

Ю.А. Гордієнко
А.І. Шевцова
Т.П. Ніколаєнко-Камишова

КЗ «Міська багатопрофільна
клінічна лікарня №4»

Дніпропетровська державна
медична академія,
Дніпропетровськ, Україна

Ключові слова: желатинази
А і В, онкогематологічні
захворювання, інгібітори
металопротеїназ.

ЖЕЛАТИНАЗИ А І В ПРИ ОНКОГЕМАТОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ

Резюме. У роботі розглянуто структуру і функції, механізми регуляції синтезу та активності желатиназ А і В у клітинах крові на різних етапах гемопоезу. Узагальнено дані щодо ролі желатиназ у патогенезі пухлинних захворювань кровотворної та лімфоїдної тканин, можливостей їх використання як діагностичних і прогностичних маркерів. Досліджено перспективи використання природних і синтетичних інгібіторів желатиназ як терапевтичних агентів.

Желатинази належать до сімейства матриксних металопротеїназ (ММП) — матриксинів, що є кальцій-залежними цинк-вмісними ендопептидазами, які гідролізують білки екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ). Нині відомо приблизно 30 різних ММП, які на основі субстратної специфічності розділено на 5 груп: колагенази; желатинази (Ж); стромелізини; мембранозв'язані ММП; інші матриксини, не зараховані до вищезазначених груп. Субсімейство Ж включає 2 ферменти — желатиназу А (ММП-2) і желатиназу В (ММП-9). Обидві ММП виявляють високу спорідненість до колагену IV типу, тому іноді їх називають колагеназами IV типу. Першою в 1982 р. ідентифікували ММП-9 як желатин-зв'язуючий білок, що синтезується макрофагами людини [1], а у 1983 р. з клітин саркоми мишей було виділено та очищено ММП-2 [2].

Ж займають центральну позицію в регулюванні балансу між процесами синтезу та протеолізу в ЕЦМ і значно впливають на реалізацію фізіологічних процесів та патологічних змін в організмі. Зокрема, завдяки своїй здатності руйнувати колаген базальних мембран і ремоделювати ЕЦМ у мікрооточенні клітин-попередників крові вони відіграють важливу роль у забезпеченні гемопоезу [3]. Останнім часом ці ферменти активно досліджуються як прогностичні чинники при солідних пухлинах [4–6]. Водночас інформація про роль та клініко-біохімічне значення Ж при розвитку пухлинних захворювань кровотворної та лімфоїдної тканин розрізнена та вкрай обмежена.

Метою цього огляду є узагальнення сучасних даних щодо ролі та структурно-функціональних змін Ж при онкогематологічних захворюваннях, обговорення діагностичного значення цих ферментів і можливостей застосування їх інгібіторів у терапії відповідної категорії хворих.

Структурно-функціональна характеристика. Ж синтезуються як препробліки і секретуються у вигляді проферментів або зимогенів, що мають характерну доменну структуру. Як й інші ММП, прожелатинази містять продомен, каталітичний та гомопексиновий домени (рис. 1). До складу продомену входить консервативна послідовність PRCGXPD, неспарений залишок цистеїну якої утворює координаційний зв'язок

з іоном Zn^{2+} активного центру і в такий спосіб утворює фермент у латентній формі. Гомопексиновий домен відповідає за зв'язування із субстратами та інгібіторами [7]. За даними Dufour A. et al, гомопексиновий домен проММП-9 також може бути задіяний у міграції епітеліальних клітин [8]. Між каталітичним та гомопексиновим доменами знаходиться шарнірний (hinge) регіон, який бере участь у зв'язуванні та перетворенні субстрату [9].

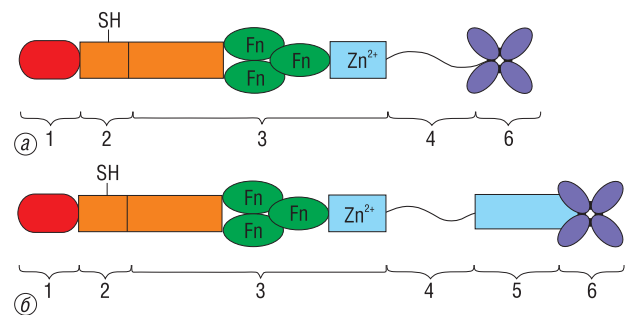


Рис. 1. Доменна структура желатиназ А (а) і В (б): 1 — предомен, 2 — продомен, 3 — каталітичний домен, 4 — шарнірний регіон, 5 — колагеноподібний домен, 6 — гомопексиновий домен

На відміну від інших ММП у каталітичному домені Ж визначають 3 фібронектинові послідовності II типу, тому було запропоновано зазначити цю ділянку як фібронектиновий домен. Визначення тримірної структури Ж показало, що прожелатинази А і В відрізняються розташуванням 2-го фібронектинового модуля: у проММП-2 він знаходиться в ділянці, що взаємодіє з каталітичним доменом, а в проММП-9 — закручений та розгорнутий у протилежну сторону від нього. Фібронектиновий домен бере участь у зв'язуванні желатинів, колагену I та IV типів і ламініну [10].

Порівняльну характеристику Ж наведено в таблиці. Желатиназа А синтезується у вигляді попередника з Мм 72 кДа, активна форма має Мм 62–65 кДа [11]. Желатиназа В синтезується у вигляді пробліку з Мм 78 кДа, потім глікозилюється в апараті Гольджі і секретується як проензим із Мм 91–96 кДа, який містить збагачену проліном додаткову встав-

Порівняльна характеристика Ж

	Желатиназа А (ММП-2)	Желатиназа В (ММП-9)	Літературне джерело
Молекулярна маса	72 кДа латентна форма 62–64 кДа активна форма	91–96 кДа латентна форма 82–85 кДа активна форма 210–220 кДа димерний комплекс 125–130 кДа комплекс із ліпокаліном	[11, 12, 13]
Місце синтезу	Майже всі нормальні та пухлинні клітини	Трофобласт, остеобласти, лейкоцити та їхні попередники, тромбоцити, пухлинні клітини	[27, 51, 56]
Активатори	Окиснений глутатіон, МТ1-ММП, тромбін, активатор плазміногену урокіназного типу, лужна фосфатаза	Окиснений глутатіон, катепсин G, трипсин, α -хімоліпсин, стромелізін, плазмін, колагеназа 1, хімаза тучних клітин, ММП-2, нейтрофільна еластаза, матрилізін	[9, 19, 24]
Інгібітори	ТІМП-1, ТІМП-2, ТІМП-3, ТІМП-4, α 2-макроглобулін		[10, 26]
	Підвищена афінність до ТІМП-2	ТІМП-1	
Субстрати	Колаген IV, V, VII, X, XI, XIV типів, желатин, фібронектин	Еластин, остеоонектин, ІЛ-1 β , галектин-3, вітронектин, Колаген I, II, III, XI типів, ламінін-1, -5, ММП-1, -9, -13	[9, 10, 16]

ку між каталітичним та гемопексиновим доменами [12]. Протеолітичний гідроліз призводить до появи активної форми з Мм 82–85 кДа. Слід відзначити, що прожелатиназа В може утворювати димери з Мм 210–220 кДа за рахунок дисульфідних зв'язків, причому димеризація відбувається одночасно з глікозилуванням [13]. Прожелатиназа В також здатна утворювати комплекс із ліпокаліном із Мм 125–130 кДа, який захищає ММП-9 від аутодеградації, зберігаючи її ферментативну активність [14].

Регуляція синтезу та активності Ж. Більшість типів тканин постійно синтезують желатиназу А, натомість желатиназа В є індукцибельним ферментом, експресія якого залежить від наявності цитокінів [15, 16], стероїдних та тиреоїдних гормонів [17], хімічних агентів (ліпополісахариди, форболовий ефір та ін.) [18] і фізичних чинників (гіпертермія, низький рН, опромінення тощо) [19].

Регулятором експресії Ж може бути індуктор екстрацелюлярної матричної металопротеїнази ЕММРІН, також відомий як М6 антиген, або CD147. Цей глікопротеїн сімейства імуноглобулінових адгезивних молекул синтезується багатьма нормальними і малігнізованими тканинами [20, 21], проте індуктує синтез Ж тільки його глікозилувана форма [22]. Крім того, індукція експресії Ж може здійснюватися фібронектином через інтегрин-опосередковані сигнальні шляхи за участю Src-тирозинкінази [23].

Активіація Ж відбувається шляхом часткового протеолізу під дією різних ферментів, а також тіолмодифікуючих агентів, фрагментів фібронектину. Окрім цього, ММП-2 може активуватись через дефосфорилювання [24], а ММП-9 – S-нітразування [25].

У фізіологічних умовах антагоністами Ж є тканинні інгібітори ММП – ТІМП (ТІМП-1, ТІМП-2, ТІМП-3, ТІМП-4). Усі 4 групи ТІМП здатні пригнічувати протеоліз латентних форм та інгібувати активні форми Ж, але ТІМП-1 активніший щодо ММП-9, а ТІМП-2 виявляє специфічність стосовно ММП-2 [26].

Цікаво, що ТІМП-2 не тільки інгібує ММП-2, а й бере участь в активації її попередника. Встановлено, що активація проММП-2 відбувається за по-

середництвом мембранозв'язаної металопротеїнази 1-го типу (МТ1-ММП), яка є рецептором ТІМП-2, що, зв'язуючись із МТ1-ММП, одночасно приєднує проММП-2. У складі цього потрійного комплексу відбувається відщеплення пропептиду та утворення активної ММП-2 із Мм 62 кДа, яка залишається зв'язаною з ТІМП-2. Приєднання до комплексу ММП-2/ТІМП-2 2-ї молекули ТІМП-2 призводить до інактивації ферменту [27]. Желатиназа В також синтезується у вигляді попередника, зв'язаного з ТІМП-1, але на відміну від желатинази А цей фермент може знаходитись у цитоплазмі клітин як в латентній, так і в активній формі [28].

У тканинах Ж інгібуються й α 2-макроглобуліном (α 2-МГ). Комплекс α 2-МГ/ММП видаляється за допомогою scavenger-рецепторів під час ендозитозу — отже, відбувається незворотне видалення ММП. Припускають, що α 2-МГ є основним регулятором колагенолізу у фізіологічних рідинах [9].

Експресія та локалізація Ж в клітинах крові. Рух клітин крові з кісткового мозку (КМ) в кровообіг, а потім у тканини потребує перетинання стінок капілярів, міграції через базальну мембрану та попадання в строму органів. Базальна мембрана і структурні компоненти ЕЦМ перешкоджають міграції та проліферації клітин, утворюючи головний бар'єр на цьому шляху. Для подолання сполучнотканинного бар'єра клітини крові секретують ММП, у тому числі й Ж. Нині встановлено, що синтез та експресія Ж відбувається в зрілих лімфоцитах, гранулоцитах, моноцитах і тромбоцитах, а також у деяких клітинах-попередниках, причому одні клітини проявляють постійну желатиназну активність, а інші — лише після стимуляції цитокінами. Спрощену схему диференціювання клітин крові та експресію Ж на різних стадіях гемопоезу представлено на рис. 2.

Характерно, що гемопоетичні стовбурові клітини, які є прямими попередниками клітин КМ, у стані спокою не експресують Ж. У серії елегантних експериментів Janowska-Wieczorek A. та співробітники показали, що в CD34+–клітинах, виділених із КМ, не визначається мРНК Ж, а аналогічна популяція клітин периферичної крові має високий рівень експресії генів цих ферментів і здатна до міграції крізь штучну модель базальної мембрани. Експресія Ж у CD34+

клітинах периферичної крові стимулюється гранулоцит- та макрофаг-колоніестимулюючими факторами, а також інтерлейкінами (ІЛ) 3, 6, 8. На думку авторів, цитокінова стимуляція експресії Ж відбувається на рівні диференціації ембріональних стовбурових клітин у попередники лімфопоезу та мієлопоезу і забезпечує міграцію клітин із КМ у периферичну кров [29].

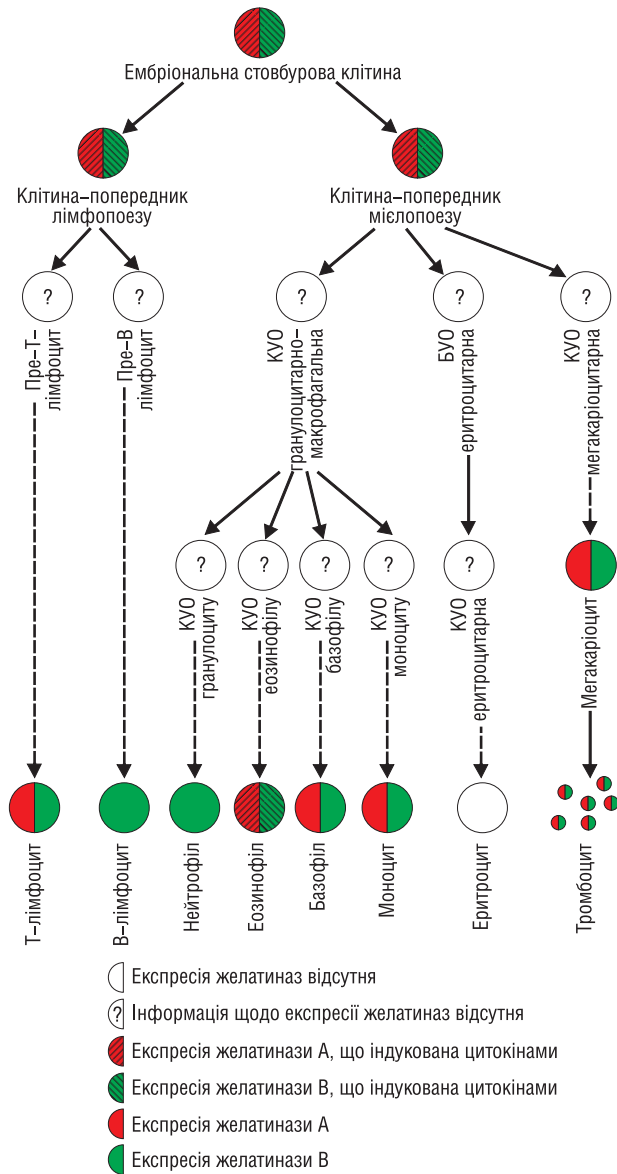


Рис. 2. Основні етапи гемопоезу та експресія Ж окремими клітинами на різних стадіях диференціації за умов норми. Примітка: КYO – колонієутворююча одиниця, БУО – бурстотворююча одиниця

У літературі відсутні відомості щодо желатинолітичної активності проміжних форм Т- і В-лімфоцитів, а всі проведені дослідження стосуються останніх етапів їх дозрівання та функціонування. Встановлено, що за відсутності зовнішнього запального стимулу всі субпопуляції Т-лімфоцитів секретують і ММП-2, і ММП-9 у невеликій кількості [30]. На ранніх стадіях запального процесу Т-лімфоцити в тканинах знаходяться разом із нейтрофілами та моноцитами/макрофагами, які генерують реактив-

ні форми кисню та азоту, протеолітичні ферменти, цитокіни (особливо ІЛ-8), що стимулюють експресію Ж у лімфоцитах. Експресія Ж у лімфоцитах також потребує контакту з молекулою внутрішньоклітинної адгезії-1, фібронектином та вітронектином [31]. Посилення синтезу та секреції Ж, у свою чергу, стимулює міграцію лімфоцитів через базальну мембрану у фокус запалення [32]. Згідно з даними Abraham M. та ін., міграційна активність різних підгруп Т-хелперів (Th) суттєво відрізняється: у Th1 вища, ніж у Th2 та Th0, та обумовлена підвищеним рівнем активності ММП-2 і ММП-9 [33]. Натуральні кілери (NK) у фізіологічних умовах продукують ці ензими на пороговому рівні, але під дією ІЛ-2 експресія генів Ж у NK значно підвищується [34].

В-лімфоцити синтезують ММП-9, кількість якої залежить від балансу між про- та протизапальними цитокінами. Так, прозапальні ІЛ-1β та ІЛ-8 посилюють синтез проММП-9 у В-лімфоцитах, натомість ІЛ-6 та фактор некрозу пухлин α (ФНП α) не мають значного впливу. Той факт, що ФНП β пригнічує активність ММП-9 В-лімфоцитів і посилює її в Т-лімфоцитах, свідчить про реципрокність регулювання експресії генів Ж у цих клітинах [35].

Функціонально активні нейтрофіли не синтезують ММП-2, але синтезують ММП-9, тому останній фермент розглядають як маркер циркулюючих нейтрофілів. ММП-9 міститься в третинних (желатиназних) гранулах, які формуються ще на ранніх стадіях диференціації нейтрофілів пізніше специфічних (вторинних) та складають приблизно 25% усіх пероксидазо-негативних гранул. Основна функція желатиназних гранул полягає в стимуляції активності оксидазного комплексу нейтрофілу і реалізації його секреторної та фагоцитарної активності. Після стимуляції нейтрофілу прозапальними медіаторами типу ІЛ-8 відбувається швидка мобілізація желатиназних гранул і вивільнення проММП-9 [36]. Цей фермент може активувати нейтрофільна еластаза, що вивільняється з азурофільних гранул, або метаболіти активного кисню, генеровані НАД(Ф)Н-оксидазою [37].

Циркулюючі еозинофіли синтезують незначну кількість ММП-9. Стимуляція цих клітин ІЛ-5, ІЛ-8, ФНП α , ТФР β та нейтрофільною еластазою призводить до посилення експресії та активації ММП-2 і ММП-9 [38, 39]. Базофіли також синтезують переважно ММП-9, синтез ММП-2 відбувається в незначній кількості. Слід зазначити, що деградація ЕЦМ під впливом ММП-9 інтенсивніша, ніж під впливом ММП-2, тому превалювання синтезу ММП-9 в означених клітинах сприяє їх міграції в тканини [40].

Моноцити займають одне з провідних місць у здійсненні контролю за перебувкою ЕЦМ, що передбачає як пряму деструкцію тканин безпосередньо за рахунок синтезу Ж, так і непряму за рахунок виділення низки цитокінів (ІЛ-1 β , ФНП α та ін.), які їх активують. Моноцити секретують невелику кількість ММП-2 та ММП-9 [27]. Під час диференціювання моноцитів у макрофаги експресія ММП-9 може

підвищуватись у 15 разів, що дає змогу моноцитам та макрофагам мігрувати до фокуса запалення [41].

Мегакаріоцити синтезують обидві Ж. ММП-2 знаходиться в цитоплазмі, вважають, що вона може бути асоційована з α -гранулами цих клітин. ММП-9 локалізується в демаркаційній мембранній системі і відповідає за тромбоз. Експресію та секрецію ММП-9 мегакаріоцитами стимулюють хемокіни, такі як стромальний фактор-1, цитокіни ІЛ-3, ІЛ-6, мегакаріоцит-стимулюючий фактор та ін. [42, 43].

Що стосується проММП-2, то в тромбоцитах ця желатиназа не асоційована ні з α -, ні зі шільними δ -гранулами, а розподілена в цитоплазмі [44]. Адгезія тромбоцитів під дією різних факторів призводить до вивільнення проММП-2 та МТ-ММП-1, їхньої активації та подальшого зв'язування з β 3-інтегринами, що є рецепторами для багатьох лігандів. Колокалізація ММП-2 із β 3-інтегринами призводить до активації адгезії та агрегації тромбоцитів [45]. Як було показано, кількість вивільненої ММП-2 корелює з рівнем агрегації тромбоцитів *in vitro*, а ММП-9 проявляє антиагрегаційні властивості [46]. Застосування інгібіторів агрегації або анти-ММП-2 антитіл зумовлює зниження секреції Ж А [27]. Цікаво те, що в тромбоцитах поряд із Ж виявляються їх специфічні інгібітори ТІМП-1 і ТІМП-2. Співвідношення цих інгібіторів впливає на активність ММП-2, а також на колаген- та АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів. У невеликій кількості ТІМП-2 сприяє утворенню тримолекулярного комплексу МТ-ММП/ТІМП-2/проММП-2 та активує проММП-2 й агрегацію тромбоцитів, а за значного збільшення цього інгібітора відмічається протилежний ефект. Навпаки, ТІМП-1 не здатний утворити комплекс із МТ-ММП і є ефективним інгібітором ММП-2, тому за його підвищення агрегація тромбоцитів пригнічується [47].

Отже, усі зрілі клітини периферичної крові, крім еритроцитів, постійно синтезують ММП-9, у той час як ММП-2 знайдено лише в Т-лімфоцитах, базофілах, моноцитах, мегакаріоцитах і тромбоцитах. Ж клітин крові відіграють важливу роль не тільки в процесах міграції клітин, а й у регуляції гемостазу.

Експресія та активність Ж при пухлинних захворюваннях кровотворної і лімфоїдної тканини. Онкогематологічні захворювання крові характеризуються пригніченням і витісненням нормального гемопоєзу, структурними змінами мікрооточення, локальним розростанням та дисемінацією пухлинних клітин через периферичну кров із наступною інфільтрацією внутрішніх органів, слизових оболонок, шкіри тощо. Прогресування захворювання відбувається завдяки специфічно зміненим процесам матричної деградації та клітинної адгезії. Дослідження останніх років встановили, що існує механістичний і функціональний зв'язок між двома цими процесами, а Ж беруть участь у них через множинні координовані взаємодії для полегшення руху клітин через ЕЦМ [48].

Оцінка рівня експресії ММП-2 і ММП-9 при гострих лейкозах має діагностичне значення. Рівень Ж при гострому мієлоїдному (ГМЛ) і гострому лімфобластному (ГЛЛ) лейкозах значно підвищується порівняно з контролем. Крім того, експресія Ж у КМ не корелює з кількістю бластних клітин у периферичній крові. У той самий час експресія ММП-2 корелює з високою кількістю бластних клітин у КМ і тому може бути пов'язана з агресивністю процесу. За даними Lin L.I. та співавторів, при ГМЛ у пацієнтів, які досягли ремісії, рівень ММП-9 був вищим, ніж за резистентних форм захворювання [49]. Експресія цього ферменту також посилюється при рецидиві, що вказує на зв'язок активності ММП-9 із фазою захворювання. Наявність функціонального зв'язку між експресією ММП-9 та ІЛ-18 при ГМЛ передбачає підвищення її продукування та посилення інвазивності лейкемічних клітин [50]. За даними Гайдамаки Н. та співавторів, ММП-2 експресують 100% бластів, а ММП-9 — приблизно 53%. Автори пов'язують це з тим, що ММП-9 синтезують тільки функціонально зрілі лейкоцити, тому за повного витіснення нормальних елементів КМ бластними експресія ММП-9 значно знижується [51]. Qing Rao та ін. отримали аналогічні результати, які показали, що зниження активності ММП-9 при залученні продукції макрофаг-колонієстимулюючого фактора сприяє бурхливому росту лейкемічних клітин лінії J6-1 [52].

Цікавим є той факт, що під час дослідження Ж на поверхні лейкемічних клітин ліній HL-60 і NB4 та *ex vivo* на поверхні бластних клітин поряд із 94 кДа проММП-9 виявили унікальну 82 кДа проММП-9. Науковці припустили, що в ендоплазматичному ретикулумі та апараті Гольджі порушується N-термінальний процесінг і, як наслідок, O-глікозилювання. Також було продемонстровано, що асоційована з мембраною 82 кДа проММП-9 трансформується в активну форму з Мм 35 кДа, субстратна специфічність якої суттєво не відрізняється від такої 82 кДа ММП-9. Вивчення впливу ТІМП на 82 кДа проММП-9 показало, що для збереження останньої в неактивному стані необхідна кількість ТІМП-1 у 80 разів більша, ніж зазвичай потрібна для дезактивації 94 кДа проММП-9 [53].

Активність Ж у клітинах КМ може поінформувати про перебіг хронічного мієлоїдного лейкозу (ХМЛ). Імуногістохімічне виявлення ММП-2 позитивних зразків КМ вказує на прискорення розвитку бластного кризу у таких пацієнтів, причому може відмічатися прогресування ХМЛ та мієлодиспластичного синдрому (МДС) у гостру форму захворювання [54]. Вживаність у групах хворих із нижчим рівнем ММП-2 значно вища і пов'язана зі сприятливим прогнозом подальшого перебігу патології [55]. Характерно, що в пацієнтів із МДС еритробласти експресують ММП-2. Виявлено позитивну кореляцію між експресією ММП-2 та еритроїдною дисплазією, а між експресією ММП-9 мієлоїдними

та бластними клітинами – зворотної зв'язок [56]. За власними даними, у плазмі крові хворих на сублейкемічний мієлоз та еритремію відмічається стійке підвищення активності Ж, причому активність ММП-9 у середньому становила 435,6 та 264,0% відповідно [57].

Інша тенденція простежується при лімфомі Ходжкіна. Стійка експресія ММП-2 корелює зі сприятливим прогнозом, у той час як експресія ММП-9 є індикатором швидкого розвитку пухлини [58]. Виявлення ММП-9 при неходжкінських лімфомах — негативна ознака, що свідчить про дисемінацію та неоваскуляризацію пухлин [59].

Важливу роль Ж відіграють у розвитку і прогресуванні множинної мієломи (ММ) [60]. Як було показано, мієломні клітини постійно експресують ММП-9, але кореляції між експресією цього ензиму та агресивністю захворювання не виявлено. Слід відзначити, що активність ММП-2 корелює з пухлинною інвазією та дисемінацією клітин ММ. У разі ММ у мишей блокування остеолізу і зниження кількості кісткових ушкоджень досягається завдяки SC-964 інгібітора ММП, який прямо діє на Ж і низьку цитокінів типу ІЛ-6 [61].

Розлади гемостазу в загальній патології людини і, зокрема, при онкогематологічних процесах відзначаються високою небезпекою тромбоеморагічних захворювань та синдромів. Гемодинамічні порушення є значною ланкою патогенезу пухлинних захворювань крові і також не обходяться без участі Ж. Ще наприкінці 90-х років ХХ ст. доведено проагрегаційну роль ММП-2 [44]. Як було показано, пухлинні клітини набувають здатності «прикриватися» тромбоцитами, тому імунна система організму їх не розпізнає. Така властивість сприяє дисемінації пухлини і метастазуванню. Ступінь ММП-2-залежної агрегації визначається експресією цього ферменту. Крім того, спільним шляхом опосередкування агрегаційного ефекту є взаємодія інтегринів тромбоцитів і пухлинних клітин [62].

Наведені в цьому розділі дані свідчать про можливість використання Ж як діагностичних і прогностичних маркерів.

Перспективи терапевтичного використання Ж та їх інгібіторів. Експресія та активація ММП — багатостадійний процес, який передбачає транскрипцію ММП генів, секрецію й активацію зимогенів в ЕЦМ. На кожній стадії може проводитися фармакологічне втручання.

Одним із перспективних напрямків лікування онкологічних та онкогематологічних хворих вважають пригнічення експресії та активності Ж, що стало підставою для розробки антагоністів цих ензимів — синтетичних інгібіторів ММП (СІММП). Починаючи з кінця 70-х років ХХ ст., було синтезовано приблизно 56 СІММП, щонайменше 24 з них — із метою застосування в онкології та онкогематології. Всі СІММП поділено на наступні фармакологічні категорії: пептидоміметици колагену та непептидоміметици, похідні тетрацикліну, біфосфонати [63].

До 1-ї групи належать псевдопептидні похідні, здатні імітувати структуру колагену в ділянках зв'язування з ММП, виступаючи як хелатуючий агент. До них зараховують карбоксилати, амінокарбоксилати, сульфгідрили, похідні фосфорної кислоти та гідроксамати, причому більшість ІММП, які використовують у клінічній практиці, є саме гідроксаматними похідними (батимастат, маримастат, приномастат, таномастат). Однак використання цих препаратів в онкологічній практиці нині обмежено, бо вже на початку терапії у хворих з'являються болі в м'язах і активуються запальні процеси (відсутні в доклінічних моделях). Ці ускладнення мають зворотній характер, проте зумовлюють використання мінімальних ефективних доз гідроксаматів [64]. Тобто головним недоліком застосування псевдопептидних ІММП є відсутність специфічності дії. Із метою уникнення зазначених проблем розробляють інгібітори наступного покоління, що відзначаються високою специфічністю до окремих ММП. Так, група непептидних інгібіторів (AG3340, BAY 12-9566, iBMS-275291), синтезована на основі тривимірної рентгеноструктурної конфомації активного центру желатинази А, специфічно інгібує цей фермент і була використана при кістково-суглобових захворюваннях. Нині проводять клінічне оцінювання цих СІММП у хворих із різними видами пухлинної патології [65].

До складу 2-ї групи ІММП входять класичний антибіотик тетрациклін і такі його похідні, як доксициклін, міноциклін та хімічно модифіковані аналоги тетрацикліну. У культурі клітин раку молочної залози MDA-MB-435 доксициклін інгібує секрецію та активність желатиназ А і В, сприяє зниженню інвазивності пухлини [66].

Протягом останніх 3-х десятиліть було розроблено нову групу лікарських засобів — біфосфонати. Це препарати паліативної дії на кісткові метастази у хворих із солідними пухлинами та ММ. Механізм їхньої дії остаточно не з'ясовано, однак, очевидно, він передбачає пряме гальмування функції остеокластів [67].

Kruger A. та співробітники запропонували селективний інгібітор желатинази А SB-3CT, під час застосування якого в дослідженнях на моделі Т-клітинної лімфоми в мишей підвищувалося виживання тварин на тлі зменшення загальної кількості метастазів [68]. 2-й селективний інгібітор желатиназ та ММП-14, що за хімічною природою є синтетичним сульфоніловим дериватом амінокислот (ММІ-166), досліджували при раку легень в мишей. Передусім оцінювали ефективність впливу ММІ-166 на розростання пухлини, кількість метастазів у лімфатичних вузлах середостіння та тривалість життя. Виявлено, що цей інгібітор дозозалежно пригнічує експресію ММП-2 та ММП-9 *in vitro*, а *in vivo* значно знижує метастазування і подовжує термін виживання тварин [69].

Ще одним кроком у вивченні ІММП стало дослідження специфічних інгібіторів MAP-кіназ (PD

98059, SB 203560), у разі застосування яких помітно знижується експресія ММП та інвазивний потенціал ліній ракових клітин. Позитивні результати отримано в доклінічних випробуваннях специфічних антисенсових олігонуклеотидів, які гальмують експресію окремих ММП, інвазивність, метастазування [63].

Не можна залишити без уваги ММП-інгібуючу активність рослинних препаратів. Останнім часом вивчають ефективність алілізотіоціонату і його N-ацетилицистеїнових кон'югатів, які естрагують з овочів сімейства хрестоцвітних. Встановлено дозозалежний інгібіторний ефект цих метаболітів на експресію ММП-2 та ММП-9, рівень їх мРНК, адгезію, інвазію, міграцію і проліферативну активність клітин лінії SK-Hep-1 (гепатома людини). Так, обробка клітин алілізотіоціоном (5 та 10 μM) призводила до зниження клітинної проліферації на 20 і 53% відповідно. Цікавим є той факт, що досліджувані препарати не впливали на активність ТІМП-1 і ТІМП-2 [70]. Продемонстровані результати дають змогу розглядати ці рослинні метаболіти як перспективні лікувальні засоби при онкологічних і онкогематологічних захворюваннях.

Слід зазначити, що чайний катехін епігалокатехін-3-галат (ЕГКГ) теж здатен знижувати міграційну та інвазивну активність пухлинних клітин, послаблювати їх метастатичний потенціал. ЕГКГ у мікромольній концентрації пригнічує активність Ж, причому желатинази А більшою мірою, ніж желатинази В. Також було з'ясовано, що активність ЕГКГ на 2 порядки вища за активність ТІМП і не виявляє побічної дії [71].

Основним недоліком сучасних системних методів лікування онкологічних хворих є токсичність застосовуваних фармакологічних препаратів. Подолати цю проблему можна завдяки використанню нетоксичних «проліків», які буде активувати сама пухлина. На моделі ММ в мишей показано, що стромальні клітини КМ здатні до посиленої експресії ММП-9 і подальшої активації різних цитотоксичних агентів. E. Van Valckenborgh та ін. з'ясовано, що ММП-9 може розщеплювати «пропрепарат» Echovirus Type 1 (EV1), в результаті чого відбувається вивільнення активної форми терапевтичного агента, який пригнічує активність ДНК топоізомераз I та II *in vivo*. EV1 зв'язується на поверхні клітини зі специфічним рецептором інтегрином $\alpha 2\beta 1$ і в такий спосіб інфікує клітину-мішень [61].

Для лікування пацієнтів із ММ, ГЛЛ та МДС протягом останніх 10 років використовують синтетичну похідну глютамінової кислоти — талідомід. Виявлено вплив талідоміду на продукцію Ж лінією В-клітин та клітинами первинної мієломи у відповідь на стимуляцію фібронектином. Також з'ясовано, що талідомід здатен руйнувати інтегрин-опосередкований сигнальний шлях індукції та експресії желатиназ А і В за участю Src-тирозинкінази і MAP-кінази, унаслідок чого знижується рухливість клітин та інвазивність [72].

ВИСНОВКИ

Отже, клінічні дослідження останніх років значною мірою зосередилися на вивченні прогностичного значення ММП і ТІМП та випробуванні ІММП як потенційних протипухлинних агентів при солідних пухлинах. Актуальним і своєчасним є дослідження желатиназ як мішеней на різних стадіях пухлинної інвазії та метастазування при несолідних пухлинах. Результати клінічних досліджень показують, що желатинази є не тільки гарними мішенями в протипухлинній терапії, а й можуть бути корисними у визначенні підгруп пацієнтів зі збільшеним ризиком розвитку рецидивів і метастазів, прогнозуванні існування прихованих метастазів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Vartio T, Hovi T, Vaheri A. Human macrophages synthesize and secrete a major 95,000-dalton gelatin binding protein distinct from fibronectin. *J Biol Chem* 1982; **257**: 8862–6.
2. Salo T, Liotta LA, Tryggvason K. Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J Biol Chem* 1983; **258**: 3058–63.
3. Yu XF, Han ZC. Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Histol Histopathol* 2006; **21** (5): 519–31.
4. Karahan N, Guney M, Baspinar S, et al. Expression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in endometrial carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2007; **28** (3): 184–8.
5. Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 2005; **87** (3–4): 287–97.
6. Ганусевич ІІІ. Роль матриксних металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. II. Участие ММП в ангиогенезе, инвазии и метастазировании опухолей. *Онкология* 2010; **12** (2): 108–17.
7. Piccard H, Van den Steen PE, Opdenakker GH. Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins. *J Leukocyt Biol* 2007; **81**: 870–2.
8. Dufour A, Sampson NS, Zucker S, et al. Role of the hemopexin domain of matrix metalloproteinases in cell migration. *J Cell Physiol* 2008; **217**: 643–51.
9. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 2008; **29**: 290–308.
10. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res* 2003; **92**: 827–39.
11. Kyllonen H. Gelatinases, their tissue inhibitors and p53 in lymphomas. *Oulu*, 2009: 134 p.
12. Opdenakker GH, Van den Steen PE, Van Damme J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol* 2001; **22** (10): 571–9.
13. Olson M, Bernardo MM, Pietila M, et al. Characterization of the Monomeric and Dimeric Forms of Latent and Active Matrix Metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 2000; **275**: 2661–8.
14. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, et al. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37258–65.
15. Hashimoto G, Inoki I, Fujii YU, et al. Matrix Metalloproteinases Cleave Connective Tissue Growth Factor and Reactivate Angiogenic Activity of Vascular Endothelial Growth Factor 165. *J Biol Chem* 2002; **277**: 36288–95.
16. Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current Opin Cell Biol* 2004; **16**: 558–64.

17. Collette T, Bellehumeur C, Maheux R, *et al.* Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9. *Hum Reprod* 2004; **19**: 1257–64.
18. Lai WCH, Zhou M, Shankavaram U, *et al.* Differential Regulation of Lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* 2003; **170**: 6244–9.
19. Соловьева НИ. Матриксные металлопротеиназы: регуляция активности и роль в процессе онкогенеза. Структура и функции протеолитических ферментов: материалы конференции. Москва, 2000. <http://medi.ru/pbmc/8800506.htm>.
20. Li CH, Belton RJ, Nowak RA, *et al.* Basigin-Mediated Gene Expression Changes in Mouse Uterine Stromal Cells during Implantation. *Endocrinol* 2007; **150** (2): 966–76.
21. Zheng HC, Takahashi H, Murai Y, *et al.* Upregulated EMMPRIN/CD147 might contribute to growth and angiogenesis of gastric carcinoma: a good marker for local invasion and prognosis. *BJC* 2006; **95** (10): 1371–8.
22. Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* 2001; **61**: 2276–81.
23. Han SHW, Ritzenthaler J, Sitaraman SHV. Fibronectin Increases Matrix Metalloproteinase 9 Expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem* 2006; **281** (40): 29614–24.
24. Sariahmetoglu M, Crawford BD, Leon H, *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity by phosphorylation. *FASEB J* 2007; **21**: 2486–95.
25. Gu Z, Kaul M, Yan B, *et al.* S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 2002; **297**: 1186–90.
26. Fassina G, Ferrari N, Brigati C, *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteinases: Regulation and biological activities. *Clin Experim Metastas* 2000; **18**: 111–20.
27. Kuittinen O. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) in hematological malignancies. *Oulu*, 2003: 80 p.
28. Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, *et al.* Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critic Rev Biochem Mol Biol* 2002; **37** (6): 375–536.
29. Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Nabholz JM, *et al.* Growth factors and cytokines upregulate gelatinase expression in bone marrow CD34+ cells and their transmigration through reconstituted basement membrane. *Blood* 1999; **93**: 3379–90.
30. Oviedo-Orta E, Bermudez-Fajardo A, Karanam S, *et al.* Comparison of MMP-2 and MMP-9 secretion from T helper 0, 1 and 2 lymphocytes alone and in coculture with macrophages. *Immunology* 2008; **124** (1): 42–50.
31. Dayer JM. How T-lymphocytes are activated and become activators by cell-cell interaction. *Eur Respir J* 2003; **22** (44): 10–15.
32. Пелешенко АБ, Шевцова АИ, Бразалук АЗ и др. Фрагменты фибронектина в патогенезе, диагностике и лечении заболеваний. *Лабор диагностика* 2004; **2**: 3–9.
33. Abraham M, Shapiro S, Karni A, *et al.* Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells. *J Neuroimmunol* 2005; **163** (1–2): 157–64.
34. Albertsson MK, Goldfarb G, Goldfarb RH, *et al.* IL-2-Activated NK Cells. *J Immunol* 1998; **160**: 4248–53.
35. Trocme C, Gaudin P, Berthier S, *et al.* Human B Lymphocytes Synthesize the 92-kDa Gelatinase, Matrix Metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 1998; **273** (32): 20677–84.
36. Opdenakker GH, Van den Steen PE, Dubois B, *et al.* Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukocyt Biol* 2001; **69**: 851–9.
37. Spallarossa P, Altieri P, Garibaldi S, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase. *Cardiovasc Res* 2006; **69**: 736–45.
38. Simpson JL, Scott RJ, Boyle MJ, *et al.* Differential Proteolytic Enzyme Activity in Eosinophilic and Neutrophilic Asthma. *Am J Respir Critic Care Med* 2005; **172**: 559–65.
39. Sauter A, Stern-Straeter J, Sodna K, *et al.* Regulation of Matrix Metalloproteinases (MMP)-2/-9 Expression in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis – Cell Culture by Interleukin-5 and -13? *In Vivo* 2008; **22**: 415–22.
40. Suzukawa M, Komiyama A, Iikura M, *et al.* Trans-basement membrane migration of human basophils: role of matrix metalloproteinase-9. *Int Immunol* 2006; **18** (11): 1575–83.
41. Xie B, Laouar A, Huberman E. Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa type IV collagenase/gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation. The signaling role of protein kinase C-beta. *J Biol Chem* 1998; **273**: 11576–82.
42. Lane WJ, Dias S, Hattori K, *et al.* Stromal-derived factor 1-induced megakaryocyte migration and platelet production is dependent on matrix metalloproteinases. *Blood* 2000; **96**: 4152–9.
43. Marquez-Curtis LA, Dobrowsky A, Montano J, *et al.* Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase secretion by hematopoietic and stromal precursors and their production in normal and leukemic long-term marrow cultures. *Br J Haematol* 2001; **115** (3): 595–604.
44. Sawicki G, Sanders ES, Salas E, *et al.* Localization and translocation of MMP-2 during aggregation of human platelets. *Thromb Haemost* 1998; **80**: 836–9.
45. Galt SW, Lindemann S, Allen L, *et al.* Outside-in signals delivered by matrix metalloproteinase-1 regulate platelet function. *Circ Res* 2002; **90**: 1093–9.
46. Jurasz P, Chung Ada WY, Radomski A, *et al.* Nonremodeling Properties of Matrix Metalloproteinases. The Platelet Connection. *Circ Res* 2002; **90**: 1041–3.
47. Kazes I, Elalamy I, Sraer JD, *et al.* Platelet release of trimolecular complex components MT1-MMP/TIMP2/MMP2: involvement in MMP2 activation and platelet aggregation. *Blood* 2000; **96**: 3064–9.
48. Новик АА, Камилова ТА, Цыган ВН. Введение в молекулярную биологию канцерогенеза. Москва: Гэотар-Мед, 2004: 224 с.
49. Lin LI, Lin DT, Chang CJ, *et al.* Marrow matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMP in acute leukemia: potential role of MMP-9 as a surrogate marker to monitor leukemic status in patients with acute myelogenous leukemia. *Br J Haematol* 2002; **117** (4): 835–41.
50. Zhang B, Wu KF, Cao ZY, *et al.* IL-18 increases invasiveness of HL-60 myeloid leukemia cells: up-regulation of matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) expression. *Leuk Res* 2004; **28** (1): 91–5.
51. Гайдамака НВ, Паровичникова ЕН, Завалишина ЛЭ и др. Экспрессия матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в костном мозге у больных острыми лейкозами. *Гематол трансфузиол* 2009; **54** (2): 3–10.
52. Rao Q, Zheng GG, Li GE, *et al.* Membrane-Bound Macrophage Colony-Stimulating Factor Mediated Auto-Juxtacrine Downregulates Matrix Metalloproteinase-9 Release on J6-1 Leukemic Cell. *Exp Biol Med* 2004; **229**: 946–53.
53. Ries CH, Pitsch TH, Mentele R, *et al.* Identification of a novel 82 kDa proMMP-9 species associated with the surface of leukemic cells: autocatalytic activation and resistance to inhibition by TIMP-1. *Biochem J* 2007; **405**: 547–58.
54. Ries CH, Loher F, Zang CH, *et al.* Matrix Metalloproteinase Production by Bone Marrow Mononuclear Cells from Normal Individuals and Patients with Acute and Chronic Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndromes. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 1115–24.
55. Salah Aref E, Osman S, Mansy N, *et al.* Prognostic relevance of circulating matrix metalloproteinase-2 in acute myeloid leukaemia patients. *Hematol Oncol* 2007; **25** (3): 121–6.

56. Travaglini E, Benatti CH, Malcovati L, *et al.* Biological and clinical relevance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in acute myeloid leukaemias and myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 2007; **80** (3): 216–26.

57. Гордієнко ЮА, Кулініч АО, Ніколаєнко-Камішова ТП та ін. Активність желатиназ і деградація фібронектину при метаболічних порушеннях та проліферативних захворюваннях крові. *Мед хімія* 2009; **3**: 74–6.

58. Kuitinen O, Soini Y, Turpeenniemi-Hujanen T. Diverse role of MMP-2 and MMP-9 in the clinicopathological behavior of Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 2002; **69** (4): 205–12.

59. Kuitinen O, Araj-Sarkkinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9), TIMP-1 expression and the extent of neovascularization in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Eur J Haematol* 2003; **71** (2): 91–9.

60. Barille S, Akhouni C, Collette M, *et al.* Metalloproteinases in multiple myeloma: production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), activation of proMMP-2, and induction of MMP-1 by myeloma cells. *Blood* 1997; **90**: 1649–55.

61. Van Valckenborgh E, Croucher PI, De Raeve H, *et al.* Multifunctional Role of Matrix Metalloproteinases in Multiple Myeloma. A Study in the 5T2MM Mouse Model. *Am J Pathol* 2004; **165** (3): 869–78.

62. Jurasz P, Sawicki G, Duszyk M, *et al.* Matrix Metalloproteinase 2 in Tumor Cell-induced Platelet Aggregation: Regulation by Nitric Oxide. *Cancer Res* 2001; **61**: 376–82.

63. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001; **93** (3): 178–93.

64. Kruger A, Soeltl R, Sopov I, *et al.* Hydroxamate-Type Matrix Metalloproteinase Inhibitor Batimastat Promotes Liver Metastasis. *Cancer Res* 2001; **61**: 1272–5.

65. Roopali R, Yang J, Moses MA. Matrix Metalloproteinases as Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *JCO* 2009; **27** (31): 5287–97.

66. Bowcock AM. Breast cancer: molecular genetics, pathogenesis, and therapeutics. New Jersey, 1999: 582 p.

67. Winding B, NicAmhlaibh R, Misander H, *et al.* Synthetic Matrix Metalloproteinase Inhibitors Inhibit Growth of Established Breast Cancer Osteolytic Lesions and Prolong Survival in Mice. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 1932–9.

68. Kruger A, Arlt MJE, Gerg M, *et al.* Antimetastatic Activity of a Novel Mechanism-Based Gelatinase Inhibitor. *Cancer Res* 2005; **65**: 3523–6.

69. Fujino H, Kondo K, Ishikura H, *et al.* Matrix metalloproteinase inhibitor MMI-166 inhibits lymphogenous metastasis in an orthotopically implanted model of lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2005; **4**: 1409–16.

70. Hwang ES, Lee HJ. Allyl Isothiocyanate and Its N-Acetylcysteine Conjugate Suppress Metastasis via Inhibition of Invasion, Migration, and Matrix Metalloproteinase-2/-9 Activities in SK-Hep1 Human Hepatoma Cells. *Exp Biol Med* 2006; **231**: 421–30.

71. Giannelli G, Antonaci S. Gelatinases and their inhibitors in tumor metastasis: from biological research to medical applications. *Histol Histopathol* 2002; **17**: 339–45.

72. Segarra M, Lozano E, Corbera-Bellalta C, *et al.* Thalidomide decreases gelatinase production by malignant B lymphoid cell lines through disruption of multiple integrin-mediated signaling pathways. *Haematologica* 2010; **95** (3): 456–63.

GELATINASE A AND B IN ONCOHEMATOLOGICAL DISEASES

Y.A. Gordiyenko, A.I. Shevtsova,
T.P. Nikolayenko-Kamishova

Summary. *In the review the structure and function, the mechanisms of regulation of synthesis and activity of gelatinase A and B in blood cells at different stages of hemopoiesis are discussed. The data about the role of gelatinase in pathogenesis of cancer diseases of blood and lymphoid tissues are summarized. The possibility of their use as diagnostic and prognostic markers and the perspectives of use of natural and synthetic inhibitors of gelatinase as therapeutic agents are considered.*

Key Words: gelatinase A and B, oncohematological diseases, inhibitors of metalloproteinases.

Адреса для листування:

Гордієнко Ю.А.

49044, Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 9

Дніпропетровська державна медична академія

E-mail: gordienko.ju@gmail.com