

# Экспрессия матриксной металлопротеиназы-2 в ядрах опухолевых клеток меланомы кожи

М.Б. Аксененко, Т.Г. Рукша

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

**Цель исследования.** Проведение сравнительного анализа экспрессии матриксной металлопротеиназы-2 (ММП-2) в ядре и цитоплазме опухолевых клеток и оценка взаимосвязи локализации экспрессии ММП-2 и различных клинико-морфологических критериев заболевания у пациентов с меланомой кожи.

**Материал и методы.** Объектом исследования служили образцы опухолевого материала, полученные из парафиновых блоков от пациентов с меланомой кожи, проходивших лечение в КГБУЗ «Красноярский краевой онкологический диспансер». Биоптаты больных меланомой кожи ( $n = 44$ ) получены в КГБУЗ «Красноярское краевое патологоанатомическое бюро». Иммуногистохимическое исследование проводилось по стандартной методике с первичными антителами к ММП-2.

**Результаты.** Экспрессия ММП-2 выявлена в ядрах опухолевых клеток меланомы кожи в 43,1% случаев, в цитоплазме — в 56,9% случаев. Не установлено значимых различий в экспрессии ММП-2 в ядре и цитоплазме ( $p = 0,33$ ). Отмечено, что для пациентов, имеющих ядерную экспрессию в опухолевых клетках, характерен более благоприятный прогноз по сравнению с пациентами, в опухолевых комплексах которых определялась цитоплазматическая экспрессия фермента.

Зависимости внутриклеточной локализации экспрессии ММП-2 от пола и возраста пациентов, локализации новообразования, уровня инвазии по Кларку, толщины опухоли по Бреслоу, особенностей лимфоцитарной инфильтрации опухоли, фазы роста опухоли, гистологического подтипа, наличия пигмента, изъязвления опухоли, стадии опухоли по AJCC (American Joint Committee on Cancer) выявлено не было.

**Заключение.** Появление ММП-2 в ядре может быть связано с гипоксией, которая возникает в опухолевой ткани, а также с повышением уровня пероксинитрита, который в свою очередь может оказывать влияние на функционирование и регуляцию ММП. Кроме того, появление ММП-2 с атипичной локализацией можно связать с наличием в пределах одной опухоли опухолевых клеток с различными биологическими свойствами, характеризующими внутриопухолевую гетерогенность новообразований. Биологическое и клиническое значение изменения внутриклеточной локализации фермента требует дальнейшего разъяснения.

**Ключевые слова:** меланома кожи, матриксная металлопротеиназа-2, иммуногистохимическое исследование, гипоксия, внутриопухолевая гетерогенность.

# Features of matrix metalloproteinase-2 expression in the nuclei of tumor cells of a skin melanoma

M.B. Aksenenko, T.G. Ruksha

Krasnoyarsk State Medical University  
Partizana Zheleznyaka str., 1, Krasnoyarsk, 660022, Russia

**Goal of the study.** To compare expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the nuclei and cytoplasm of tumor cells and assess the mutual relation between the localization of MMP-2 expression and different clinical and morphologic criteria in patients with a skin melanoma.

**Materials and methods.** Tumor samples obtained from paraffin blocks taken from patients suffering from a skin melanoma and treated at the Krasnoyarsk Territorial Oncologic Dispensary served as the object of the study. Skin tissue samples taken from patients suffering from a skin melanoma ( $n = 44$ ) were obtained from the Krasnoyarsk Territorial Pathological Anatomy Bureau. Immunohistochemistry was performed based on a standard technique using primary anti-matrix metalloproteinase-2 antibodies.

**Results.** MMP-2 expression was revealed in the nuclei of tumor cells of a skin melanoma in 43.1% of cases and in the cytoplasm in 56.9% of cases. No significant differences in MMP-2 expression in the nuclei and cytoplasm were revealed ( $p = 0.33$ ). Patients with nuclear expression in tumor cells are characterized by a more favorable prognosis than patients with cytoplasmic enzyme expression in tumor complexes.

No dependence of the intracellular localization of MMP-2 expression on the patient sex or age, tumor localization, Clark level of invasion, Breslow's thickness, particular features of tumor lymphocyte infiltration, tumor growth phase, histological subtype, pigmentation, tumor ulceration and tumor stage according to AJCC (American Joint Committee on Cancer) was revealed.

**Conclusion.** MMP-2 located in the nuclei can be related to hypoxia in the tumor tissue as well as increased peroxynitrite level, which, in its turn, can have an effect on the function and regulation of matrix metalloproteinases. Moreover, MMP-2 with an atypical localization can be related to tumor cells with different biological characteristics within the same tumor, which characterize the intratumoral heterogeneity of neoplasms. The biological and clinical role of changes in the intracellular localization of the enzyme needs further explanation.

Key words: **skin melanoma, matrix metalloproteinase-2, immunohistochemistry, hypoxia, intratumoral heterogeneity.**

Corresponding author: aksenenko\_mariya@mail.ru. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2014; 3: 65—71.

■ Матриксные металлопротеиназы (ММП) принимают участие во многих физиологических и патологических процессах, в которых они функционируют как деградационные и регуляторные ферменты. ММП-2 экспрессируется в мезенхимальных клетках (главным образом в фибробластах) в период развития и регенерации ткани. Также она синтезируется нейтрофилами, макрофагами и моноцитами [1]. ММП-2 вместе с ММП-9 участвует в деградации коллагена IV типа, главного компонента базальных мембран, а также желатина (денатурированного коллагена). ММП-2 может разрушать другие типы коллагенов (V, VII и X), эластин и фибронектин, участвует в процессинге многих молекул, модулируя их функции различными способами. Например, она расщепляет моноцитарный хемотаксический белок-3, что приводит к уменьшению воспаления и обеспечивает вазоконстрикцию [2]. Все ММП относят к «индуцибельным» ферментам, транскрипция которых подчинена ряду факторов (стероидные и тиреоидные гормоны, цитокины, факторы роста, химические агенты и др.). Исключение составляет ММП-2, экспрессия которой происходит по конститутивному пути. Эти различия в регуляции транскрипции объясняются, в частности, различиями в строении промоторов ММП [3], с чем впоследствии могут быть связаны особенности функционирования данного вида металлопротеиназ.

Широко известна роль ММП в деструкции компонентов внеклеточного матрикса и, как следствие, их роль в патогенезе многих злокачественных новообразований. Особое значение отводится ММП-2, которая играет ключевую роль в инвазивной способности опухолевых клеток [4]. Например, у больных с бронхоальвеолярной карциномой выявлен значительный уровень экспрессии ММП-2 и ММП-9 опухолевыми клетками, что обеспечивает чрезмерную инвазивность и подвижность опухоли [5]. При папиллярном раке щитовидной железы определяется высокий уровень экспрессии ММП-2 и ММП-9, причем эти показатели коррелируют с основными клиническими и морфологическими характеристиками заболевания, такими как большой размер опухоли, наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах, низкая клеточная дифференцировка опухоли, повреждение капсулы органа, что является важным дополнительным показателем для анализа злокачественного потенциала плоскоклеточного рака щитовидной железы [6]. Исходя из функциональных особенностей фермента, представляется, что он может локализоваться в цитоплазме, а также возможна его внеклеточная локализация [7]. Тем не менее в ряде исследований сообщается о ядерной локализации исследуемого антигена, в частности имеются данные о том, что положительная ядерная экспрессия ММП-2 обнаруживается в кардиомиоцитах человека, а также эндотелиальных клетках легочной артерии [8].

В ядре были выявлены многие протеолитические ферменты, включая ферменты семейства цистеиновых протеаз, к которым относится ММП-2 [9]. Их функционирование в ядре клетки является не до конца ясным и может включать следующие функциональные аспекты: ремоделирование хроматина, поддержание ядерных матриксных структур, апоптоз и регулирование клеточной пролиферации. ММП-2, экспрессируемая в цитоплазме, необходима для ингибирования процесса ангиогенеза в опухолях, ее повышенный уровень определяется в эндотелии сосудов опухоли и в моче пациентов с различными онкологическими заболеваниями [10].

Цель настоящего исследования — проведение сравнительного анализа экспрессии ММП-2 в ядре и цитоплазме и оценка взаимосвязи локализации экспрессии изучаемого фермента и различных клинико-морфологических критериев заболевания у пациентов с меланомой кожи.

### Материал и методы

Исследование одобрено Локальным этическим комитетом КрасГМУ (протокол № 52/2013 от 29.11.2013). Объектом исследования служили образцы опухолевого материала, полученные из парафиновых блоков от пациентов с меланомой кожи, проходивших лечение в КГБУЗ «Красноярский краевой онкологический диспансер». Биоптаты больных меланомой кожи ( $n = 44$ ) получены в КГБУЗ «Красноярское краевое патолого-анатомическое бюро».

Иммуногистохимическое исследование проводилось по стандартной методике. Применялась система детекции Reveal TM Biotin Free System (Spring Bioscience, США). В качестве хромогена использовался АЕС (Spring Bioscience, США). Для определения экспрессии ММП-2 использовались поликлональные антитела к ММП-2 (Spring, США) в разведении 1:100. Интенсивность иммуногистохимической реакции оценивали по методу гистологического счета H-score по формуле  $S = 1a + 2b + 3c$ , где  $a$  — количество слабоокрашенных ядер клеток (в %);  $b$  — количество умеренно окрашенных ядер клеток (в %);  $c$  — количество сильно окрашенных ядер клеток (в %) [11].

Рассчитывали абсолютный риск гибели пациента в каждой группе — в группе пациентов с ядерной экспрессией ММП-2 и в группе пациентов с цитоплазматической экспрессией этого фермента, а также относительный риск гибели пациента [16] (см. таблицу).

Статистическая обработка данных проводилась в программе Statistica 7,0. При проверке нормальности распределения выборки использовали критерий Колмогорова — Смирнова. Достоверность различий определяли с помощью критерия Манна — Уитни. Для оценки различий качественных признаков применялся точный односторонний критерий Фишера. При  $p < 0,05$  различия признавались статистически значимыми.

Таблица

Распределение больных меланомой по исходу болезни ( $p = 0,0006$ )

Группа больных	Исход болезни	
	пациент жив	пациент умер
С экспрессией ММП-2 в ядре	16 (А)	3 (В)
С экспрессией ММП-2 в цитоплазме	8 (С)	17 (D)

## Результаты и обсуждение

Экспрессия ММП-2 определялась в клетках меланомы кожи в ядре в 43,1% случаев (рис. 1, 2) и в цитоплазме в 56,9% случаев (рис. 3, 4). Не было выявлено значимых различий в экспрессии ММП-2 в ядре и цитоплазме ( $p = 0,33$ ). Зависимости внутриклеточной локализации экспрессии ММП-2 от пола и возраста пациентов, локализации новообразования, уровня инвазии по Кларку, толщины опухоли по Бреслоу, особенностей лимфоцитарной инфильтрации опухоли, фазы роста опухоли, гистологического подтипа, наличия пигмента, изъязвления опухоли, стадии опухоли по AJCC (American Joint Committee on Cancer) не выявлено ( $p > 0,05$ ). Помимо опухолевых клеток экспрессия ММП-2 наблюдалась в ядрах интактного эпидермиса (рис. 5), при этом имела тенденция к расположению ММП-2<sup>(+)</sup> клеток в верхних слоях эпидермиса (рис. 6). Кроме внутриклеточной определялась внеклеточная локализация фермента между волокнистыми структурами межклеточного матрикса.

Что касается новых функций ядерных металлопротеиназ, ассоциированных с ядерной локализацией фермента, по результатам нескольких исследований

можно отметить, что они были, как правило, связаны с апоптозом. Увеличение ядерной активности ММП-2 было продемонстрировано в эндотелиальных клетках легких, подвергшихся апоптозу. Активация ММП-2 в данном случае была вызвана действием реактивных разновидностей кислорода и азота, продуцируемых сигаретным дымом [12]. Имеются данные о внутриядерной экспрессии ММП-2 в нейронах головного мозга при его ишемии в ранней стадии реперфузии. При этом авторы предполагают, что эффекты ингибирования ранней внутриядерной активации желатиназной активности могут улучшить фрагментацию ДНК в нейронах клеток на более поздних стадиях постишемической реперфузии, открывая новую возможность для терапевтической стратегии при ведении данной группы пациентов [13].

Гипотетически роль ММП-2 в ядре связана с деградацией PARP-1 — поли(АДФ-рибоза)-полимеразы. Окислительный стресс, возникающий в клетках, повышает количество прооксидантов, в том числе пероксинитритов ( $ONOO^-$ ), которые в свою очередь вызывают разрыв ДНК, что приводит к активации PARP с последующей АТФ-зависимой репарацией ДНК. Вместе

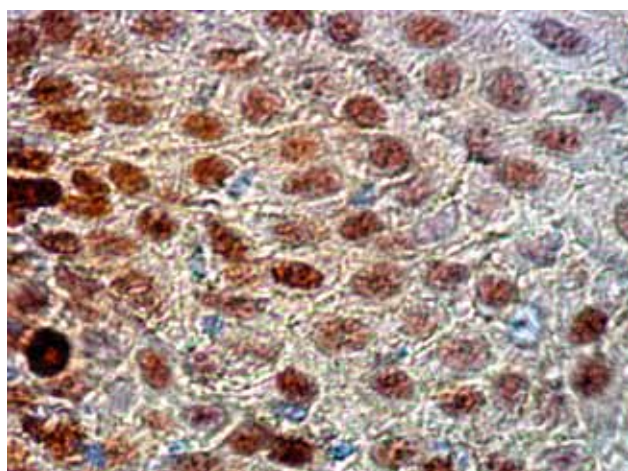


Рис. 1. Экспрессия ММП-2 в ядрах клеток меланомы кожи. х400

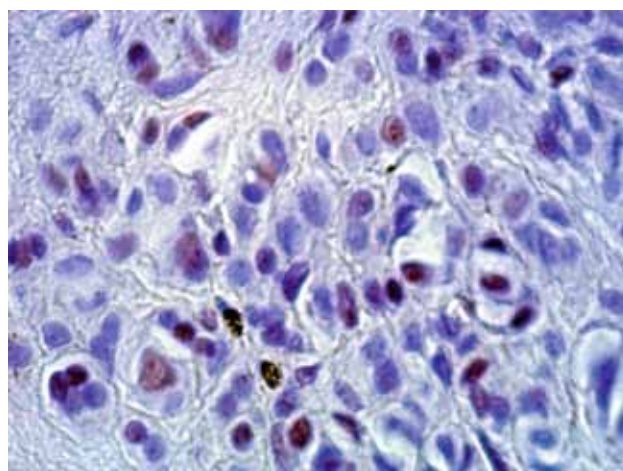


Рис. 2. Экспрессия ММП-2 в ядрах клеток меланомы (иммунопозитивные клетки окрашены в красный цвет). х400



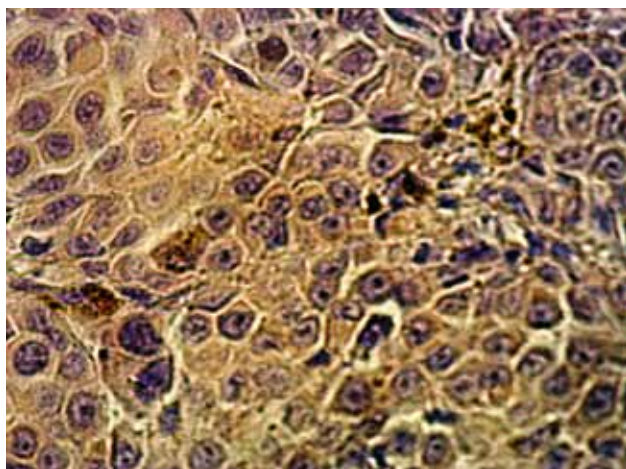


Рис. 3. Цитоплазматическая экспрессия ММП-2. х400

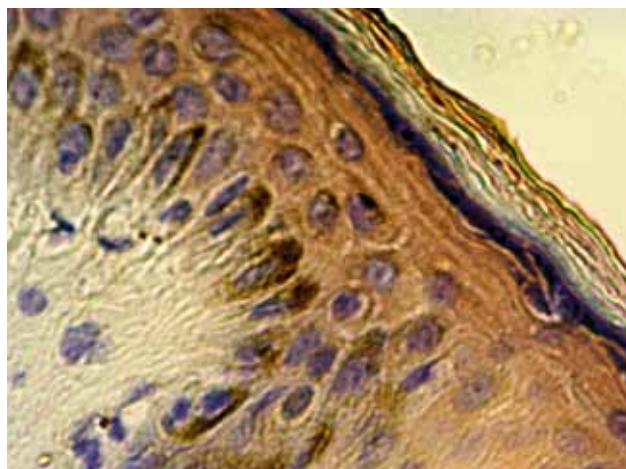


Рис. 4. Цитоплазматическая экспрессия ММП-2 в эпидермисе. х400

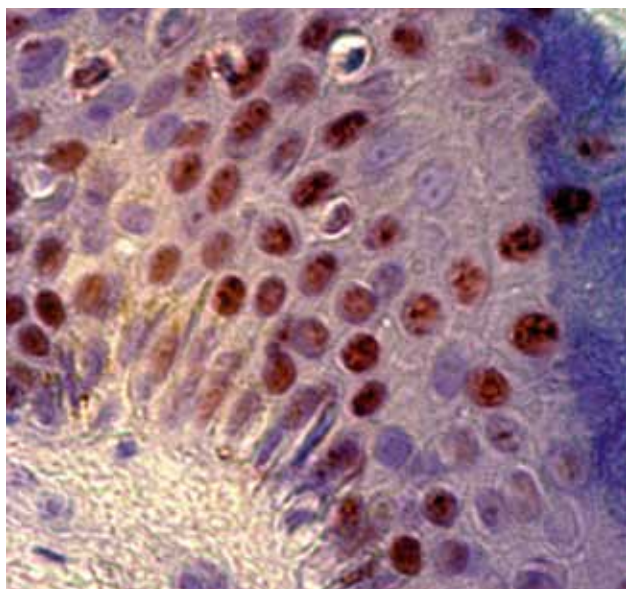


Рис. 5. Экспрессия ММП-2 в ядрах клеток непораженной ткани. х400

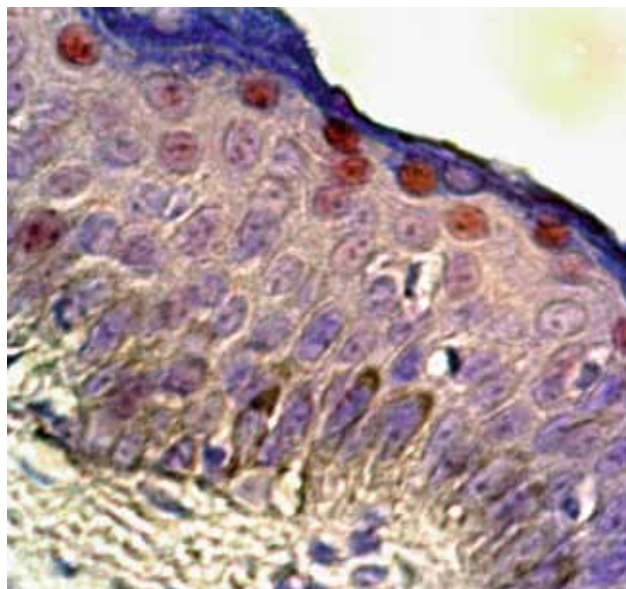


Рис. 6. Экспрессия ММП-2 в ядрах клеток непораженной ткани (тенденция к расположению положительных клеток в верхних слоях эпидермиса). х400

с тем чрезмерная активация PARP может привести к энергетическому истощению клетки. Кроме того, установлено, что ONOO<sup>-</sup> может активировать ММП-2 напрямую [14].

Говоря об экспрессии ММП в опухолевой ткани, следует отметить, что положительная экспрессия

ММП-3 в ядре наблюдалась в ткани гепатоцеллюлярной карциномы. Примечательно, что пациенты с наличием ядерного окрашивания ММП-3 имели низкий показатель общей выживаемости (лог-ранг регрессионный анализ,  $p = 0,043$ ) и большой размер опухоли ( $> 5$  см) (точный критерий Фишера,  $p = 0,031$ ) [15].

В настоящем исследовании при оценке взаимосвязи локализации экспрессии ММП-2 у пациентов с меланомой кожи и варианта исхода болезни выявлено, что для пациентов, у которых экспрессия фермента обнаруживалась в ядрах опухолевых клеток, характерен более благоприятный прогноз по сравнению с пациентами, в опухолевых комплексах которых определялась цитоплазматическая экспрессия фермента ( $p < 0,05$ ).

Нами был рассчитан абсолютный риск гибели пациента в зависимости от локализации экспрессии ММП-2 в клетках меланомы. Абсолютный риск гибели в группе пациентов с ядерной экспрессией ММП-2 составил 0,16, вероятность благоприятного исхода — 0,84. Абсолютный риск гибели в группе пациентов с экспрессией ММП-2 в цитоплазме клеток меланомы составил 0,32, вероятность благоприятного исхода — 0,68. Относительный риск гибели составил 4,25, т. е. у пациентов, у которых была выявлена экспрессия ММП-2 в ядре клеток меланомы, риск летального исхода заболевания был ниже в 4,25 раза по сравнению с пациентами, у которых определялась экспрессия ММП-2 в цитоплазме опухолевых клеток.

Экспрессия ММП-2 описана в опухолевой ткани рака молочной железы. Известно, что этот фермент экспрессируется и в здоровой ткани молочной железы, но в этих случаях она исключительно цитоплазматическая [17]. Нами не выявлено различий клинико-морфологических показателей у пациентов с экспрессией ММП-2 в ядре и цитоплазме клеток меланомы.

Можно предположить, что появление ММП-2 в ядре связано с гипоксией, которая возникает в опухолевой ткани. Возникновение тканевой гипоксии в организме онкологических больных является следствием нарушения баланса поступления и потребления кислорода [18]. Известно, что пероксинитрит, способствуя окислительному повреждению клеток, является

важным фактором развития окислительного стресса при некоторых патологических состояниях. Повышение содержания пероксинитрита у пациентов с опухолевым процессом согласуется с данными об участии пероксинитрита в процессе опухолевой инвазии через влияние на функционирование некоторых ММП [18]. Гипоксия в клетках меланомы, в особенности в зонах некроза опухоли, уже была описана [19]. Кроме того, появление ММП-2 с атипичной локализацией можно связать с наличием в пределах одной опухоли опухолевых клеток с различными биологическими характеристиками, а именно с наличием внутриопухолевой гетерогенности. Известно, что опухолевое разнообразие в пределах одной опухоли является основной преградой на пути к высокоэффективной диагностике онкологических заболеваний, успешному прогнозу и лечению [20]. Механизм возникновения данного феномена требует дальнейшего изучения. Несмотря на то что показатель смертности от меланомы кожи остается относительно стабильным в последние десятилетия, проблема заболеваемости меланомой кожи по-прежнему сохраняет свою актуальность, как и вопрос биологического поведения опухоли. По мнению ряда исследователей [21], характер распределения локализации ММП-2 в опухолевой ткани представляет собой важное, прежде недооцениваемое значение в функционировании ММП и его выявление открывает новые пути для исследования в цитобиологии и биохимии, имеет большое значение для изучения патогенеза различных заболеваний, а также прогнозирования течения онкологических заболеваний.

Исследование выполнено в рамках Гранта президента РФ Фонда Министерства образования и науки РФ № МД-901.2013.7 «Молекулярно-генетические маркеры для диагностики и прогнозирования течения меланомы кожи». ■

## Литература

1. Pakozdi A., Amin M.A., Haas C.S. et al. Macrophage migration inhibitory factor: a mediator of matrix metalloproteinase-2 production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8 (4): 1—14.
2. Smirnova O.V., Vyhristenko L.R. Role of cells of system of immunity in pathogenesis bronchial asthma. *Medicinskie novosti* 2011; 5: 18—19. [Смирнова О.В., Выхристенко Л.Р. Роль клеток системы иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы. *Медицинские новости* 2011; 5: 18—19.]
3. MacNaul K.L., Chartrain N., Lark M.T., Hutchinson N.I. Discoordinate expression of stromelysin collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. *J Biol Chem* 1990; 265: 17238—17245.
4. Leslie M.C., Bar-Eli M. Regulation of gene expression in melanoma: new approaches for treatment. *J Cell Biochem* 2005; 94: 25—38.
5. Kanomata N., Nakahara R., Oda T. et al. Expression and localization of mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors in mixed bronchioalveolar carcinomas with invasive components *Mod Pathol* 2005; 18 (6): 828—837.
6. Delektorskaia V.V., Smirnova E.A., Ponomareva M.V. et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their tissue inhibitors 1 and 2 in papillary thyroid cancer: an association with the clinical, morphological and ultra structural characteristics of a tumor. *Arkhiv Patologii* 2010; 72 (4): 3—6. [Делекторская В.В., Смирнова Е.А., Пономарева М.В. и др. Экспрессия матриксных металлопротеиназ 2 и 9 и их тканевых ингибиторов 1 и 2 в папиллярном раке щитовидной железы: взаимосвязь с клинико-морфологическими и ультраструктурными характеристиками опухоли. *Архив патологии* 2010; 72 (4): 3—6.]

7. Branca M., Ciotti M., Giorgi C. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) are prognostic factors in cervical cancer, related to invasive disease but not to high-risk human papillomavirus (HPV) or virus persistence after treatment of CIN. *Anticancer Res* 2006; 26: 1543—1556.
8. Kwan J.A., Schulze C.J., Wang W. et al.: Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardioamyocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) poly-merase (PARP) *in vitro*. *FASEB J* 2004, 18: 690—692.
9. Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; 115: 3719—3727.
10. 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; 7: 2396—2404.
11. McClelland R.A., Wilson D., Leake R. A multicentre study into the reliability of steroid receptor immunocytochemical assay quantification II *Eur J Cancer* 1991; 27: 711—715.
12. Aldonyte R., Brantly M., Block E. et al. Nuclear localization of active matrix metalloproteinase-2 in cigarette smoke-exposed apoptotic endothelial cells. *Exp Lung Res* 2009; 35: 59—75.
13. Amantea D., Corasaniti M.T., Mercuri N.B. et al. Brain regional and cellular localization of gelatinase activity in rat that have undergone transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience* 2008; 152: 8—17.
14. Yang Y., Candelario-Jalil E., Thompson J.F. et al. Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 2010; 112: 134—149.
15. Monvoisin A., Bisson C., Si-Tayeb K. et al. Involvement of matrix metalloproteinase type-3 in hepatocyte growth factor-induced invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 2002; 97: 157—162.
16. Rebrova O. Ju. Statistical analysis of medical data. Moskva: MediaSfera 2002; 312 [Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. М: МедиаСфера 2002; 312.]
17. Kohrmann A., Kammerer U., Kapp M. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer* 2009; 9: 188.
18. Goroshinskaya I.A., Surikova E.I., Airapetov K.G. et al. Concentration of nitric oxide derivatives in blood of cancer patients with cerebral metastases and with different grade of endogenous intoxication. *Siber J Oncol.* 2009; 6 (36): 44—47. [Горошинская И.А., Сурикова Е.И., Айрапетов К.Г. и др. Содержание производных оксида азота в крови онкологических больных с церебральными метастазами с различной степенью эндогенной интоксикации. *Сибир онкол журн* 2009; 6 (36): 44—47.]
19. Bachmann I. M., Ladstein R. G., Straume O. et al. Tumor necrosis is associated with increased alphavbeta3 integrin expression and poor prognosis in nodular cutaneous melanomas. *BMC Cancer* 2008; 8: 362: 1—10.
20. Gerashchenko T.S., Denisov E.V., Litvjakov N.V. et al. Intratumor heterogeneity: nature and biological significance. *Biochemistry* 2013; 78 (11): 1531—1549. [Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В. и др. Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение. *Биохимия* 2013; 78 (11): 1531—1549.]
21. Mannello F., Medda V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Prog Histochem Cytochem* 2012, 47: 27—58.

#### об авторах:

М.Б. Аксененко — к.м.н., ассистент кафедры патологической физиологии с курсом клинической патофизиологии им. проф. В.В. Иванова ГБОУ ВПО «КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России  
 Т.Г. Рукша — д.м.н., зав. кафедрой патологической физиологии с курсом клинической патофизиологии им. проф. В.В. Иванова ГБОУ ВПО «КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье