными и злокачественными опухолями в зависимости от их локализации в костях обнаружили значимо меньшие концентрации ТИМП-1 при поражении плоских костей, чем при поражении трубчатых костей (медианы 285 и 359 нг/мл соответственно; $p < 0,05$). Значимых различий в содержании сывороточного ТИМП-2 в зависимости от локализации опухоли в пораженной кости не обнаружено.

Таблица 1. Содержание (нг/мл) ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови больных опухолями костей и группы контроля

Обследованные группы	ТИМП-1			ТИМП-2		
	n	Медиана	25–75%	n	Медиана	25–75%
Контроль ⁰	42	296	232–332	18	60,7	42,2–106
ГКО ¹	20	372	291–487	10	125	102–133
Злокачественные опухоли ²	108	343	290–468	65	128	101–145
p	0 _{vs} 1=0,004; 0 _{vs} 2=0,0001; 1 _{vs} 2>0,05			0 _{vs} 1,2<0,0001; 1 _{vs} 2>0,05		

Таблица 2. Содержание (нг/мл) ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови больных злокачественными опухолями костей с учетом их гистологического строения

Обследованные группы	ТИМП-1			ТИМП-2		
	n	Медиана	25–75%	n	Медиана	25–75%
Контроль ⁰	42	296	232–332	18	60,7	42,2–106
ГКО ¹	20	372	291–487	10	125	102–133
Хордома ¹	3	285	244–292	3	60,7	42,2–106
Хондросаркома ²	29	297	297	24	125	102–133
Саркома Юинга ³	15	442	358–519	4	131	84,0–145
Остеосаркома ⁴	58	368	296–494	33	118	100–143
Недифференцированная плеоморфная саркома кости ⁵	3	368	290–584	1	165	148–182
p	0,3=0,0004; 0,4<0,0001; 2,4=0,003; 3,4=0,013			0,1=0,0005; 0,3,4,5<0,0001; 0,2=0,03; 1,4=0,03; 3,4=0,017; 4,5=0,014		

Таблица 3. Общая и безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями костей в зависимости от уровней ТИМП-1 в сыворотке крови

Фактор	Градация (нг/мл)	n	Медиана срока жизни (мес)	Общая выживаемость (%)			
				1-летняя	3-летняя	5-летняя	10-летняя
ТИМП-1; p=0,16	<343	51	Не достигнута	97,8±2,2	89,1±5,3	89,1±5,3	—
	≥343	54	121,1	91,6±4,0	78,2±6,5	74,3±7,3	49,4±12,1
Фактор	Градация (нг/мл)	n	Медиана срока ремиссии (мес)	Безрецидивная выживаемость (%)			
				1-летняя	3-летняя	5-летняя	10-летняя
ТИМП-1; p=0,11	<343	51	Не достигнута	83,3±5,4	63,8±7,5	63,8±7,5	—
	≥343	54	31,0	81,8±5,5	47,3±7,8	30,7±7,9	24,6±8,4

Коэффициент прослеженности больных злокачественными опухолями костей составил 97%. Под нашим наблюдением на протяжении от 2 до 120 мес от начала специфического лечения находились 105 больных. Пациентов разделили на группы по медиане содержания ТИМП-1 в данной группе (343 нг/мл). Показатели общей и безрецидивной выживаемости в зависимости от уровней ТИМП-1 в крови представлены в табл. 3. Как следует из данных этой таблицы, показатели как общей, так и безрецидивной 3- и 5-летней выживаемости при низких уровнях ТИМП-1 (<343 нг/мл) были выше, чем при высоких (≥343 нг/мл), однако эти различия не достигли уровня статистической значимости.

Анализ общей и безрецидивной выживаемости с учетом гистологического строения опухоли показал, что при остеосаркоме нет различий как в общей, так и в безрецидивной выживаемости с учетом порогового значения ТИМП-1. В то же время при саркоме Юинга все пациенты с низкими уровнями данного маркера (<343 нг/мл) были живы в течение 5 лет наблюдения (общая выживаемость 100%), тогда как в группе с высокими уровнями маркера (≥343 нг/мл) общая 5-летняя выживаемость составила 51,4±17,7% (различие недостоверно, p=0,27). В группе больных хондросаркомой также наблюдали выраженные, но недостоверные различия: 5-летняя

безрецидивная выживаемость составила 78% при низких значениях ТИМП-1 и 53% при высоких концентрациях белка.

В объединенной группе больных злокачественными опухолями костей за исключением остеосаркомы различия безрецидивной выживаемости при концентрациях сывороточного ТИМП-1 ниже и выше 343 нг/мл были статистически значимы: 3-летняя выживаемость снижалась на 27%, 5-летняя – на 60% (p=0,049; см. рисунок).

**Рисунок. Безрецидивная выживаемость в группе больных хондросаркомой, саркомой Юинга, низкодифференцированной плеоморфной саркомой кости и хордомой при уровнях ТИМП-1 ниже и выше 343 нг/мл**

При анализе отдаленных результатов лечения больных злокачественными опухолями костей в зависимости от уровней сывороточного ТИМП-2 максимальные отличия в показателях общей выживаемости пациентов отмечены при концентрации маркера 120 нг/мл ($p=0,09$). Показатели безрецидивной и общей выживаемости в зависимости от данного порогового значения представлены в табл. 4. Как

зависящие от стадии заболевания, гистологического строения, степени дифференцировки и локализации опухоли в костях различного строения. По данным многофакторного анализа, пороговые уровни ТИМП-1 более 343 нг/мл и ТИМП-2 более 120 нг/мл можно рассматривать в качестве значимых и независимых факторов неблагоприятного прогноза общей выживаемости больных саркомами костей.

Таблица 4. Общая и безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями костей в зависимости от уровней ТИМП-2 в сыворотке крови

Фактор	Градация (нг/мл)	n	Медиана срока жизни (мес)	Общая выживаемость (%)			
				1-летняя	3-летняя	5-летняя	10-летняя
ТИМП-2; $p=0,09$	<120	31	Не достигнута	96,6±3,4	96,6±3,4	96,6±3,4	—
	≥120	32	Не достигнута	93,1±4,7	75,8±8,8	75,8±8,8	—
Фактор	Градация (нг/мл)	n	Медиана срока ремиссии (мес)	Безрецидивная выживаемость (%)			
				1-летняя	3-летняя	5-летняя	10-летняя
ТИМП-2; $p=0,39$	<120	31	Не достигнута	90,1±5,4	66,6±8,6	66,6±8,6	—
	≥120	32	Не достигнута	67,1±8,5	53,5±9,9	53,5±9,9	—

следует из данных этой таблицы, 3-летняя общая выживаемость больных при уровне ТИМП-2 в сыворотке крови более 120 нг/мл снижалась на 21%, а безрецидивная — на 13% по сравнению с пациентами с более низкими уровнями ТИМП-2.

При остеосаркоме (32 больных) 3-летняя безрецидивная выживаемость при высоких уровнях сывороточного ТИМП-2 снижалась на 26%, а при хондросаркоме ($n=26$) — на 17% (различия не достигают уровня статистической значимости).

Важно отметить, что при многофакторном анализе общей выживаемости больных саркомами костей повышенные концентрации ТИМП-2 ($p=0,05$) и ТИМП-1 ($p=0,063$) в сыворотке крови оказались сопоставимы по значимости с основным прогностическим фактором — стадией заболевания ($p=0,011$) и были более значимы, чем гистологический вариант строения опухоли (табл. 5). Не выявлено достоверного влияния уровней ТИМП-1 и ТИМП-2 на прогноз безрецидивной выживаемости при многофакторном анализе.

Заключение

Подводя итоги настоящего исследования, можно отметить, что у больных злокачественными и пограничными опухолями костей выявлены достоверно более высокие концентрации ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови по сравнению с контролем, не

Информация об источниках финансирования

Финансовой поддержки в настоящей статье не было.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рогова ЛН, Шестернина НВ, Замечник ТВ, Фастова ИА. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах. Вестник новых медицинских технологий. 2011;18(2):86-89.
2. Маркелова ЕВ, Здор ВВ, Романчук АЛ, Бирко ОН. Матриксные металлопротеиназы: их взаимосвязь с системой цитокинов, диагностический и прогностический потенциал. Иммунология, аллергология, инфектология. 2016;2:11-22.
3. Герштейн ЕС, Кушлинский НЕ. Клинические перспективы исследования ассоциированных с опухолью протеаз и их тканевых ингибиторов у онкологических больных. Вестник Российской академии медицинских наук. 2013;5:16-27.
4. Герштейн ЕС, Кушлинский ДН, Адамян ЛВ, Терешкина ИВ, Лактионов КП. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы в клиническом течении и прогнозе рака яичников. Мол Мед. 2013;6:11-20.
5. Герштейн ЕС, Кушлинский НЕ. Матриксные металлопротеиназы и компоненты системы активации плазминогена в патогенезе и клиническом течении рака толстой кишки. Патогенез. 2013;11(3):4-12.
6. Wang Z, Li Y, Zhou F et al. β -elemene enhances anticancer bone neoplasms efficacy of paclitaxel through regu-

Таблица 5. Связь показателей общей выживаемости больных злокачественными опухолями костей с уровнями ТИМП-1, ТИМП-2, гистологическим вариантом строения опухоли и стадией заболевания

Фактор	Beta±St.Err	t-value	Wald Statistic	p
Стадия	0,83±0,33	2,55	6,49	0,011
Морфологический вариант строения опухоли	0,044±0,08	0,59	0,35	0,55
ТИМП-1 (≥343 нг/мл)	1,99±0,84	2,37	5,61	0,019
ТИМП-2 (≥120 нг/мл)	2,68±1,24	2,16	4,66	0,031

- lation of GPR124 in bone neoplasms cells. *Oncol Lett.* 2018;16(2):2143-2150.
7. Wang Y, Kong D. LncRNA GAS5 Represses Osteosarcoma Cells Growth and Metastasis via Sponging MiR-203a. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45(2):844-855.
 8. Liu Z, Ren Y, Zhu F. Expression of MMP-2 and TIMP-3 with incidence and prognosis of giant-cell tumor of the bone. *Oncol Lett.* 2018;16(1):721-726.
 9. Tsai CH, Yang DY, Lin CY et al. Sphingosine-1-phosphate suppresses chondrosarcoma metastasis by upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 through suppressing miR-101 expression. *Mol Oncol.* 2017;11(10):1380-1398.
 10. Yao M, Wang X, Zhao Y et al. Expression of MMPs is dependent on the activity of mitogen-activated protein kinase in chondrosarcoma. *Mol Med Rep.* 2017;15(2):915-921.
 11. Кушлинский НЕ, Соловьев ЮН, Бабкина ИВ, Герштейн ЕС, Булычева ИВ. Матриксные металлопротеиназы 2, 7, 9 и тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ 1-го типа в сыворотке крови больных опухолями костей. *Бюлл Эксп Биол Мед.* 2010;149(2):194-196.

Статья поступила 01.09.2018 г., принята к печати 18.09.2018 г.
Рекомендована к публикации Е.А. Сушенцовым

Информационная страница

Черномаз Иван Сергеевич, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, г. Москва, аспирант.
Бабкина Ирина Владиславовна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, г. Москва.

Герштейн Елена Сергеевна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, г. Москва.

Кузнецов Игорь Николаевич, кандидат биологических наук, старший лаборант, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, г. Москва.

Булычева Ирина Владиславовна, доктор медицинских наук, врач-патологоанатом, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, г. Москва.

Соловьев Юрий Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, г. Москва.

Алиев Мамед Джавадович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, г. Москва.

Кушлинский Николай Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, г. Москва.

Дополнительные утверждения

Авторы согласны на публикацию представленной работы.
Авторы утверждают, что данная рукопись в настоящее время не представлена для публикации в другие издания и не была принята для публикации в других изданиях.

METALLOPROTEINASES 1, 2 AND THEIR TISSUE INHIBITORS SERUM LEVEL IN BONE TUMOR PATIENTS

Chernomaz I.S., Babkina I.V., Gershtein E.S., Kuznetsov I.N., Boulytcheva I.V., Soloviev Yu.N., Aliev M.D., Kushlinskii N.E.

FSBI «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Health Ministry of Russia; 115478, Moscow, Kashirskoe shosse, 24

Key words: TIMP-1, TIMP-2, bones tumors, overall survival, prognosis

Background. Numerous studies have proved the participation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in the pathogenesis of diseases of various etiologies, including in tumor transformation, as well as in the processes of invasion and metastasis. The involvement of TIMP-1 and TIMP-2 in the processes of growth and progression of osteosarcoma was demonstrated in the U-2OS, MG-63 and OS-732 cell lines. There are small amount of clinical studies for bones tumors, but they show differences in expression of MMP and TIMP in the tumor and surrounding tissues, both in borderline and malignant bones tumors.

Aim of the study. The study of the content of tissue inhibitors of MMPs TIMP-1 and TIMP-2 type in the most accessible biological material – the blood serum of patients with primary malignant and borderline neoplasm of bones and apparently healthy people of the corresponding age to identify a possible relationship with the morphological tumor's structure and the prognosis of the disease.

Materials and methods. 128 patients with bone tumors (69 men and 59 women) and 42 apparently healthy donors of the corresponding age were examined. The diagnosis of all patients, it was established for the first time and confirmed by histological examination of the tumor. Malignant bones tumors were diagnosed in 108 (84%), borderline bones tumors – in 20 (16%) patients. The studies were performed by an enzyme immunoassay TIMP-1, TIMP-2 in the blood serum of patients before the start of a specific treatment with the help of ready-made reagent kits of the firm «R&D» (USA).

Results. In patients with malignant and borderline bone tumors, significantly higher concentrations of TIMP-1 and TIMP-2 were found in the blood serum than in the control, independent of the stage of the disease, histological structure, degree of differentiation and tumor localization in bones of various structures. According to the multivariate analysis, the threshold levels of TIMP-1 greater than 343 ng/ml and TIMP-2 greater than 120 ng/ml can be considered as significant and independent factors predicting the overall survival of patients with bone sarcomas.

Conclusion. The obtained results testify to the prospects of further study of TIMP-1 and TIMP-2 in peripheral blood at bones neoplasm for study the possibility of using them as markers of disease prognosis.