

---

# ЗНАЧЕНИЕ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ФАКТОРОВ НЕОАНГИОГЕНЕЗА В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**В.П. Авдошин**,

**С.А. Пульбере, А.В. Локтев**

Кафедра урологии и оперативной нефрологии  
Российский университет дружбы народов  
Госпитальная площадь, 2-4, Москва, Россия, 111020

**А.И. Глухов**

ГУЗ Московский НИИ медицинской экологии  
Департамент здравоохранения г. Москвы  
Симферопольский бульвар, 8, Москва, Россия, 266012

Результаты исследования уровней экспрессии мРНК TRF1, MMP-7, FLT-1, KDR и VEGF mRNA у пациентов с различными заболеваниями предстательной железы показали, что определение уровней экспрессии мРНК FLT-1/VEGF и TRF1/MMP-7 являются перспективными диагностическими индексами для дифференциальной диагностики злокачественных новообразований предстательной железы.

**Ключевые слова:** рак предстательной железы, мРНК, TRF1, MMP-7, FLT-1, KDR, сосудистый фактор роста, биопсия предстательной железы.

**Введение.** Последние годы характеризуются качественно новым этапом в изучении патогенетических механизмов развития и прогрессии рака предстательной железы (РПЖ). Это в первую очередь связано с молекулярно-биологическими исследованиями онкогенов и супрессорных генов, полипептидных факторов роста, цитокинов, а также процессов регуляции программированной клеточной гибели (апоптоза) и механизмов метастазирования опухоли, с целью раннего выявления злокачественных новообразований предстательной железы, уменьшения количества биопсий простаты, улучшения результатов лечения и прогнозирования отдаленных результатов.

Опухолевые клетки в процессе ангиогенеза продуцируют фактор роста эндотелия (VEGF), играющий ведущую роль в делении и ускоряющий формирование капилляров в опухоли [1].

Продукция VEGF стимулируется несколькими факторами по механизму обратной связи. После секреции опухолью VEGF связывается с рецепторами на близлежащих сосудистых эндотелиальных клетках. Существует два разных, но структурно близких рецептора VEGF. Рецептор KDR отвечает за пролиферацию клеток эндотелия сосудов, а Flt-1 — за дифференцировку и формирование капилляра. Как только молекула VEGF связалась с рецептором, инициируется целый каскад биохимических событий: клетки эндотелия начинают интенсивно делиться и «запускают» синтез ферментов — матрикс-металлопротеаз, например, MMP-7 (матрилли-

зин), которые расщепляют оболочкающий эндотелий внеклеточный матрикс и деградируют базальную мембрану сосудов. В образовавшиеся «отверстия» эндотелиальные клетки выходят наружу и мигрируют по направлению к опухоли. Повышенная проницаемость ведет к «подтеканию» белков плазмы через стенку сосуда и формированию экстравазального фибринового геля. Этот гель представляет собой подходящую среду для роста клеток эндотелия. Ферменты — металлопротеазы, как бы «расплавляют» ткани перед прорастающими сосудами, помогая им продвигаться к цели. Как только кровеносный капилляр окончательно сформировался, активность протеаз падает и ткань вокруг нового сосуда снова «затвердевает» [5; 6].

Одна из основных функций теломер заключается в сохранении целостности и стабильности хромосом: теломеры препятствуют нуклеазной деградации хромосомных концов, а также предотвращают их слияние. В клетках человека идентифицирован теломерсвязывающий белковый фактор TRF1, способный связываться с теломерными повторами *in vitro*.

Данный белок присоединяется к двухнитевым участкам теломер и препятствует работе фермента теломеразы.

Этот фермент отвечает за восстановление теломер, концевых участков хромосом, которые укорачиваются при каждом делении. Активация теломеразы в обычной соматической клетке приводит к стабилизации длины теломер, что, в свою очередь, ведет к нарушению запрограммированной гибели клеток, которые приобретают возможность неограниченного роста (иммортализация) [3; 4].

Уменьшение количества TRF1 в цитоплазме ведет к постепенному удлинению теломер, поскольку открывается доступ для работы теломеразы [4]. Показана диагностическая значимость TRF1 при разных онкологических заболеваниях, например, при раке желудка [7], однако литературные данные по использованию этого маркера в диагностике РПЖ отсутствуют.

**Целью настоящего исследования** явилось определение уровней экспрессии мРНК VEGF и рецепторов к нему (KDR, FLT-1), а также мРНК TRF1, MMP-7 клетками, полученными из биоптатов предстательной железы пациентов с доброкачественной гиперплазией (ДГПЖ), РПЖ, здоровых мужчин без выявленных заболеваний простаты (норма) и индекса отношения уровней экспрессии мРНК KDR/FLT1, FLT-1/VEGF и TRF1/MMP-7.

**Методы.** 77 биоптатов предстательной железы получены от 49 пациентов, находившихся на стационарном лечении в ГКБ № 29, которым с целью верификации диагноза произведена биопсия простаты. Возраст пациентов составил от 51 до 76 лет (средний возраст 66,3 года). По характеру заболеваний предстательной железы пациенты были разделены на группы: норма ( $n = 3$ ), хронический простатит (ХП) ( $n = 4$ ), простатическая интраэпителиальная неоплазия (ПИН 2—3) ( $n = 3$ ), ДГПЖ ( $n = 15$ ) и РПЖ различных степеней дифференцировки, высоко-, умеренно- и низкодифференцированный (ВДР, УДР, НДР) ( $n = 24$ ).

**Результаты.** Получено достоверное отличие уровней экспрессии TRF1 и MMP-7 в группах НОРМА-ДГПЖ и НОРМА-РПЖ ( $p \leq 0,05$ ). Между группами

ДГПЖ и РПЖ не было выявлено достоверного отличия в уровнях экспрессии исследуемых маркеров. Для исследуемых групп (НОРМА, ДГПЖ и РПЖ) был рассчитан индекс отношения относительных уровней экспрессии TRF1/MMP-7 [2]. Выявлено статистически достоверное отличие ( $p \leq 0,05$ ) между группами НОРМА-ДГПЖ и НОРМА-РПЖ по индексу TRF1/MMP-7 (табл. 1).

Таблица 1

**Медианы относительных уровней экспрессии TRF1 и MMP-7 в группах мужчин без видимой патологии простаты (НОРМА), пациентов с доброкачественной гиперплазией (ДГПЖ) и раком предстательной железы (РПЖ)**

Маркер (индекс*)	НОРМА	ДГПЖ	РПЖ
TRF1/B-actin	1,32	0,73	0,68
MMP-7/B-actin	1,12	0,88	0,87
TRF1/MMP-7*	0,6	0,48	0,46

Для групп УДР к НДР также был рассчитан индекс отношения относительных уровней экспрессии TRF1/MMP-7. Показана прямая корреляция между этим индексом и степенью дифференцировки РПЖ наблюдался статистически достоверный ( $p \leq 0,05$ ) рост индекса TRF1/MMP-7 с уменьшением дифференцировки опухоли (от УДР к НДР). При этом на поздних стадиях РПЖ в клетках предстательной железы снижается уровень экспрессии мРНК как TRF1, так и MMP-7 (табл. 2).

Таблица 2

**Медианы относительных уровней экспрессии TRF1 и MMP-7 в группах пациентов с умереннодифференцируемым (УДР) и низкодифференцируемым (НДР) раком предстательной железы**

Маркер (индекс*)	УДР	НДР
TRF1/B-actin	0,94	0,72
MMP-7/B-actin	0,91	0,46
TRF1/MMP-7*	0,25	0,51

Таким образом, из полученных результатов можно предположить, что существует взаимосвязь между снижением уровня экспрессии TRF1 и MMP-7 и неблагоприятным течением РПЖ.

При исследовании относительных уровней экспрессии мРНК VEGF, FLT-1, KDR и их соотношений FLT-1/VEGF, KDR/FLT-1, KDR/VEGF, KDR+FLT-1/VEGF в двух клеточных линиях РПЖ выявлено, что в гормонорезистентной линии РПЖ (DU 145), в отличие от гормончувствительной линии (LNCaP), определяется незначительная экспрессия мРНК рецептора KDR, ответственного за пролиферацию клеток эндотелия сосудов.

В то же время уровень относительной экспрессии мРНК VEGF в линии DU 145 в 2 раза меньше, чем в линии LNCaP. Таким образом, возникновение гормонорезистентности, вероятно, сопровождается уменьшением экспрессии VEGF и одновременным увеличением экспрессии рецептора KDR, ответственного за пролиферацию эндотелиоцитов (табл. 3).

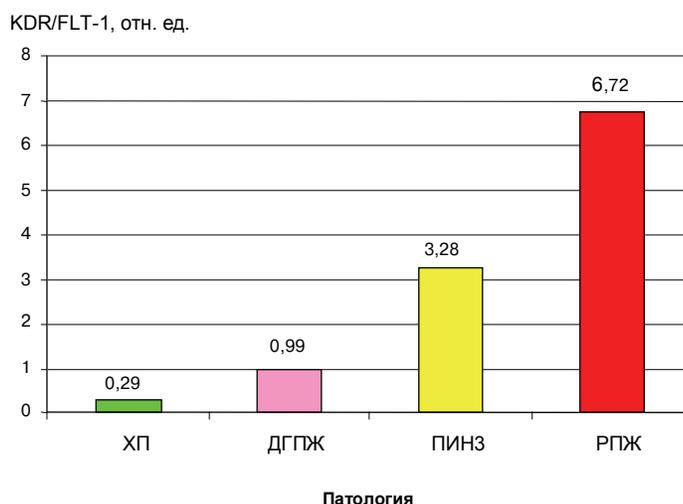
Таблица 3

**Средние значения уровней экспрессии FLT-1, KDR, VEGF и их отношений в клеточных линиях гормоночувствительного, LNCaP, и гормонорезистентного, DU 145, рака предстательной железы**

Диагностический индекс	FLT-1 / $\beta$ -актин	KDR / $\beta$ -актин	VEGF / $\beta$ -актин	KDR / FLT-1	FLT-1 / VEGF	KDR / VEGF	KDR+ FLT-1/ VEGF	KDR + FLT-1 + VEGF / $\beta$ -актин	KDR + FLT-1/ $\beta$ -актин
LNCaP	0	0	2,8	0	0	0	0	2,8	0
DU 145	0	0,09	1,27	0	0	0,08	0,08	1,27	0,09

Анализ относительного уровня экспрессии мРНК VEGF и рецепторов к нему KDR и FLT-1 показал отсутствие статистически значимых различий между всеми исследуемыми группами и не может являться критерием для дифференциальной диагностики заболеваний предстательной железы ( $p > 0,05$ , рис. 6).

Соотношение уровней экспрессии мРНК KDR/FLT-1 у больных РПЖ больше в 23 раза, чем у больных ХП, в 7 раз больше, чем у больных ДГПЖ, и в 2 раза больше, чем у больных с верифицированной ПИН (рис. 1).



**Рис. 1.** Средние значения отношения уровней экспрессии KDR/FLT-1 для групп ХП, ДГПЖ, ПИНЗ и РПЖ

При РПЖ и ПИН уровень экспрессии соотношения мРНК FLT-1/VEGF в 50 раз выше, чем у больных ДГПЖ и в 4 раза больше, чем у больных ХП и ДГПЖ.

Таким образом, последовательное увеличение значений отношения уровней экспрессии мРНК соотношения KDR+FLT-1/VEGF и KDR/VEGF от группы ДГПЖ к группе РПЖ связано одновременно как с уменьшением экспрессии мРНК VEGF, так и с увеличением экспрессии мРНК рецепторов KDR. При этом в большей мере происходит увеличение количества мРНК рецепторов, отвечающих за пролиферацию клеток эндотелия сосудов, чем экспрессия мРНК самого фактора роста эндотелия сосудов.

Таким образом, из полученных данных следует, что основным провоцирующим фактором ангиогенеза является не столько сам фактор роста эндотелия сосудов, сколько увеличение экспрессии его рецепторов KDR, находящихся на поверхности незрелых эндотелиоцитов.

### **Выводы**

1. Анализ уровня экспрессии мРНК VEGF и рецепторов к нему KDR и FLT-1 не может являться критерием для дифференциальной диагностики заболеваний предстательной железы.

2. Анализ отношений уровней экспрессии мРНК FLT-1/VEGF и KDR/FLT-1 являются перспективными диагностическими индексами для выявления РПЖ и ПИН высокой степени, когда риск последующего выявления РПЖ достаточно велик.

3. Проведенное исследование уровней экспрессии мРНК TRF1, MMP-7, индекса TRF1/MMP-7 и сравнение их с основными клиническими и морфологическими характеристиками заболевания возможно позволит отличить не только норму от таких заболеваний предстательной железы как ДГПЖ и РПЖ, но и различные степени дифференцировки опухолевого процесса (УДР и НДР), что может являться критерием дифференциального подхода к диагностике новообразований предстательной железы и поможет увеличить эффективность лечения больных РПЖ.

### **ЛИТЕРАТУРА**

- [1] *Апратин С.А., Пульбере С.А., Авдошин В.П.* Исследование фактора роста эндотелия сосудов человека и рецепторов к нему как перспективных генетических маркеров диагностики новообразований предстательной железы // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. — 2007. — № 3. — С. 32—38.
- [2] *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 1999.
- [3] *Глухов А.И., Гордеев С.А., Апратин С.А.* Теломеразы: клеточное старение, иммортализация и рак // Вестник научно-исследовательского института молекулярной медицины. — М.: Русский врач, 2006. — Вып. 6.
- [4] *Amin M., Boccon-Gibod L. et al.* Prognostic and predictive factors and reporting of prostate needle biopsy specimens // Scand. J. Urol. Nephrol. — 2005 May. — Suppl. 216. — P. 20—23.
- [5] *Ii M., Yamamoto H., Adachi Y., Maruyama Y.* Role of Matrix Metalloproteinase-7 (Matrilysin) in Human Cancer Invasion, Apoptosis, Growth, and Angiogenesis // Exp Biol Med. — Jan 2006. — Vol. 231. — P. 20—27.
- [6] *Maruta S., Sakai H., Kanda S., Hayashi T.* E1AF expression is associated with extra-prostatic growth and matrix metalloproteinase-7 expression in prostate cancer // APMIS. — Nov 2000. — Vol. 117 (11). — P. 791—6.
- [7] *Yamada M., Tsuji N., Nakamura M., Moriai R.* Down-regulation of TRF1, TRF2 and TIN2 genes is important to maintain telomeric DNA for gastric cancers // Anticancer Res. — Nov 2002. — Vol. 22(6A). — P. 3303—7.

### **REFERENCES**

- [1] *Apryatina S.A., Pulbere S.A., Avdoshin V.P.* Investigation of vascular endothelial growth factor receptor as promising genetic diagnostic markers of prostate tumors // Questions of biological medicinal and pharmaceutical chemistry. — 2007. — № 3. — P. 32—38.

- [2] *Glantz S.* Biomedical Statistics. — M.: Practice, 1999.
- [3] *Glukhov A.I., Gordeev S.A., Apyatin S.A.* Telomerase: cellular senescence, immortalization and cancer // Bulletin of the Research Institute of Molecular Medicine. — Russian doctor. — 2006. — Issue 6.
- [4] *Amin M., Boccon-Gibod L.* et al. Prognostic and predictive factors and reporting of prostate needle biopsy specimens // Scand. J. Urol. Nephrol. — 2005 May. — Suppl. 216. — P. 20—23.
- [5] *Ii M., Yamamoto H., Adachi Y., Maruyama Y.* Role of Matrix Metalloproteinase-7 (Matrilysin) in Human Cancer Invasion, Apoptosis, Growth, and Angiogenesis // Exp Biol Med. — Jan 2006. — Vol. 231. — P. 20—27.
- [6] *Maruta S., Sakai H., Kanda S., Hayashi T.* E1AF expression is associated with extra-prostatic growth and matrix metalloproteinase-7 expression in prostate cancer // APMIS. — Nov 2000. — Vol. 117 (11). — P. 791—796.
- [7] *Yamada M., Tsuji N., Nakamura M., Moriai R.* Down-regulation of TRF1, TRF2 and TIN2 genes is important to maintain telomeric DNA for gastric cancers // Anticancer Res. — Nov 2002. — Vol. 22 (6A). — P. 3303—3307.

## THE ROLE OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND VASCULAR GROWTH FACTORS IN DIFFERENTIAL DIAGNOSTIC OF PROSTATE'S DISEASES

**V.P. Avdoshin**,

**S.A. Pulbere, A.V. Loktev**

Department of urology and operative nephrology  
Peoples' Friendship University of Russia  
*Gospitalnaya Sq., 2-4, Moscow, Russia, 111020*

**A.I. Glukhov**

Department of Health of Moscow  
Moscow Research Institute of Medical Ecology  
*Simferopol'skiy blvd., 8, Moscow, Russia, 266012*

The aim of this study was to determine of TRF1, MMP-7, FLT-1, KDR and VEGF mRNA expression levels obtained from prostate biopsies samples of patients with benign prostatic hyperplasia, prostate cancer and healthy men without prostate pathology. It was demonstrated that detection of TRF1, FLT-1, KDR and MMP-7 expression levels correlations and TRF1/MMP-7 index was criteria of different way for different prostate neoplasm diagnostics.

**Key words:** prostate cancer, TRF1, MMP-7, FLT-1, KDR, vascular growth factors, expression levels.