

СОДЕРЖАНИЕ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-9 В СЛЕЗНОЙ И ВНУТРИГЛАЗНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ МЕЛАНОМЕ ХОРИОИДЕИ**Мария Александровна ЧЕРНЯВСКАЯ^{1,2}, Анатолий Васильевич ЕФРЕМОВ²,
Валерий Вячеславович ЧЕРНЫХ¹, Мария Геннадьевна ПУСТОВЕТОВА²**¹ ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России,
Новосибирский филиал
630096, г. Новосибирск, ул. Колхидская, 10² ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

Изучены концентрации матриксной металлопротеиназы-9 в слезной и внутриглазной жидкости у пациентов с меланомой хориоидеи, выявлена достоверная связь между ними в слезной и внутриглазной жидкости. Установлено, что развитие и рост меланомы хориоидеи сопровождаются увеличением концентрации матриксной металлопротеиназы-9 в слезной жидкости как больного глаза, так и парного «здорового», что свидетельствует о выраженных пролиферативных процессах на локальном уровне.

Ключевые слова: меланома хориоидеи, матриксная металлопротеиназа-9, пролиферация, слезная жидкость, внутриглазная жидкость.

Патогенез развития меланомы хориоидеи (МХ) является актуальной проблемой и определяется высоким удельным весом данной патологии в структуре первичных внутриглазных новообразований органа зрения (80–90 %) [6, 12]. При опухолях различного гистогенеза встречаются разнообразные нарушения в иммунной (противоопухолевой) защите, в то же время обнаружены однотипные иммунные нарушения [7]. Это подтверждает тот факт, что иммунные нарушения являются не только следствием, но и причиной опухолевого роста [4]. Известно, что рост всех солидных опухолей зависит от неоангиогенеза. Экспериментально доказано, что новообразование при прекращении кровоснабжения останавливается в росте и может даже редуцироваться [2, 11, 13]. Установлено, что важную роль в процессе роста и метастазирования опухоли играют матриксные металлопротеиназы – ферменты, разрушающие экстрацеллюлярный матрикс, индуцирующие процессы неоангиогенеза. Изучение этих маркеров является перспективным для определения прогноза течения злокачественных образований [5], в том числе и МХ.

Цель исследования – определить концентрацию матриксной металлопротеиназы-9 в слезной и внутриглазной жидкости больных для уточнения ее клинико-патогенетической значимости при меланоме хориоидеи.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование концентрации матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9) в слезной жидкости (СЖ) и внутриглазной жидкости (ВГЖ) выполнено на 72 глазах у 36 больных с МХ в возрасте от 34 до 83 лет (средний возраст – 60,5 года), находившиеся под наблюдением в 2010–2013 гг. в Новосибирском филиале ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России, из них женщин было 21 (58,3 %), мужчин – 15 (41,7 %). Высота МХ составляла от 1,68 до 15 мм, в среднем – 6,6 мм, максимальный диаметр от 4,73 до 20 мм, в среднем – 12,83 мм. В зависимости от локализации МХ пациенты распределились следующим образом: 12 (33,3 %) пациентов с преэкваatorialным расположением опухоли, 13 (36,1 %) – с постэкваatorialным,

Чернявская М.А. – аспирант кафедры патофизиологии, врач 7-го офтальмологического отделения,
e-mail: mach.mntk@gmail.com

Ефремов А.В. – заслуженный деятель науки РФ, член-корр. РАН, проф., зав. кафедрой патофизиологии, e-mail: eav48@yandex.ru

Черных В.В. – д.м.н., проф., директор, e-mail: rimma@mntk.nsk.ru

Пустоветова М.Г. – д.м.н., проф. кафедры патофизиологии, зав. ЦНИЛ, e-mail: patophysiolog@mail.ru

11 (30,6 %) – с обширной опухолью. Согласно международной классификации TNM (Tumor Nodus Metastasis) (2011), распределение МХ было следующим: 8 опухолей (22,2 %) соответствовало стадии T1aN0M0, 9 (25 %) – стадии T2aN0M0, 10 (27,8 %) – стадии T3aN0M0 и 9 (25 %) – стадии T4a, c N0M0.

Органоуносящее лечение в виде энуклеации проведено у 11 больных (30,6 %) с одновременным забором ВГЖ и дальнейшим гистологическим исследованием. 25 пациентов (69,4 %) были направлены на консультацию и решение вопроса о возможности органосохранного лечения в головной организации ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России г. Москва.

Офтальмологическое обследование проводилось в виде визометрии, пневмотонометрии (при необходимости – тонометрии по Маклакову), биомикроскопии переднего отрезка глаза, прямой и обратной офтальмоскопии при помощи высокодиоптрийной линзы, А-В-сканирования, по показаниям – гониоскопии, оптической когерентной томографии и флуоресцентной ангиографии глазного дна (при отсутствии противопоказаний). При сборе анамнеза у пациента выяснялось время от начала появления симптомов заболевания (если были таковые) до первичного обращения к врачу, наличие профессиональных вредностей в течение длительного периода времени, проживание в местах с неблагоприятной экологической обстановкой, отягощенный семейный анамнез по онкологическим заболеваниям, а также наличие хронических заболеваний различных органов и систем.

Всем пациентам с МХ до хирургического вмешательства осуществлялся забор 0,5 мл СЖ с обоих глаз микроканюлей из нижнего конъюнктивального свода в сухую герметичную пробирку. В качестве нормативных значений использованы данные обследования 20 «практически здоровых» доноров слезной жидкости – добровольцев. Концентрацию MMP-9 определяли при помощи метода иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA) на тест-системах R&D Systems (США) кат. № DMP900 по инструкции производителя. Используемый метод основан на принципе «сэндвича». На внутренней стенке ячеек планшета в избытке фиксированы специфические моноклональные антитела к определяемому агенту. При проведении первой иммунной реакции свободный плазменный антиген определяемого агента взаимодействует с пристеночными моноклональными антителами, что приводит к образованию комплекса в процессе инкубирования образцов.

После чего присутствующие в тест-системе компоненты удаляются промыванием.

Для статистической обработки данных использованы методы описательной статистики и межгруппового сравнения. Количественные характеристики представлены как медиана (25; 75 процентиль). Качественные признаки представлены как пропорция (%). Для сравнения количественных и качественных признаков применялись регрессионный анализ и критерий Пирсона χ^2 соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что рост всех солидных опухолей зависит от неоангиогенеза; новообразование при прекращении кровоснабжения останавливается в росте и может даже редуцироваться. Также есть данные о том, что вертикальный рост опухоли зависит от ангиогенеза и что последний индуцируется самими опухолевыми клетками. В последние годы доказано, что пролиферативная активность опухоли является одной из наиболее важных характеристик ее фенотипа, в значительной степени определяющей скорость роста опухоли, способность его к метастазированию, к ответу на лечебные мероприятия и, в конечном итоге, исход онкологического заболевания [2, 11, 13]. Существуют данные об исследованиях содержания MMP-9 при различных онкологических процессах, таких как плоскоклеточные карциномы головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы и т. д.

MMP-9 выбрана объектом исследования как фермент системы эндопептидаз, принимающих участие в деструкции внеклеточного матрикса, обеспечении опухолевой инвазии и метастазирования. Кроме способности к процессам деградации компонентов межклеточного матрикса, отмечено участие MMP-9 в аутокринной регуляции апоптоза и клеточной пролиферации [1]. Однако до сих пор остаются не изученными концентрация и клинико-патогенетическая значимость MMP-9 при МХ. Исследования в этой области необходимы как для возможности определения готовности к метастазированию, так и для определения агрессивности злокачественного процесса.

Учитывая эти данные, несомненный интерес представляло изучение процессов пролиферации злокачественной опухоли собственно сосудистой оболочки глаза. Для определения активности пролиферативных процессов внутриглазной опухоли исследовано содержание MMP-9 в СЖ и ВГЖ у пациентов с МХ.

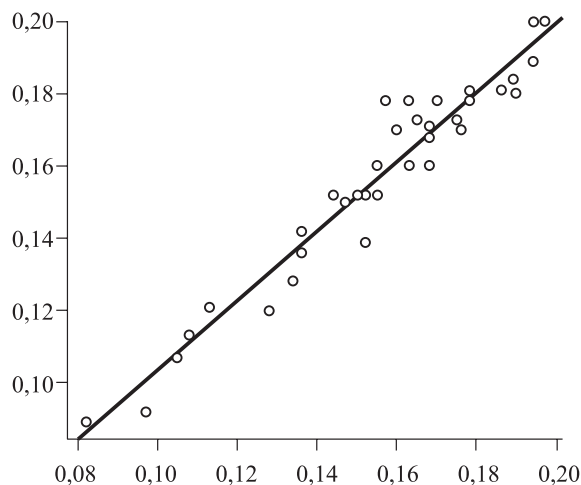


Рис. 1. Концентрация ММР-9 (нг/мл) в СЖ пораженного (ось абсцисс) и здорового глаз (ось ординат). Коэффициент регрессии (95%-й доверительный интервал) 0,96 (0,88; 1,05), $p < 0,05$. Коэффициент корреляции (95%-й доверительный интервал) 0,97 (0,94; 0,98), $p < 0,05$

Установлено, что в СЖ и ВГЖ больных глаз с МХ, парных «здоровых» глаз и в контроле выявление ММР-9 составило 100 %. Статистически достоверной зависимости концентрации ММР-9 в слезной жидкости пораженного органа от пола или возраста пациентов в исследуемой группе обнаружено не было. Выявлена статистически достоверная прямая положительная связь показателя пораженного и «здорового» глаза пациентов с МХ (рис. 1), на 1 нг/мл повышения концентрации ММР-9 в слезной жидкости пораженного гла-

за приходится в среднем 0,96 нг/мл возрастания концентрации маркера в слезной жидкости интактного органа.

По концентрации ММР-9 СЖ глаза, пораженного МХ, и парного «здорового» глаза достоверно не различались, при этом величина данного показателя обоих глаз пациентов с МХ была статистически значимо выше, чем у лиц контрольной группы (рис. 2). Достоверное повышение содержания ММР-9 в пораженном глазу у пациентов с МХ, возможно, говорит о выраженных пролиферативных и деструктивных процессах, связанных с развитием опухолевого процесса, так как ММР-9 является ключевым медиатором ангиогенеза, стимулируя пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов [9, 10]. Увеличение концентрации ММР-9 в «здоровом» парном глазу может свидетельствовать о защитных иммунных реакциях организма от возникновения двустороннего опухолевого процесса. Как известно из литературы, встречаемость билатеральной МХ среди населения составляет не более 1,5 % [3, 8, 12]. Концентрация ММР-9 в ВГЖ пациентов с МХ была достоверно выше, чем в СЖ лиц контрольной группы (рис. 3).

При исследовании концентрации ММР-9 в СЖ в зависимости от стадии процесса (Т1N0M0, Т2N0M0, Т3N0M0, Т4N0M0) установлено, что при стадии Т1 она составила 1,67 (1,12; 1,90) нг/мл, при стадии Т2 – 1,68 (1,52; 1,78) нг/мл, при стадии Т3 – 1,69 (1,56; 1,76) нг/мл, при стадии Т4 – 1,55 (1,44; 1,6) нг/мл. Таким образом, статистически достоверной зависимости содержания ММР-9 в СЖ пораженного органа от стадии процесса

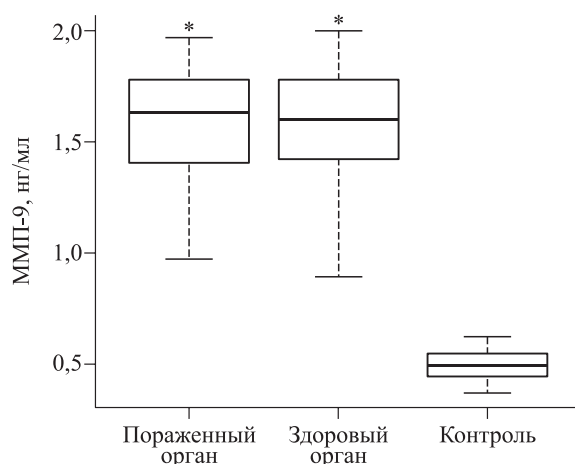


Рис. 2. Концентрация ММР-9 (нг/мл) в СЖ пациентов с МХ (больной и парный «здоровый» глаз) в сравнении с показателями контрольной группы. Здесь и на рис. 3 * – отличие от величины соответствующего показателя контроля статистически значимо при $p < 0,01$

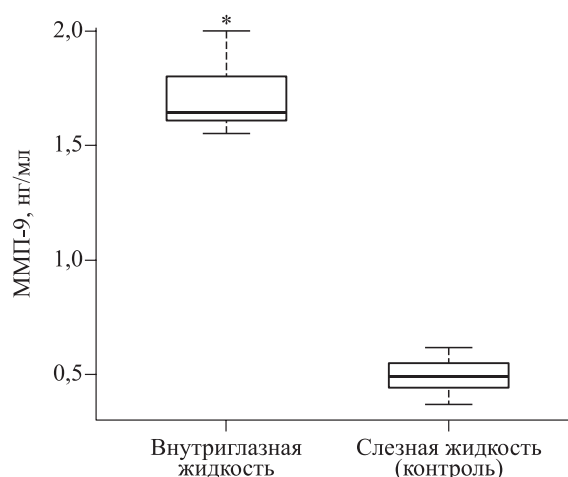


Рис. 3. Концентрация ММР-9 (нг/мл) в ВГЖ пациентов с МХ в сравнении с показателями СЖ контрольной группы

не выявлено. При этом концентрация MMP-9 в слезной жидкости всех стадий достоверно выше значений контрольной группы (0,5 [0,45; 0,54] нг/мл), $p < 0,01$.

Не обнаружено зависимости концентрации MMP-9 в СЖ пораженного органа в зависимости от локализации процесса: при преэкваatorialной, постэкваatorialной и обширной локализации она составила 1,52 (1,34; 1,60), 1,68 (1,36; 1,86) и 1,63 (1,53; 1,73) нг/мл соответственно, будучи во всех случаях достоверно выше значения контрольной группы ($p < 0,01$).

Содержание MMP-9 в ВГЖ составило 1,62 (1,2; 1,63), 1,73 (1,58; 1,81) и 1,87 (1,80; 1,93) нг/мл при эпителиоидном, веретенчатом и смешанно-клеточном типах соответственно. Учитывая малое количество наблюдений, анализ зависимости MMP-9 от гистологического типа образования не проводился.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Выявлена статистически достоверная прямая линейная положительная связь концентрации MMP-9 в СЖ и в ВГЖ, что свидетельствует о возможности использования СЖ для исследования процессов пролиферации на локальном уровне у пациентов с МХ.

2. У пациентов с МХ выявлена прямая положительная связь между концентрацией MMP-9 в СЖ глаза с МХ и парного «здорового» глаза.

3. В патогенезе МХ важную роль играют активные пролиферативные процессы, это подтверждается высоким уровнем MMP-9 по сравнению с нормативными показателями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксененко М.Б. Матриксная металлопротеиназа-9 как потенциальная молекулярная мишень для терапии меланомы кожи // Сиб. онкол. журн. 2011. (Прил. 1). 8–9.

2. Зиангирова Г.Г., Лихванцева В.Г. Опухоли сосудистого тракта глаза. М.: Последнее слово, 2003. 456 с.

3. Малецкий А.П., Воронкова А.Л., Гаврина Г.Б. Изменение иммунореактивности у больных с увеальной меланомой в процессе органосохранного лечения по данным рост-модифицирующих свойств сыворотки крови // Офтальмол. журн. 1997. (1). 34–38.

4. Пантелева О.Г., Пармон Я.В. Структура заболеваемости внутриглазными опухолями по данным отдела офтальмоонкологии и радиологии ФГУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» за 2002–2006 гг. // Современные технологии в дифференциальной диагностике и лечении внутриглазных опухолей: сб. науч. тр. Всерос. науч.-практ. конф. М., 2007. 29–36.

5. Савенкова О.В., Завьялова М.В. Экспрессия металлопротеиназ в различных морфологических структурах при раке гортани // Сиб. онкол. журн. 2011. (Прил. 1). 102–104.

6. Семенова Л.Е. Клинико-эпидемиологические аспекты, комплексное лечение увеальных меланом: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2002.

7. Шабашова Н.В. Лекции по клинической иммунологии. СПб., 1998. 114 с.

8. Burr J.M. Survival from uveal melanoma in England and Wales 1986 to 2001 // Ophthalmic Epidemiol. 2007. 14. 3–8.

9. Coussens L.M., Tinkle C.L., Hanahan D., Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis // Cell. 2000. 103. (3). 481–490.

10. Giraud E., Inoue M., Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis // J. Clin. Invest. 2004. 114. (5). 623–633.

11. Lane A.M., Egan K.M., Yang J. et al. An evaluation of tumor vascularity as a prognostic indicator in uveal melanoma // Melanoma Res. 1997. 7. (3). 237–242.

12. Richtig E., Langmann G, Müllner K, Smolle J. Ocular melanoma: epidemiology, clinical presentation and relationship with dysplastic nevi // Ophthalmologica. 2003. 218. (2). 111–114.

13. Shields C.L., Eagle R.C., Ip M.S. et al. Two discrete uveal melanomas in a child with ocular melanocytosis // Retina. 2006. 26. (6). 684–687.

CONTENT OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 IN THE LACRIMAL AND INTRAOCULAR LIQUIDS IN CHOROIDAL MELANOMA

Mariya Aleksandrovna CHERNYAVSKAYA¹, Anantoliy Vasil'evich EFREMOV², Valeriy Vyacheslavovich CHERNYKH¹, Mariya Gennad'evna PUSTOVETOVA²

¹ *Intersectoral Research and Technology Complex «Eye microsurgery» n.a. acad. S.N. Fyodorov of Minzdrav of Russia, Novosibirsk Branch
630096, Novosibirsk, Kolkhidskaya str., 10*

² *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
6300091, Novosibirsk, Krasniy av., 52*

The concentrations of matrix metalloproteinase-9 in the lacrimal and intraocular liquids in patients with choroidal melanoma have been investigated. The significant association between matrix metalloproteinase-9 concentrations in the lacrimal and intraocular liquids has been revealed. It has been shown that the development and growth of choroidal melanoma are associated with the increase in concentrations of matrix metalloproteinase-9 in the lacrimal and intraocular liquids in affected eye as well as in paired «healthy» eye. That indicates the pronounced proliferative processes at the local level.

Key words: choroidal melanoma, matrix metalloproteinase-9, proliferative processes, tear fluid, intraocular fluid.

*Chernyavskaya M.A. – postgraduate student of pathophysiological department, ophthalmologist,
e-mail: mach.mntk@gmail.com*

*Efremov A.V. – honored scientist of the RF, corresponding member, professor, head of the department
of pathophysiology, e-mail: eav48@yandex.ru*

Chernykh V.V. – doctor of medical sciences, professor, director, e-mail: rimma@mntk.nsk.ru

*Pustovetova M.G. – doctor of medical sciences, professor, head of central scientific research laboratory,
e-mail: patophysiol@mail.ru*