

І.І. Ганусевич

С.В. Вірко

А.П. Бурлака

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: рак молочної
залози, жирова тканина,
желатинази, супероксидні
радикали, маркери прогресії.

МАТРИКСНІ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ-2 ТА -9 ЯК РЕДОКС-ЗАЛЕЖНІ МАРКЕРИ МЕТАСТАЗУВАННЯ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Визначення прогностичних чинників є ключовим моментом для оцінки агресивності раку молочної залози (РМЗ), індивідуального прогнозу та вірогідної відповіді на проведені лікування. Матриксні металопротеїнази (ММП) -2 та -9 (желатинази) є редокс-залежними молекулами, які забезпечують протеолітичну деградацію міжклітинного матриксу та сигналінг на кожному з етапів метастатичного каскаду. **Мета:** дослідити зв'язок редокс-залежної активації желатиназ з метастазуванням, рівні активності ММП-2 і -9 у жировій тканині (ЖТ) хворих на РМЗ з ожирінням та у сироватці хворих на РМЗ з різним гормонорецепторним статусом пухлин. **Об'єкт і методи:** досліджено кров, пухлинну та ЖТ 116 хворих на РМЗ стадій I–IV. Використано методи зимографії в поліакриламідному гелі, електронно-парамагнітного резонансу, статистичні. **Результати:** у регуляції деструкції міжклітинного матриксу під час прогресії РМЗ задіяні супероксидні радикали (СР), які здійснюють контроль активності желатиназ. Рівні швидкості генерування СР та активності ММП-2 та -9 в пухлині корелюють між собою, із стадіями та регіонарним метастазуванням РМЗ. Рівні активності желатиназ у ЖТ молочної залози у хворих на РМЗ базального молекулярного підтипу з ожирінням залежать від об'єму ЖТ та відстані її розташування від пухлини. Виявлено порушення окисно-відновного стану нейтрофілів та функціонування желатиназ у сироватці крові хворих на РМЗ репродуктивного віку, які залежать від гормонального статусу жінки, проявляються зростанням рівнів СР та активності ММП-9 при ER/PR-статусі пухлини та можуть впливати на перебіг захворювання і виживаність хворих. **Висновки:** показники активності желатиназ, визначені в пухлині та крові, є перспективними маркерами прогресії РМЗ, зокрема для хворих з надмірною масою тіла та/або репродуктивного віку з певним гормональним статусом.

Рак молочної залози (РМЗ) є надзвичайно розповсюдженою онкологічною патологією; у розвинених країнах захворювання вражає майже кожен десяту жінку і займає одне з перших місць у структурі захворюваності жіночого населення на рак. РМЗ є одним з найпоширеніших онкологічних захворювань в Україні та світі. Показник захворюваності на РМЗ постійно підвищується і наразі становить більше 60 випадків на 100 тис. жіночого населення, хоча показник смертності має тенденцію до зниження [1, 2]. Однією з основних причин збільшення кількості хворих онкологічного профілю є зростання популяції осіб похилого віку, ризик захворіти на РМЗ у віці >65 років у 150 разів перевищує такий у осіб віком <30 років.

У тих країнах, де вдалося досягти зниження показників смертності від РМЗ, це відбувається за рахунок осіб молодого та середнього віку. Покращенням показників виживаності хворих на РМЗ

ми зобов'язані більш ранній діагностиці та вдосконаленню методів лікування. Тому визначення прогностичних чинників є ключовим моментом для оцінки агресивності захворювання, індивідуального прогнозу та вірогідної відповіді на проведену терапію [1, 2].

Панель прогностичних факторів для РМЗ постійно розширюється. Наразі найбільш значущими вважають наступні клініко-морфологічні та біологічні прогностичні чинники: стадію захворювання, розмір пухлини, стан країв резекції та наявність пухлинних клітин у лімфатичних та кровоносних судинах, інфільтрацію оточуючих тканин, статус регіонарних лімфатичних вузлів (РЛВ), наявність місцевого рецидиву і віддалених метастазів (поодинокі, множинні) та їх локалізацію (кісткові, вісцеральні, ураження центральної нервової системи), гістологічний тип і ступінь гістологічної злоякісності пухлини, рецепторний статус (рівень експресії

рецепторів до естрогенів (estrogen receptors — ER), прогестерону (progesterone receptor — PR) та епідермального фактора росту (HER2/new), Ki-67, фракцію S-фази, плідність, p53, bcl-2, рівень катепсину D, активність ангиогенезу та ін. Предиктивні молекулярно-біологічні маркери РМЗ, які сьогодні досліджують, визначаються факторами, що залучені до патологічних процесів, і в сукупності визначають здатність клітини до злоякісного росту; найважливішими серед них є ER та PR, прогностичне значення яких пов'язане перш за все з високою чутливістю ER- та PR-позитивних пухлин до гормональної терапії антиестрогеновими препаратами [3, 4].

На сьогодні відомо, що ожиріння як основний симптом метаболічного синдрому підвищує ризик виникнення та несприятливого перебігу деяких видів раку, зокрема і РМЗ. Жирова тканина (ЖТ) молочної залози — мамарна ЖТ, представлена неоднорідною популяцією клітин — адипоцитами, ендотеліальними клітинами, макрофагами, перицитами і попередниками адипоцитів. За умов наявності надмірної ваги ЖТ характеризується зміненим метаболізмом та ознаками хронічного запалення, які виявляють себе зміною секреції адипокінів, стимуляцією продукції прозапальних цитокінів, активацією ліполізу, дисфункцією мітохондрій, формуванням гіпоксії [1, 2]. Гіпертрофована дисфункціональна ЖТ при ожирінні впливає на мікрооточення пухлини та в результаті — на перебіг пухлинної прогресії. Відтак, дослідження характеристик ЖТ в якості прогностичних маркерів при онкологічних захворюваннях є актуальним [5–7].

Необхідно зважати на те, що РМЗ — неоднорідна група пухлин, які відрізняються за морфологією, клінічним перебігом та чутливістю до лікування. Досягнення сучасної молекулярної біології представляють широкий спектр онкомаркерів, що дають можливість прогнозувати перебіг захворювання, безрецидивну та загальну виживаність та контролювати ефективність терапії. Але для клінічного використання рекомендовано незначну кількість біомаркерів. Кореляція між деякими імуногістохімічними маркерами лежить в основі клінічних рекомендацій щодо ад'ювантної терапії РМЗ. Багато з них є інформативними, доступними, але не пов'язані з деякими клініко-патологічними показниками, не мають визначених порогових рівнів, можуть спричинити гіпердіагностику, тобто загалом не відображають індивідуальних особливостей пухлини та організму пацієнта [3, 4].

Редокс-стан, або редокс-баланс — це ступінь окиснення тканин. Він регулює експресію генів, змінює стабільність білків, модулює клітинні програми. Зміна редокс-стану пов'язана з агресивністю злоякісних пухлин і є основною ознакою канцерогенезу. Порушення редокс-стану є ключовим фактором виживання клітин у мікрооточенні як пухлин, так і метастазів, та може спричинити прогресування раку. Мітохондрії — основні редокс-формуючі органели

в клітині, вони генерують супероксидні радикали (СР) та NO. У міжклітинному просторі редокс-стан формується витоком активних форм кисню (АФК) з клітин та мігрованими нейтрофілами, макрофагами. Сучасні дослідники вважають, що нові терапевтичні стратегії будуть базуватися на тонкому регулюванні АФК-залежної внутрішньоклітинної сигналізації з метою блокування АФК-залежних ініційованих пухлиною подій та активації АФК-залежного шляху апоптозу. До таких редокс-залежних подій належать активація низки ферментів, яка може регулюватися як на рівні синтезу, так і на рівні переходу латентних форм ферментів у активні [8].

Важливим етапом злоякісної трансформації є набуття пухлиною здатності до інвазії та метастазування, яка досягається шляхом поступової реорганізації цитоскелету, делокалізації молекул клітинної адгезії, зменшення сили міжклітинних зв'язків та деградації екстрацелюлярного матриксу. Відомо, що матриксні металопротеїнази (ММП) -2 та -9 забезпечують протеолітичну деградацію міжклітинного матриксу на кожному з етапів метастатичного каскаду — відокремленні пухлинної клітини від первинної пухлини, її інвазії, інтравазації, екстравазації, формуванні метастатичних вузлів у віддалених органах та тканинах. Але дуже важливою є сигнальна функція желатиназ, яка полягає в протеолітичній модифікації різноманітних цитокінів, факторів росту, рецепторів та молекул, задіяних у розповсюдженні пухлинних клітин [9].

Таким чином, ММП як прямо, так і опосередковано, є молекулами супроводу пухлинної прогресії. Тож формування агресивного фенотипу пухлини базується на нестабільності геному клітин та відповідному сигналінгу для забезпечення інвазії та метастазування пухлини, які супроводжуються протеолітичною деградацією міжклітинного матриксу. При цьому, як відомо, естроген та низка його метаболітів здатні впливати на окисно-відновний баланс тканин. Тому показники редокс-стану та деградації міжклітинного матриксу можуть бути перспективними маркерами перебігу РМЗ [10, 11].

Мета роботи — дослідити зв'язок редокс-залежної активації желатиназ з метастазуванням, рівні активності ММП-2 і -9 в ЖТ хворих на РМЗ з ожирінням та у сироватці хворих на РМЗ з різним гормоно-рецепторним статусом пухлин.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження виконано на матеріалі, отриманому від 116 хворих на РМЗ I–IV стадій захворювання (стадія I — 22, II — 43, III — 34, IV — 17 пацієнток), які проходили лікування в Національному інституті раку. У 14,6% хворих відмічали віддалені метастази, 78,45% — регіонарні метастази. Середній вік хворих становив $58,2 \pm 7,4$ року. За розрахованим показником індексу маси тіла (ІМТ) 62 хворих мали нормальну (ІМТ < 25 кг/м²), 54 — надлишкову масу тіла

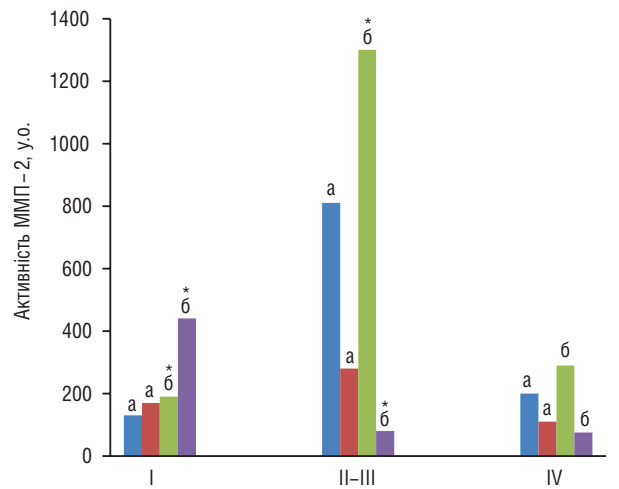
(ІМТ ≥ 25 кг/м²). Усі пацієнтки надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні.

Досліджено: зразки пухлинної тканини 70 хворих на РМЗ стадій I–IV; зразки ЖТ молочної залози (взятої на відстані 1 см та 5 см від пухлини) 26 хворих на РМЗ базального підтипу стадій I–III; зразки крові 40 хворих на РМЗ стадій II–III в репродуктивному ($33,0 \pm 6,0$ років) та 42 хворих на РМЗ в постменопаузальному ($57,0 \pm 5,0$ років) віці.

Швидкість генерування СР мітохондріями клітин та нейтрофілами крові визначали методом ЕПР за кімнатної температури з використанням спінового уловлювача TEMPONE-H («Sigma»); NO-генеруючу активність — методом ЕПР з використанням технології Spin Traps за температури 77 К (спіновий уловлювач — диетилдитіокарбамат) [12]. Активність желатиназ (ММП-2 та -9) в пухлині, ЖТ та сироватці крові визначали методом зимографії на основі SDS-електрофорезу білків [13]. Для визначення ІМТ використовували антропометричний метод (маса тіла, зріст). ІМТ визначали за формулою, описаною в роботі [14]. Вживаність хворих аналізували за методом Каплана — Мейера з використанням log-rank критерію.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

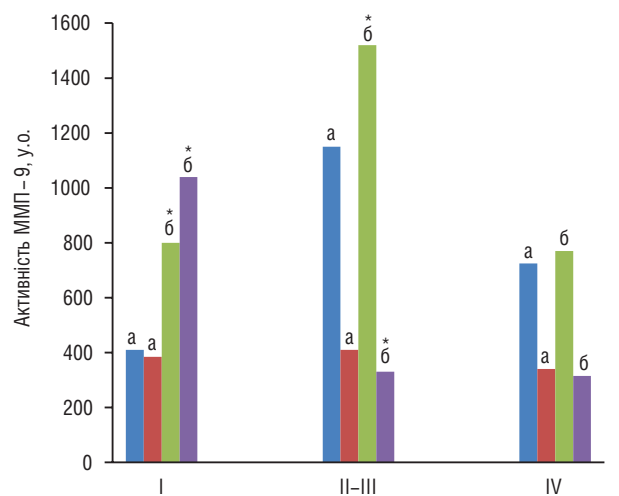
З метою вивчення ролі в метастазуванні редокс-залежної активації желатинази ми дослідили зміни активності ММП-2 і -9 в пухлинах 70 хворих на РМЗ I–IV стадій за умов впливу додаткового джерела СР (рис. 1, 2). Інкубація гомогенізованої пухлинної тканини хворих на РМЗ I стадії з нейтрофілами, що генерували СР зі швидкістю $3,62$ нмоль/10³клітин·хв, призвела до значного (в 1,25–3,0 рази) ($p < 0,05$) зростання рівнів як активних, так і латентних форм ММП-2 та -9. У пухлинній тканині хворих на РМЗ II–III стадій після інкубації з нейтрофілами збільшилася продукція активних (в 1,25–1,6 рази), але зменшилася продукція латентних форм желатиназ (в 1,25–2,7 рази). Інкубація за тих самих умов пухлинної тканини хворих на РМЗ IV стадії з віддаленими метастазами майже не вплинула на рівні активних і латентних форм обох ферментів. Таким чином, потенціал активності желатиназ в пухлинній тканині на I стадії захворювання реалізується за рахунок O₂-регуляції як на рівні синтезу, так і на рівні активації латентних форм ферментів. На II–III стадіях захворювання, коли, як відомо, відбувається дисемінація пухлинних клітин, активність желатиназ зростає шляхом O₂-активації латентних форм. IV стадія пухлинного процесу, за якої наявні віддалені метастази, характеризується відсутністю відповіді досліджуваних ферментних систем у пухлині на дію СР, що свідчить про виснаженість систем синтезу латентних форм ММП та/або їх окисне пошкодження за умов наявності сформованих метастазів. Виявлено корелятивні залежності між активністю ММП-2 та -9 і швидкістю генерування мітохондріальних СР в тканині РМЗ ($r = 0,52$ та $r = 0,49$ від-



■ Активна ММП-2 до інкубації ■ Активна ММП-2 після інкубації
■ Латентна ММП-2 до інкубації ■ Латентна ММП-2 після інкубації

Рис. 1. Активність ММП-2 в пухлинній тканині хворих на РМЗ стадій I, II–III, IV (з віддаленими метастазами) до (а) та після (б) інкубації з нейтрофілами, що генерували СР зі швидкістю $3,62$ нмоль/10³клітин·хв

* $p < 0,05$ порівняно з вихідними рівнями



■ Активна ММП-9 до інкубації ■ Активна ММП-9 після інкубації
■ Латентна ММП-9 до інкубації ■ Латентна ММП-9 після інкубації

Рис. 2. Активність ММП-9 в пухлинній тканині хворих на РМЗ стадій I, II–III, IV (з віддаленими метастазами) до (а) та після (б) інкубації з нейтрофілами, що генерували СР зі швидкістю $3,62$ нмоль/10³клітин·хв

* $p < 0,05$ порівняно з вихідними рівнями

повідно; $p < 0,05$) (рис. 3, 4). Отримані результати свідчать про редокс-регуляцію активності ММП-2 та -9 на етапах інвазії, дисемінації пухлинних клітин та утворення віддалених метастатичних вузлів.

Отримані дані дозволяють стверджувати, що в поетапній регуляції деструкції міжклітинного матриксу в процесі метастазування РМЗ задіяні O₂. Останні як молекули-месенджери через відповідні сигнальні шляхи здійснюють контроль активності желатиназ як на рівні синтезу, так і на рівні активації ферментів [15].



Рис. 3. Залежність рівнів активності ММП-2 від швидкості генерування мітохондріальних СР у тканині РМЗ ($r = 0,52$; $p < 0,05$)



Рис. 4. Залежність рівнів активності ММП-9 від швидкості генерування мітохондріальних СР в тканині РМЗ ($r = 0,49$; $p < 0,05$)

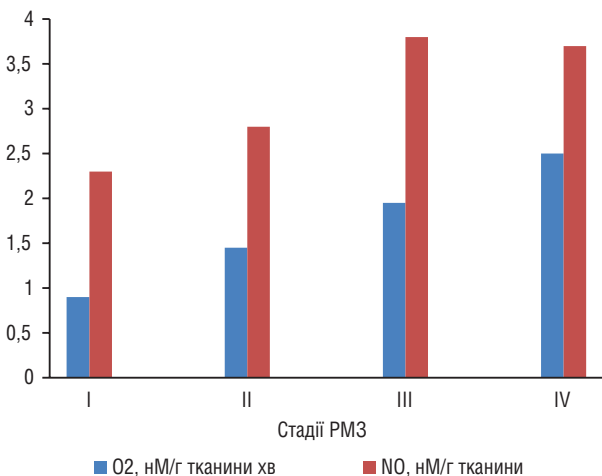


Рис. 5. Швидкість генерування СР та вміст NO в пухлинній тканині хворих на РМЗ різних стадій

Показано, що швидкість генерування СР мітохондріями клітин РМЗ підвищується зі збільшенням стадії пухлинної прогресії в діапазоні від $0,65 \pm 0,19$ до $2,5 \pm 0,26$ нмоль/г сирової тканини \cdot хв. (норма $0,25 \pm 0,18$ нмоль/г сирової тканини \cdot хв.), а рівень NO зростає від $2,1 \pm 0,22$ нмоль/г сирової тканини в пухлинах хворих з I стадією до $3,5 \pm 0,31$ нмоль/г сирової тканини в пухлинах хворих IV стадії захворювання (норма $1,5 \pm 0,15$ нмоль/г сирової тканини) (рис. 5).

Активність желатиназ у пухлинній тканині підвищується у пацієнток з РМЗ II стадії ($p < 0,05$), дося-

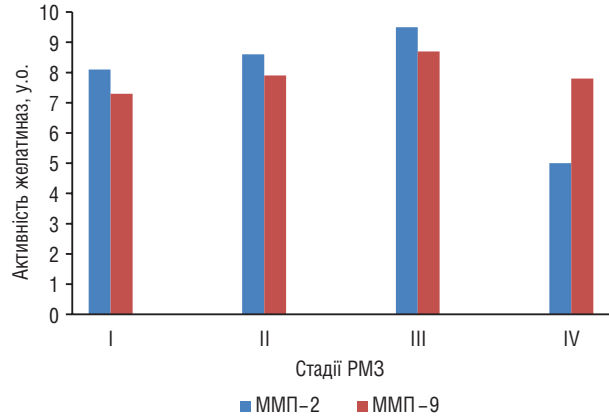


Рис. 6. Активність желатиназ у пухлинній тканині хворих на РМЗ різних стадій

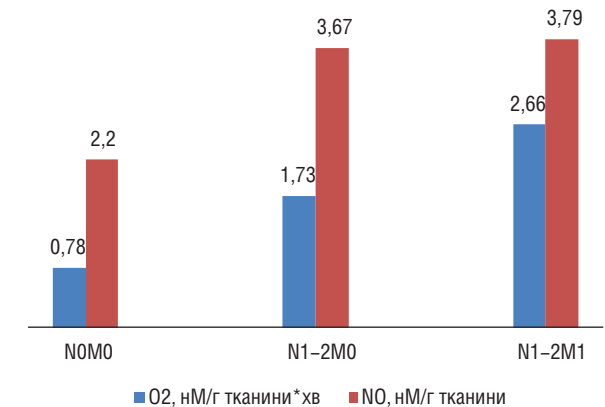


Рис. 7. Швидкість генерування СР, вміст NO та метастазування РМЗ

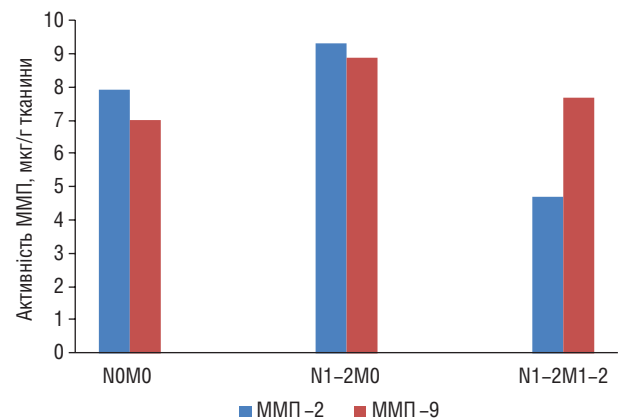


Рис. 8. Рівні активності желатиназ у пухлинній тканині та метастазування РМЗ

гає максимальних значень при РМЗ III стадії і дещо знижується при IV стадії захворювання (рис. 6).

Показано також (рис. 7), що в тканині РМЗ хворих з віддаленими метастазами (категорії N0-2M1-2) швидкість генерування СР в 1,5 раза достовірно вища, ніж такий показник у пухлинах пацієнток з метастазами лише в регіонарні лімфатичні вузли (категорії N1-2M0), і майже в 3,5 раза ($p < 0,05$) — ніж у пухлинах хворих без метастазів (категорії N0M0). Рівні NO в пухлинах хворих з віддаленими метастазами і з метастазами лише в регіонарні лімфатичні вузли також значно (у 1,7 раза) перевищу-

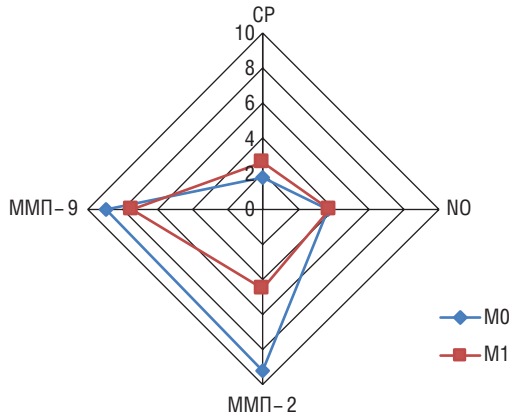


Рис. 9. Редокс-стан та метастазування РМЗ

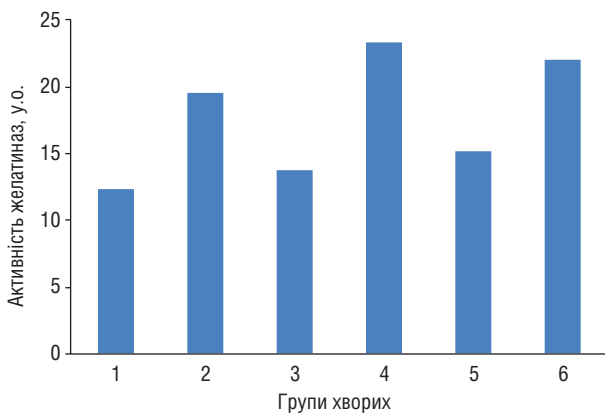


Рис. 10. Активність ММП-2 та -9 (сумарна) в ЖТ хворих на РМЗ з ожирінням: 1 — на відстані 5 см від пухлини; 2 — на відстані 1 см від пухлини; 3 — на відстані 1 см від пухлини при об'ємі ЖТ <21%; 4 — на відстані 1 см від пухлини при об'ємі ЖТ >21%; 5 — на відстані 1 см від пухлини без ЦД II типу; 6 — на відстані 1 см від пухлини при ЦД II типу

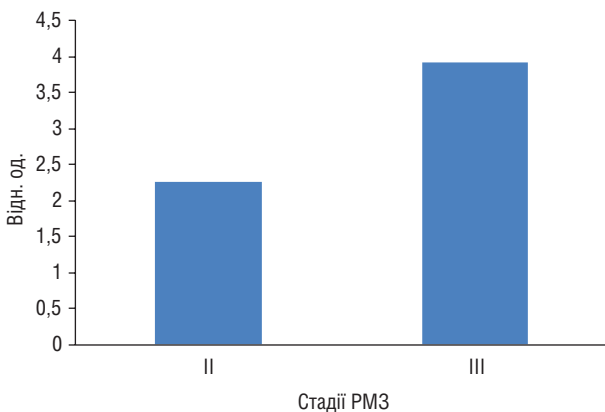


Рис. 11. Рівень хінонів та убісемінонів у крові хворих залежно від стадії РМЗ

ють такі в пухлинній тканині хворих без метастазів ($p < 0,05$). Визначено, що швидкість генерування СР і рівні NO позитивно корелюють з показниками регіонарного ($r = 0,59$ і $0,67$ відповідно; $p < 0,05$) і віддаленого ($r = 0,72$ і $0,48$ відповідно; $p < 0,05$) метастазування РМЗ.

Проаналізовано зв'язок між активністю желатиназ у РМЗ і рівнем його метастазування. Незважаючи на те, що концентрації активних форм желатиназ в пухлині при категорії N1–2 вищі за такі при кате-

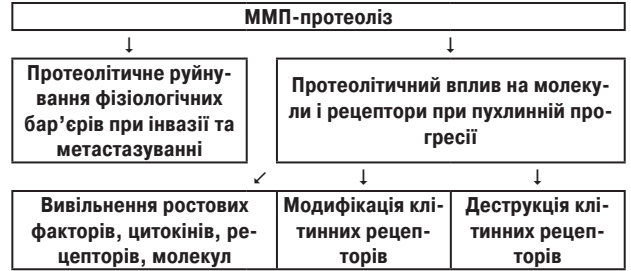


Рис. 12. Функції ММП

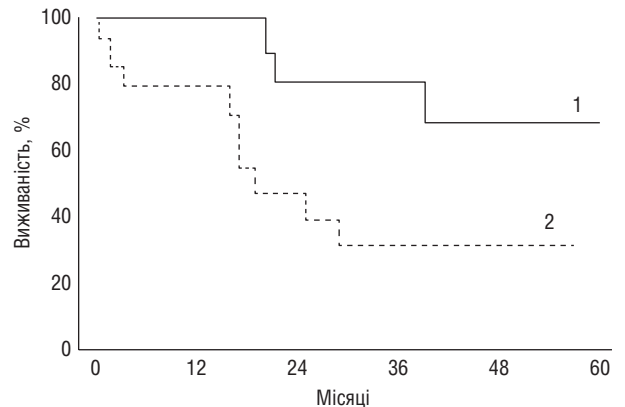


Рис. 13. Загальна виживаність хворих на РМЗ стадій II–III залежно від рівня активності ММП-9 у сироватці крові

горії N0, достовірної різниці між ними не виявлено ($p > 0,05$). При цьому концентрація активної форми ММП-2 знаходиться в зворотній залежності від категорії M, тобто у хворих без віддалених метастазів активність ММП-2 майже в 2 рази перевищує таку у хворих з їх наявністю ($p < 0,05$) (рис. 8). Максимальна активація латентних форм ММП-2 в пухлинах при M0 свідчить про значне посилення деструкції позаклітинного матриксу на тому етапі розвитку пухлини, коли віддалені метастази клінічно не виявлені, тобто, ймовірно, відбувається їх формування та/або дисемінація пухлинних клітин. Отримані результати співвідносяться з даними про здатність пухлини через відповідні сигнальні шляхи заздалегідь (попередньо) створювати сприятливе мікрооточення в так званих преметастатичних нішах [16, 17].

Тобто за наявності віддалених метастазів для пухлини характерні високі показники швидкості генерування СР і рівнів NO, але низькі показники активності ММП-2 і -9 (рис. 9). Редокс-регуляція за зворотною залежністю («down-regulation») ММП може бути пояснена дезінтеграцією сигнальних шляхів і внаслідок цього руйнуванням регуляторних зв'язків на рівні синтезу та постсинтетичної активації ферментів, які відбуваються за надвисоких швидкостей генерування супероксидних радикалів і посилення окисних процесів, характерних для термінальної стадії пухлинного процесу при вторинному метастазуванні.

Відомо, що гіпертрофована і дисфункціональна ЖТ як при ожирінні, так і при цукровому діабеті (ЦД) II типу, характеризується високими рівнями генерування СР, посиленням окисних і запальних

процесів, хронічною гіпоксією, активацією ліполізу та ін. Пухлинна тканина, що перебуває в стані хронічного запалення і зміненого редокс-метаболізму, здатна перепрограмувати адипоцити в пухлино-асоційовані. Взаємовплив між пухлиною та ЖТ спричиняє прогресування онкологічного захворювання. Дисбаланс редокс-стану ЖТ в сучасних дослідженнях пов'язують з поглибленням окисно-відновного дисбалансу, гіпоксії, посиленням гліколізу та, зрештою, з агресивністю та метастатичним потенціалом злоякісних пухлин [18, 19].

У зв'язку з вищенаведеними фактами нами визначено рівні активності желатиназ у ЖТ хворих на РМЗ базального підтипу з ожирінням залежно від відстані до локалізації пухлини, від об'єму ЖТ в молочних залозах та від наявності у хворих ЦД II типу (рис. 10).

Встановлено, що в прилеглій ЖТ (на відстані 1 см від пухлини) рівень сумарної активності ММП-2 та -9 в 1,6 раза ($p < 0,05$) перевищує такий в ЖТ, розташованій на відстані 5 см від пухлини. Виявлено також, що великий об'єм ЖТ в молочній залозі (>21%) асоційований з достовірно вищими рівнями сумарної активності желатиназ. У ЖТ на фоні порушення вуглеводного обміну сумарна активність ферментів є достовірно вищою порівняно з хворими без ЦД II типу. Отримані дані свідчать про високий рівень протеолізу позаклітинного матриксу, що ним характеризується прилегла до пухлини, гіпертрофована та метаболічно змінена ЖТ хворих на РМЗ. Механізми такої активації, вірогідно, пов'язані з посиленням окисно-відновного дисбалансу, притаманного такій тканині, та здатні впливати на мікрооточення, ступінь агресивності та, у підсумку, на метастазування пухлини.

Раніше нами показано, що рівні супероксид-генеруючої активності нейтрофілів та рівні NO у хворих на РМЗ репродуктивного та постменопаузального віку з ER^+/PR^+ та ER^-/PR^- пухлин багаторазово достовірно перевищують такі показники у донорів [20]. Це є наслідком посилення активності НАДФН-оксидази та iNOS нейтрофілів і відображає високий рівень окисно-відновного дисбалансу в організмі. При цьому рівні генерування СР у крові хворих постменопаузального віку майже у 2,0 раза достовірно вищі, ніж у пацієнток репродуктивного віку. Також було визначено, що рівні активності ММП-2 у сироватці крові пацієнток у період постменопаузи з пухлинами ER^-/PR^- -статусу в 3,0–6,0 раза достовірно вищі за такі в інших групах хворих. Активність ММП-9 у хворих з ER^-/PR^- -статусом РМЗ як репродуктивного, так і постменопаузального віку перевищує цей показник у пацієнток з ER^+/PR^+ гормонорецепторним статусом відповідно у 3,0 та 2,7 раза [20]. Отримані результати підтверджують дані інших авторів, які також свідчать про асоційованість високих рівнів ММП-9 з ER^+/PR^+ -статусом РМЗ. Такий зв'язок може бути результатом гормонозалежного редокс-

контролю активності желатиназ [21, 22], який додатково проілюстровано вищенаведеними даними щодо генерування СР. З іншого боку, можливо, навпаки, відбувається вплив желатиназ на гормонорецепторний статус пухлин.

Цікаво, що у крові хворих на РМЗ постменопаузального віку з ER^-/PR^- -статусом пухлин виявлено також метаболіти естрогенів — хінони та убісеміхінони ($g = 2,00$), високий рівень вмісту останніх достовірно асоційований зі стадією захворювання (рис. 11).

Вище вказувалося на те, що желатинази здатні руйнувати фізичні бар'єри на шляху дисемінуючих пухлинних клітин, що визначає їх ключову роль у метастазуванні. Але упродовж останніх років у ході багатьох досліджень доведено, що участь цих молекул у пухлинній прогресії значно ширша. Зокрема, вони чинять протеолітичний вплив на молекули і рецептори при пухлинній прогресії і таким чином виступають як регуляторні фактори [23].

При цьому може відбуватися протеолітичне відщеплення та вивільнення низки факторів росту, цитокінів, рецепторів та молекул, задіяних у пухлинній прогресії. Наприклад, васкулярно-ендотеліальний фактор росту в неактивному стані зв'язаний з судинним ендотелієм, ММП шляхом протеолізу розривають цей зв'язок, молекула васкулярно-ендотеліального фактора росту вивільняється та активується [23].

ММП забезпечують протеолітичне ремодулювання деяких рецепторів. Зокрема, рецепторів тромбоцитів у процесі їх агрегації з циркулюючими пухлинними клітинами, чим сприяє їх виживаності в судинному руслі [24–26]. Також відомо про те, що ММП можуть руйнувати рецептори. Показано, що вони дезактивують рецептори пухлино-інфільтруючих лімфоцитів і таким чином впливають на імунну відповідь [26, 27]. Можливо, такий механізм лежить в основі взаємозв'язку між рівнями ММП, естрогенів та їх рецепторів (рис. 12). Таким чином, желатинази супроводжують дисемінацію пухлинних клітин не лише в межах подолання ними фізичних перешкод, але і в якості молекул-регуляторів процесу метастазування.

Нами досліджено загальну виживаність хворих на РМЗ залежно від рівнів активності желатиназ у сироватці крові і показано, що пацієнтки, у яких активність ММП-9 нижча від медіани, живуть достовірно довше та мають нижчий ризик несприятливого перебігу захворювання, ніж ті, у яких виявлено високі рівні активності ММП-9 (рис. 13).

Хінони та убісеміхінони є метаболітами естрогенів, які утворюються під час гідроксилювання, тобто окиснення гідроксильної групи цих гормонів. Крім того, естрогени можуть метаболізувати до катехолів, які окиснюються до хінонів та убісеміхінонів [28]. У результаті рівень метаболітів, які є джерелом генерування СР, зростає, що спричиняє порушення редокс-стану крові, що, у свою чергу може

викликати окисне пошкодження генів. Активация редокс-залежної регуляції призводить і до посилення деструкції позаклітинного матриксу. Таким чином, накопичення СР, NO, хінонів та убисеміхінонів, зокрема в постменопаузальний період, у тому числі і при застосуванні гормонозамісної терапії, може спричиняти розвиток окиснювального рециклінгу, що зумовлює підвищення ризику розвитку РМЗ та його несприятливого перебігу у жінок в період постменопаузи.

ВИСНОВКИ

1. У регуляції деструкції міжклітинного матриксу під час прогресії РМЗ задіяні супероксидні радикали, які, вірогідно, як молекули-месенджери, здійснюють контроль активності желатиназ.

2. Рівні швидкості генерування СР та активності желатиназ (ММП-2 та -9) в пухлині, які є, відповідно, характеристиками її редокс-стану та деструкції міжклітинного матриксу, корелюють між собою, із стадіями та регіонарним метастазуванням РМЗ.

3. Рівні активності желатиназ у ЖТ молочної залози у хворих на РМЗ базального молекулярного підтипу з ожирінням залежать від таких локальних характеристик мамарної ЖТ як її об'єм та відстань від пухлини. Встановлені закономірності доводять, що ожиріння та цукровий діабет впливають на перебіг РМЗ і мають враховуватися під час прогнозування з метою індивідуалізації лікування цих хворих.

4. Виявлено порушення СР-активності нейтрофілів та функціонування желатиназ у сироватці крові хворих на РМЗ репродуктивного віку, які залежать від гормонального статусу жінки, проявляються зростанням рівнів СР та активності ММП-9 при ER-/PR-статусі пухлини та можуть впливати на перебіг захворювання і виживаність хворих.

5. Показники активності желатиназ, визначені в пухлинній тканині та крові, є перспективними маркерами прогресії РМЗ, зокрема для хворих з надмірною масою тіла та/або репродуктивного віку, певного гормонального статусу.

Робота виконувалася в рамках НДР «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (0117U002034) за фінансової підтримки Цільової програми наукових досліджень Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології Національної академії медичних наук України «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (2017–2021).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Rositch AF, Unger-Saldana K, DeBoer RJ, *et al.* The role of dissemination and implementation science in global breast cancer control programs: Frameworks, methods, and examples. *Cancer* 2020; **126** (Suppl 10): 2394–404.

2. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, *editors.* World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon, France:

International Agency for Research on Cancer 2020. Available from: <http://publications.iarc.fr/586>.

3. Ginsburg O, Yip CH, Brooks A, *et al.* Breast cancer early detection: A phased approach to implementation. *Cancer* 2020; **126** (Suppl 10): 2379–93.

4. Mutebi M, Anderson BO, Duggan C, *et al.* Breast cancer treatment: A phased approach to implementation. *Cancer* 2020; **126** (Suppl 10): 2365–78.

5. Goossens GH, Blaak EE. Adipose tissue dysfunction and impaired metabolic health in human obesity: a matter of oxygen. *Front endocrinol (lausanne)* 2015; **6** (55): 1–5.

6. Colditz G, Peterson L. Obesity and Cancer: Evidence, Impact, and Future Directions. *Clinical Chemistry* 2018; **64** (1): 154–62.

7. Reaves DK, Ginsburg E, Bang JJ, *et al.* Persistent organic pollutants & obesity: potential mechanisms for breast cancer promotion? *Endocr relat cancer* 2015; **22** (2): 69–86.

8. Choi TG, Kim SS. Physiological functions of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Free Radical Medicine and Biology* 2019; DOI: 10.5772/intechopen.88386.

9. Mohammadian H, Sharifi R, Rezanezhad Amirdehi S, *et al.* Matrix metalloproteinase MMP1 and MMP9 genes expression in breast cancer tissue. *Gene Reports* 2020; DOI: 10.1016/j.genrep.2020.100906.

10. Martins LM, de Melo Escorcio Dourado CS, Campos-Verdes LM, *et al.* Expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer and breast fibroadenoma: a randomized, double-blind study. *Oncotarget* 2019; **10** (64): 6879–84.

10. Perillo B, Di Donato M, Pezone A, *et al.* ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med* 2020; **52**: 192–203.

11. Burlaka AP, Sidorik EP, Ganusevich II, *et al.* High formation of superoxide anion and nitric oxide, and matrix metalloproteinases activity in vascular wall of rectal carcinoma vessels. *Exp Oncol* 2006; **28**: 323–5.

12. De Clerk YA, Perez N, Shimada H, *et al.* Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer research* 1992; **52**: 701–8.

13. Nuttall FQ. Body Mass Index Obesity, BMI, and Health. *Nutrition Research*, 2015; **50** (3): 117–28.

14. Ghouse SM, Vadrevu SK, Manne S, *et al.* Therapeutic targeting of vasculature in the premetastatic and metastatic niches reduces lung metastasis. *J Immunol* 2020; DOI: 10.4049/jimmunol.1901208.

15. Wang Y, Ding Y, Guo N, Wang S. MDSCs: key criminals of tumor pre-metastatic niche formation. *Front Immunol* 2019; **10**: 172.

16. Wu H, Ballantyne CM. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circulation Research* 2020; **126**: 1549–64.

17. Nurul M, Hussain AS, Sarwar S, *et al.* How the association between obesity and inflammation may lead to insulin resistance and cancer. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 2019; **13** (2): 1213–24.

18. Burlaka AP, Ganusevich II, Vovk AV, *et al.* Prognostic value of blood redox-state indicators in patients with breast cancer. *Oncology* 2018; **20** (1): 17–22 (in Ukrainian).

19. Merlo S, Sortino MA. Estrogen activates matrix metalloproteinases-2 and -9 to increase beta amyloid degradation. *Mol Cell Neurosci* 2012; **49** (4): 423–9.

20. Morales-Vásquez F, Castillo-Sánchez R, Gómore MJ, *et al.* Expression of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 is associated to the presence of androgen receptor in epithelial ovarian tumors. *J Ovarian Res* 2020; DOI: 10.1186/s13048-020-00676-x.

21. Quintero-Fabián S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, *et al.* Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer. *Front Oncol* 2019; **9**: 1370.

22. Wu J, Heemskerk JWM, Baaten CCFMJ. Platelet membrane receptor proteolysis: implications for platelet function. *Front Cardiovasc Med* 2021; DOI: 10.3389/fcvm.2020.608391.

23. Kuliczowski W, Radomski M, Gašior M, *et al.* MMP-2, MMP-9, and TIMP-4 and response to aspirin in diabetic and non-diabetic patients with stable coronary artery disease: a pilot study. *Biomed Res Int* 2017; DOI: 10.1155/2017/9352015.

24. Larkin CM, Hante NK, Breen EP, *et al.* Role of matrix metalloproteinases 2 and 9, toll-like receptor 4 and platelet-leukocyte aggregate formation in sepsis-associated thrombocytopenia. *PLoS One* 2018; DOI: 10.1371/journal.pone.0196478.

25. Ye Y, Kuang X, Xie Z, *et al.* Small-molecule MMP2/MMP9 inhibitor SB-3CT modulates tumor immune surveillance by regulating PD-L1. *Genome Med* 2020; **12** (1): 83.

26. Samavat H, Kurzer MS. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett* 2015; **356** (2 Pt A): 231–43.

MATRIX METALLOPROTEINASES-2 AND -9 AS REDOX-DEPENDENT MARKERS OF BREAST CANCER METASTASIS

I.I. Ganusevich, S.V. Virko, A.P. Burlaka

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. Determining prognostic factors is a key point for assessing the aggressiveness of breast cancer (BC), individual prognosis and probable response to treatment. MMP-2 and -9 (gelatinases) are redox-dependent molecules that provide proteolytic degradation of the intercellular matrix and signaling at each stage of the metastatic cascade. **Aim:** to investigate the relationship between redox-dependent activation of gelatinases and metastasis, levels of MMP-2 and -9 activity in the adipose tissue (AT) of obese breast cancer patients and in the serum of breast cancer patients with a different hormone receptor status. **Object and methods:** blood, tumor and adipose tissues of 116 patients with stage I-IV breast cancer were studied. Methods of zymography in polyacrylamide gel, electron-paramag-

netic resonance, statistical were used. **Results:** superoxide radicals (SR), which control the activity of gelatinases, are involved in the destruction regulation of the intercellular matrix during the progression of breast cancer. The levels of the SR generation rate and the activity of MMP-2 and -9 in the tumor correlate with each other, as well as with the stages and regional metastasis of breast cancer. The levels of gelatinase activity in the breast AT in patients with breast cancer of the basal molecular subtype with obesity depend on its volume and distance from the tumor. We detected violations of the redox state of neutrophils and the functioning of gelatinases in the serum of patients with breast cancer of reproductive age, which depend on the hormonal status of women, are manifested by increased levels of SR and MMP-9 activity in ER (-) / PR (-) tumor status and may affect the course of the disease and the survival of patients. **Conclusions:** indicators of gelatinase activity, determined in tumor and blood, are promising markers of breast cancer progression, in particular for overweight patients and/or for patients of reproductive age with a certain hormonal status.

Key Words: breast cancer, adipose tissue, gelatinases, superoxide radicals, markers of progression.

Адреса для листування:

Ганусевич І.І.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: iganus2000@yahoo.com

Одержано: 20.07.2021