

На правах рукописи

**Рыжакова Ольга Сергеевна**

**ИНТЕРСТИЦИАЛЬНАЯ КОЛЛАГЕНАЗА (ММП-1) И ЕЁ  
ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ПРИ ТРАНСФОРМАЦИИ  
ФИБРОБЛАСТОВ ГЕНОМ E7 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ  
ЧЕЛОВЕКА 16 ТИПА (HPV16)**

03.00.04 – биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва 2008

Работа выполнена в Государственном учреждении Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
Соловьева Нина Ивановна

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
Яровая Галина Алексеевна

доктор биологических наук, профессор  
Соколов Николай Николаевич

**Ведущая организация:** Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН

Защита состоится «11» декабря 2008 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д 001.010.01 при ГУ НИИ БМХ РАМН по адресу: 119121, г. Москва, Погодинская ул., д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ БМХ РАМН.

Автореферат разослан «10»ноября 2008 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

### **Актуальность проблемы.**

Матриксные металлопротеиназы или ММП относятся к семейству цинковых кальций-зависимых металлопротеиназ, функция которых связана с обменом белков соединительно-тканного матрикса (СТМ). Эти ферменты в совокупности способны гидролизовать все компоненты СТМ. ММП играют решающую роль в таких биологических процессах, как эмбриогенез, ремоделирование и репарация тканей, а также при развитии ряда патологических процессов, таких как ревматоидные артриты, остеоартриты, аневризмы аорты, периодонтиты, аутоимунные поражения кожи и т.д.

Особое место отводится ММП в развитии процессов инвазии и метастазирования опухолей. Тканевые коллагеназы, наряду с желатиназами (ММП-2, ММП-9), относятся к ММП и играют решающую роль в развитии этих процессов, поскольку они специфически гидролизуют белки группы коллагена – одного из основных компонентов СТМ. Интерстициальная коллагеназа (ММП-1) специфически гидролизует фибриллярные коллагены I, II, III, V и IX типов, которые составляют 25% от общего белка организма человека. Нативные фибриллярные коллагены устойчивы к действию протеолитических ферментов. ММП-1 специфически запускает гидролиз фибриллярных коллагенов, при этом она гидролизует всего одну связь в молекуле этого белка, находящуюся на расстоянии  $\frac{1}{4}$  длины молекулы от С-конца. Образующиеся фрагменты способны денатурировать в физиологических условиях и далее подвергаться действию широкого спектра протеиназ, тем самым ММП-1 обеспечивает развитие деструктивного процесса. Желатиназы гидролизуют коллаген IV типа – основу базальных мембран. Этим двум группам ферментов принадлежит ключевая роль в разрушении соединительно-тканного барьера при развитии инвазивного онкологического процесса.

В настоящее время интенсивно исследуются вопросы, связанные с экспрессией ММП при онкогенной трансформации. На клеточных системах показано влияние различных онкогенов на экспрессию ММП, однако вопросы связанные с эндогенной регуляцией активности этих ферментов исследованы недостаточно.

Нами было исследовано влияние гена E7 вируса папиллом человека 16 типа (HPV16) на экспрессию ММП и их эндогенных регуляторов.

Вирусы папиллом (HPV) высокого риска – HPV16 и HPV18 являются этиологическими факторами возникновения рака шейки матки. За открытие ключевой роли вируса HPV в возникновении рака шейки матки доктору Харольду цур Хаузену в 2008 году была присуждена Нобелевская премия. В настоящее время созданы вакцины против онкогенных

вирусов папиллом человека, которые в ряде стран уже используются для предотвращения рака шейки матки. По статистическим данным в мире регистрируется до 500 тысяч новых случаев рака шейки матки, а женщины развивающихся стран подвержены этому заболеванию в 10 раз больше, чем остальные. Рак шейки матки занимает второе место, после рака молочной железы, по частоте заболеваемости и смертности от рака у женщин. Установлено, что основными трансформирующими генами вирусов папиллом человека являются гены E6 и E7. У 90% больных раком шейки матки обнаруживаются транскрипты генов E6 и E7 в биопсийном материале. Однако функциональный потенциал генов E6 и E7 остается недостаточно изученным. Так недостаточно исследовано изменение протеолитического потенциала клеток и тканей, в частности интерстициальной коллагеназы, при трансформации их этим вирусом, что может служить важным маркером инвазивного процесса.

### **Цель и задачи исследования**

Целью настоящего исследования является выяснение особенностей экспрессии интерстициальной коллагеназы (ММП-1), эндогенных регуляторов ее активности, как факторов инвазии при онкогенной трансформации фибробластов геном E7 HPV16

В соответствии с указанной целью поставлены **следующие задачи:**

- 1) Провести сравнительные исследования экспрессии ММП-1, и эндогенных регуляторов её активности: тканевого ингибитора ММП - ТИМП-1 и активатора плазминогена уракиназного типа - уАП на фибробластах крысы, иммортализованных LT геном вируса полиомы и трансформированных геном E7 HPV16. Исследования провести на уровне мРНК и белка.
- 2) На коммерческих клеточных линиях, полученных из опухолей шейки матки женщин: SiHa, Caski, Hela, C4-1, а также линии клеток C33A, не содержащей копий HPV, провести сравнительные исследования экспрессии ММП-1, ММП-14 и ММП-2 ММП-9 (как двух групп ферментов, отвечающих за развитие инвазивного процесса), а также регуляторов их активности ТИМП-1, ТИМП-2 и у-АП на уровне м-РНК и энзимологическом уровне.
- 3) Исследовать экспрессию ММП-1, 2, 9 и МТ1-ММП, а также ТИМП-1, ТИМП-2 и у-АП на операционных образцах плоскоклеточных карцином шейки матки, ассоциированных с геном E7 HPV16 с использованием RT-PCR и методами иммуногистохимии и энзимологии.

### **Научная новизна и практическая значимость.**

Разработан метод по определению коллагенолитической активности.

Получена четкая картина о ключевой роли ММП-1, ММП-2, ММП-9 и их ингибиторов в развитии инвазии на линиях клеток рака шейки матки, трансформированных геном E7 HPV16 и клинических образцах плоскоклеточных карцином шейки матки, ассоциированных

с HPV16. Эти данные могут иметь прогностическое значение и определять мишени для разработки фармакологических средств.

Данные об увеличении экспрессии ММП в окружающей опухоль строме могут быть использованы для оценки деструктивного (инвазивного) потенциала прилегающей к опухоли ткани и, по-видимому, для определения размера операционного поля при хирургическом вмешательстве.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Сравнительное исследование экспрессии ММП-1, МТ1-ММП (как ММП-1 связанной с мембраной) и эндогенных регуляторов их активности на уровне м-РНК и белка в фибробластах, иммортализованных LT-геном вируса полиомы и трансформированных геном E7 HPV-16, которое позволяет оценить баланс системы фермент/активатор/ингибитор как в иммортализованных, так и трансформированных клетках.
2. Сравнительное исследование на уровне м-РНК и белка ММП-1, МТ1-ММП и ММП-2, 9 (как двух групп ферментов, отвечающих за инвазивные свойства клеток) и эндогенных ингибиторов их активности ТИМП-1 и ТИМП-2 на коммерческих клеточных линиях, полученных из опухолей шейки матки и ассоциированных с HPV16 и HPV18, а именно SiHa (HPV16), Caski (HPV16), Hela (HPV18) и C4-1 (HPV18), что позволяет оценить их деструктивный потенциал, спектр и уровень активностей ММП в зависимости от типа вируса и количества его копий.
3. Исследование ММП-1, МТ1-ММП и ММП-2, 9 и их ингибиторов на образцах плоскоклеточных карцином шейки матки, ассоциированных с геном E7 HPV16.

#### **Публикация и апробация работы.**

Результаты работы были представлены на VI симпозиуме “Химия протеолитических ферментов” (Москва, 2007), Международной конференции «Протеолиз, механизмы его регуляции и роль в физиологии и патологии клетки» (Минск, 2007), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008). Материалы диссертации отражены в 6 публикациях: 2 статьи и 4 публикации в сборниках докладов научных конференций.

#### **Структура и объём работы.**

Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов, обсуждения результатов, выводов и библиографии. Материалы диссертации изложены на 98 страницах машинописного текста и включают 16 рисунков, 5 таблиц и список литературы из 126 источников.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Клеточные модели.

а) Модель фибробластов крысы линии Фишер, разработанная в лаборатории молекулярной биологии вирусов Института канцерогенеза ОНЦ РАМН, включающая фибробласты иммортализованные LT геном вируса полиомы и трансформированные E7 геном HPV16.

б) Коммерческие клеточные линии карцином шейки матки - C33-A, SiHa, Caski, HeLa, C4-1 (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Клеточные линии отличались по типу HPV и количеству копий вируса: C33A(HPV отсутствует), SiHa(1-2 копии HPV16), Caski (500-600 копий HPV16), Hela (10-50 копий HPV18) и C4-1(1 копия HPV18 ).

### Клинический материал

Образцы опухолевой ткани плоскоклеточных карцином шейки матки, взятые во время операции, и морфологически нормальной ткани, прилегающей к опухоли, были предоставлены отделением гинекологии и радиохирургии ОНЦ РАМН г.Москвы и отделом патологической анатомии Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена.

Клинический диагноз и степень дифференцировки были подтверждены отделениями патоморфологии ОНЦ РАМН и Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена.

Исследование экспрессии генов проводили методом полуколичественной RT-PCR с использованием специфических праймеров. Условия реакции и последовательность праймеров описаны в таблице 1

**Таблица 1.** Праймеры, использованные в RT-PCR

<b><u>ММП-1 (ч)</u></b>	
<i>Прямой праймер</i>	5' gga caa aca cat ctg acc tac agg a 3'
<i>Обратный праймер</i>	5' ttg tcc cga tga tct ccc ctg aca 3'
<i>Размер продукта</i>	185п.н.
<i>Условия амплификации</i>	62°C, 34 циклов, 30 сек
<b><u>γ-АП (ч)</u></b>	
<i>Прямой праймер</i>	5' agg cga ccc tgg tgc tat 3'
<i>Обратный праймер</i>	5'acc cag caa gga ctg atg ag 3'
<i>Размер продукта</i>	272 н.п.
<i>Условия амплификации</i>	54°C, 33 циклов, 30 сек

<p><b><u>MT1-ММП (ч, κ)</u></b></p> <p><i>Прямой праймер</i></p> <p><i>Обратный праймер</i></p> <p><i>Размер продукта</i></p> <p><i>Условия амплификации</i></p>	<p>5' cct ttt acc agt gga tgg ac 3'</p> <p>5' cca gct cct taa tgt gct tg 3'</p> <p>444 н.п.</p> <p>56°C, 29 циклов, 40 сек.</p>
<p><b><u>ТИМР-1 (ч)</u></b></p> <p><i>Прямой праймер</i></p> <p><i>Обратный праймер</i></p> <p><i>Размер продукта</i></p> <p><i>Условия амплификации</i></p>	<p>5' gac cac ctt ata cca gct tt 3'</p> <p>5' gca ggc agg caa ggt gac 3'</p> <p>410 н.п.</p> <p>51°C, 28 циклов, 30 сек</p>
<p><b><u>ММР-2(ч)</u></b></p> <p><i>Прямой праймер</i></p> <p><i>Обратный праймер</i></p> <p><i>Размер продукта</i></p> <p><i>Условия амплификации</i></p>	<p>5' gag ttg gca gtg caa tac ct 3'</p> <p>5' gcc atc ctt ctc aaa gtt gt 3'</p> <p>666 н.п.</p> <p>60°C, 34циклов, 30 сек</p>
<p><b><u>ММР-9(ч)</u></b></p> <p><i>Прямой праймер</i></p> <p><i>Обратный праймер</i></p> <p><i>Размер продукта</i></p> <p><i>Условия амплификации</i></p>	<p>5' tgg gca agg gcg tcg tgg ttc3'</p> <p>5' tgg tgc agg cgg agt agg att3'</p> <p>276 н.п.</p> <p>55°C, 35циклов, 30 сек.</p>
<p><b><u>ТИМП-2(ч)</u></b></p> <p><i>Прямой праймер</i></p> <p><i>Обратный праймер</i></p> <p><i>Размер продукта</i></p> <p><i>Условия амплификации</i></p>	<p>5' ggt ctc gct gga cgt tgg ag 3'</p> <p>5' gga gcc gtc act tct ctt g 3'</p> <p>304 н.п.</p> <p>58°C, 27циклов, 30 сек</p>
<p><b><u>γ-АП (κ)</u></b></p> <p><i>Прямой праймер</i></p> <p><i>Обратный праймер</i></p> <p><i>Размер продукта</i></p> <p><i>Условия амплификации</i></p>	<p>5' cat tca tga ggt ctg ctg tt 3'</p> <p>5' gga ata ata cat tca agt gga 3'</p> <p>272 н.п.</p> <p>58°C, 36 циклов, 30 сек</p>

<b><u>TIMP-1 (к)</u></b>	
<i>Прямой праймер</i>	5' gac cac ctt ata cca gct tt 3'
<i>Обратный праймер</i>	5' caa agt gat cgc tct ggt ag 3'
<i>Размер продукта</i>	401 н.п.
<i>Условия амплификации</i>	56°C, 26циклов, 30 сек
<b><u>GAPDH (ч,к)</u></b>	
<i>Прямой праймер</i>	5' acc aca gtc cat gcc atc ac 3'
<i>Обратный праймер</i>	5' tcc acc acc ctg ttg ctg ta 3'
<i>Размер продукта</i>	450 н.п.
<i>Условия амплификации</i>	60°C, 28циклов, 30 сек
<b><u>HPRT (ч)</u></b>	
<i>Прямой праймер</i>	5' ctg gat tac atc aaa gca ctg 3'
<i>Обратный праймер</i>	5' gga tta tac tgc ctg acc aag 3'
<i>Размер продукта</i>	230 н.п.
<i>Условия амплификации</i>	60°C, 30циклов, 30 сек

к - праймеры к генам крысы, ч - праймеры к генам человека

Культивирование клеток. Для определения коллагенолитической активности клетки культивировали в течение 48 часов в бессывороточной среде DMEM, содержащей 0,5% гидролизат лактальбумина (1:1) с добавлением витаминного раствора (10мкл/мл) и гентамицина (100ед./мл). Клетки собирали с помощью 0,0002% раствора химопсина, затем промывали 4-5 раз раствором Хенкса и осаждали центрифугированием при 1000 об./мин. Кондиционированную среду собирали, замораживали и хранили при -20°C [16].

Для разрушения клеточной мембраны к клеткам добавляли раствор 0,45% NaCl, содержащий 1мМ CaCl<sub>2</sub> и 0,1% тритон X-100 (из расчета 1x10<sup>6</sup> клеток в 0,3мл раствора), затем клетки подвергали 6-кратному замораживанию-оттаиванию и разрушали в тefлоновом гомогенизаторе. Осадок отделяли центрифугированием, в супернатанте определяли активность. Все процедуры проводили при 4°C.

Определение коллагенолитической активности проводили по методу, разработанному нами. Для определения активности ММП-1 использовали меченый флуоресцеинизотиоцианатом коллаген I типа, полученный из кожи крыс. На гидролиз брали по 20кл (72мкг) меченого коллагена, инкубировали в течение 2 часов при температуре 35°C до образования реконструированных фибрилл (пленок). Реакционная смесь содержала 0,01М трис-HCl буфера рН 7,6 с добавлением 1мМ CaCl<sub>2</sub> и 0,2 М NaCl и исследуемую пробу: супернатант лизатов фибробластов, соответствующий 30–500 тысяч клеток, супернатант лизатов тканей



(от 100 до 1000 мкг белка ) или кондиционированной среды, (соответствующей 0,1 – 1,3 млн клеток). Общий объем пробы 1000мкл. Инкубацию проводили в течение 18-20 часов при 35°C, флуоресценцию измеряли при длинах волн 490 и 520 нм возбуждения и поглощения соответственно. Активность коллагеназ анализировали в присутствии активатора (трипсина) и ингибитора (ЭДТА) ММП.

Зимографию с сополимеризованным желатином проводили по методу, описанному в статье [Murphy G.,1995, Leber at al. 1997]. При электрофорезе на каждый трек наносили пробы супернатантов лизатов тканей из расчета 50мкг белка на лунку. Активность ММП-2 и ММП-9 рассчитывали по площади гидролиза желатина в треках .

#### Иммуногистохимическое исследование.

Материал фиксировали 10% нейтральным формалином 24часа. Затем обезвоживали и пропитывали парафином в автоматизированном режиме в аппарате STP120. Использовали моноклональные антитела к MMP-1,2,9 и TIMP-1,2 фирмы LabVision в готовом разведении. Иммуногистохимические реакции проводили в автоматизированном режиме в иммуногистостейнере Avtosteiner (Dako). В качестве детекционной системы использовали систему Envision (Dako) , в качестве хромогена – диаминобензидин. Затем срезы докрашивали гематоксилином. Микроскопирование проводили на анализаторе изображения Leika Q 550.

Условия проведения реакции (метод восстановления антигенной активности и использованные разведения антител) представлены в таблице 2.

**Таблица 2. Использованные антитела**

Наименование	Разведение	Условия демаскировки
ММП-1 моноклональные	1:5	121 °С, рН 6,0 цитратныйбуфер
ММП-2 моноклональные	1:40	121 °С, рН 6,0 цитратныйбуфер
ММП-9 моноклональные	1:20	Без обработки
ТИМП-1 моноклональные	1:20	121 °С, рН 8,0 ЭДТА буфер
ТИМП-2 моноклональные	1:30	121 °С, рН 8,0 ЭДТА буфер

#### Статистическая обработка результатов.

Статистический анализ проводили с использование программы Excel с пакетом анализа данных по методам, описанным в книге «Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel» (Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н., 2000). Применяли также корреляционный анализ по Пирсону. При анализе корреляции метастазирования и степени дифференцировки клеток с интенсивностью ИГХ реакции

считали её незначимой при значении модуля коэффициента корреляции от 0 до 0,3; значимой - от 0,3 до 0,75 и высокой - выше 0,75.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Для решения поставленной задачи работа проводилась на трёх объектах: 1. модель экспериментального канцерогенеза, включающая immortalized и трансформированные фибробласты крысы; 2. коммерческие линии клеток, ассоциированные с HPV16 и HPV18; 3. образцы плоскоклеточных карцином шейки матки, экспрессирующие ген E7 HPV16, взятые во время операции.

На первом этапе исследования проводили на модели экспериментального канцерогенеза.

**1. Сравнительное исследование экспрессии матриксной металлопротеиназы-1 - ММП-1 и мембраносвязанной металлопротеиназы-1 - MT1-ММП, а также тканевого ингибитора ММП – ТИМП-1 и активатора - уАП (активатора плазминогена уракиназного типа) на модели фибробластов крысы.**

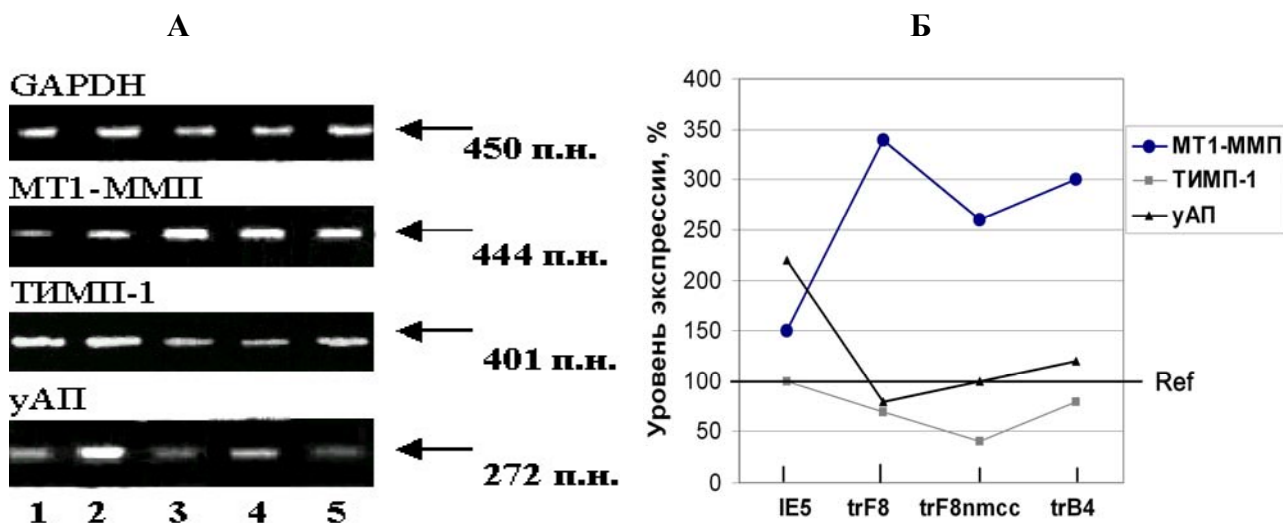
Исследования проводились на модели клеток – эмбриональных фибробластов крысы линии Фишер, включающей нормальные фибробласты (Ref), immortalized (клетки обладают способностью к неконтролируемому росту, но не вызывают развития опухоли – IE5) и трансформированные фибробласты (три клон трансформированных клеток - trB4, trF8 и trF8nmcc), отличающиеся по степени туморогенности. Условно можно распределить клоны по степени выраженности туморогенных свойств в следующем порядке: trF8nmcc>trF8>trB4. Работу проводили на уровне мРНК и белка.

**Экспрессия генов ММП-1, MT1-ММП, ТИМП-1 и уАП.**

Работу по экспрессии мРНК ММП и их эндогенных регуляторов проводили совместно с лабораторией молекулярной биологии вирусов Института канцерогенеза ОНЦ РАМН.

Были исследованы уровни экспрессии м-РНК MT1-ММП, эндогенного ингибитора ММП-1 и MT1-ММП – ТИМП-1 и активатора ММП-1 – уАП. Данные по экспрессии мРНК ММП-1 в фибробластах крысы отсутствуют, т.к. не удалось подобрать праймеры для этого фермента, поскольку ген ММП-1 крысы не расшифрован, а подбор праймеров на основе последовательности гена ММП-1 человека не дал результатов. Следует отметить, что уАП является активатором плазминогена, а плазмин рассматривается как основной физиологический активатор про-ММП-1 и других ММП. ТИМП-1 рассматривается как основной тканевый ингибитор ММП-1.

Данные по экспрессии мРНК MT1-ММП, TIMP-1 и уАП представлены на рис.1 А,Б, где приведены результаты типичных опытов по данным RT-PCR (рис.1,А) и денситометрии (рис.1,Б).



**Рис.1** Экспрессия м-РНК генов MT1-ММП, TIMP-1 и уАП по данным RT-PCR (А) и денситометрии (Б) Для реакции обратной транскрипции брали 1  $\mu$ г РНК каждого клона клеток: 1. Ref; 2. IE5; 3. trF8; 4.; trF8nmcc 5. trB4. Количество кДНК, вносимое в реакцию, соответствовало равному количеству продукта гена GAPDH (глицеральдегидфосфатдегидрогеназы) для каждого клона клеток.

Данные свидетельствуют о том, что как иммортализация, так и трансформация фибробластов сопровождается изменением уровня экспрессии генов исследованных ферментов и ингибитора. Из представленных на рис.1А данных следует, что экспрессия мРНК MT1-ММП существенно увеличена во всех трёх клонах трансформированных фибробластов (ТФ) и значительно менее увеличена в иммортализованных фибробластах (ИФ). Экспрессия TIMP-1 была снижена во всех линиях ТФ и находилась на уровне контроля в ИФ. Экспрессия уАП была увеличена только в ИФ, а ТФ находилась в пределах нормы.

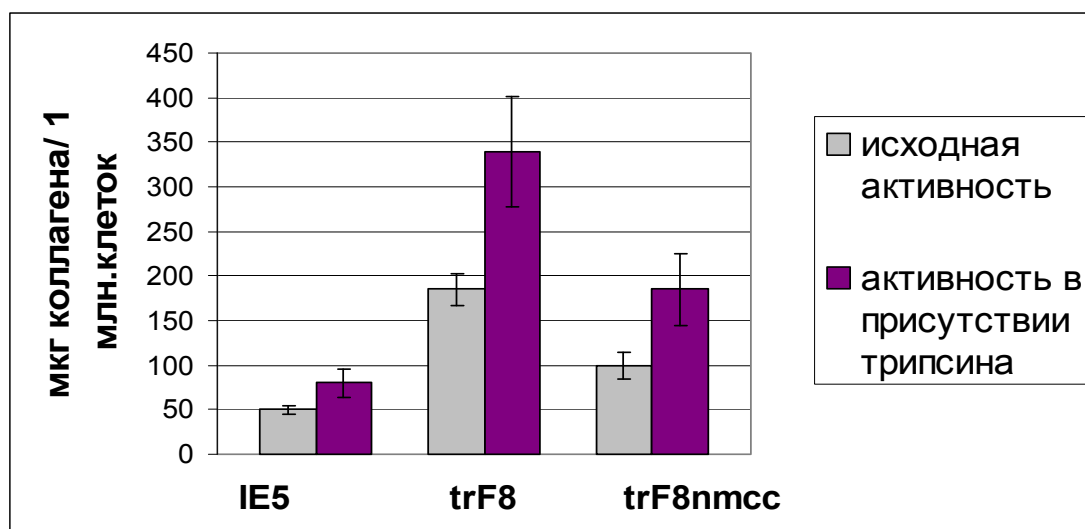
Условно соотношение величин экспрессии мРНК в исследованных клонах , Ref, IE5, trF8, trB4, trF8nmcc, по данным электрофореза и денситометрии, представлены на рис.1Б. За 100% принята экспрессия в первичных фибробластах (Ref). Из представленных данных следует, что при трансформации (клоны trF8, trB4, trF8nmcc) происходит увеличение экспрессии MT1-ММП в 2,5 - 3,5 раза (от 260 до 350 %, треки 3,4,5), уменьшение экспрессии ингибитора - до 30-60% от контроля (треки 3,4,5), в то время как экспрессия активатора остается в норме. При иммортализации (клон IE5) обнаружено увеличение экспрессии MT1-ММП в 1,5 раза (трек 2), в то время как экспрессия TIMP-1 (трек2) оставалась на уровне контроля, но была выше, чем в ТФ, а экспрессия активатора - уАП возрастала в 2 раза (200%). Следовательно, при трансформации происходит увеличение экспрессии фермента, уменьшение экспрессии

ингибитора, в то время как экспрессия активатора остается в норме. При имортализации обнаружено существенное увеличение экспрессии уАП и незначительное увеличение МТ1-ММП, в то время как экспрессия ТИМП-1 остается на уровне контроля.

Полученные данные свидетельствуют о том, что как при трансформации, так и при иммортализации происходит нарушение соотношения фермент/активатор/ингибитор, причем в ТФ они выражены значительно ярче и в конечном итоге направлены на увеличение активности ММП.

**Исследование коллагенолитической активности ММП-1** с использованием модифицированного нами метода определения активности, где в качестве субстрата использовали коллаген I типа, меченый флуоресцеинизотиоцианатом.

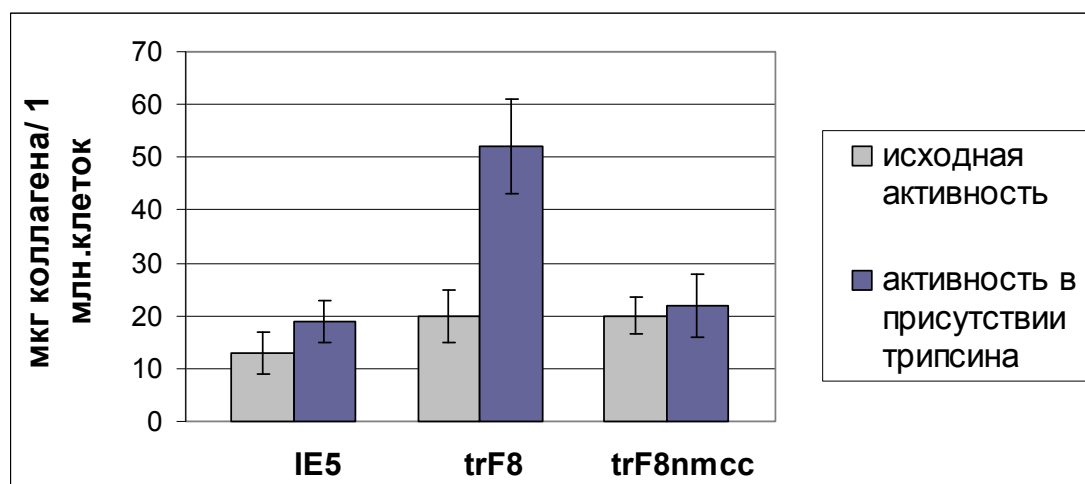
Активность определяли как в кондиционированной среде (секретируемая активность), так и в лизатах клеток. Следует отметить, что ММП-1 относится к секретируемым ММП, в то время как МТ1-ММП связана с мембраной. Представленные на рис. 2 и 3 данные свидетельствуют о том, что в ТФ активность ММП-1, как секретируемая, так и в лизатах, увеличивается в 2-3 раза по сравнению с ИФ, причем уровень активности в лизатах был значительно ниже, чем в кондиционированной среде (рис.3).



**Рис.2 Секретируемая коллагенолитическая активность.**

Коллагенолитическая активность, обнаруженная в лизатах клеток, а именно в этой фракции содержатся мембраносвязанные ММП, косвенно свидетельствует об активности МТ1-ММП, которую по субстратной специфичности считают ММП-1, связанной с мембраной. Активация про-ММП-1 трипсином приводила к значительному увеличению активности (в 1,5- 2 раза), исключение составлял клон trF8nmcc, где активность в лизатах существенно не изменялась по сравнению с ИФ. Эти результаты свидетельствуют о наличии значительного количества ММП в форме предшественников. Данные по увеличению

коллагенолитической активности в ТФ согласуются с полученными данными по увеличению экспрессии мРНК в исследованных клонах.



**Рис.3 Коллагенолитическая активность в лизатах клеток**

Наличие свободных эндогенных ингибиторов ММП в кондиционированной среде определяли методом разведений. Следует подчеркнуть, что это в значительной степени качественный, а не количественный подход к обнаружению свободных эндогенных ингибиторов ММП. Однако он позволяет оценить тенденцию и в какой-то мере степень изменений соотношения фермент/ингибитор. В качестве субстрата использовали коллаген I типа. Кондиционированную среду разводили в 2-10 раз.

В таблице 3 представлены данные только для трех разведений, где прослеживается общий характер изменений соотношения фермент/ингибитор.

**Таблица 3. Активность коллагеназ I типа при различных разведениях кондиционированной среды.**

<b>Клон клеток</b>	Активность , мкг коллагена / 1млн. клеток* (при различных разведениях кондиционированной среды )		
	1:5	1:2	1:1
IE5	53,03±2,81	60,12±2,25	32,53±3,47
trF8	116,67±14,43	130,0±24,75	98,13±21,83
trF8nmcc	95,93±10,96	113,0±13,73	97,19±18,5

\*Каждое значения является средним ± SD из пяти независимых опытов

Из полученных данных следует, что свободные ингибиторы коллагеназ выявляются во всех клеточных клонах. Однако в имморализованных клетках (IE5) в большей степени, чем в обоих трансформированных клонах. Эти результаты согласуются с полученными данными по уменьшению экспрессии мРНК ТИМП-1 в трансформированных клонах и свидетельствуют о том, что во всех трансформированных клетках соотношение фермент/ингибитор существенно изменено по сравнению с исходными и

иммортизированными фибробластами. Снижение количества свободных эндогенных ингибиторов ММП может свидетельствовать о большей потенциальной возможности проявления ферментативной активности ММП.

Итак, полученные данные свидетельствуют о том, что как трансформированные, так и иммортизированные клетки обладают деструктивным потенциалом, который в ТФ выражен значительно ярче. Основной вклад в увеличение уровня деструктивного потенциала в ТФ вносит увеличение экспрессии ММП и снижение экспрессии ингибитора, а в ИФ – увеличение экспрессии фермента (значительно менее выраженное, чем в ТФ) и увеличение экспрессии активатора. Данные по характеристике деструктивного потенциала иммортизированных клетках в литературе отсутствуют. Исключение составляют полученные ранее нами данные об экспрессии в ИФ желатиназ – ММП-2,9. Эти данные приобретают особое значение в связи с литературными данными, полученными на культурах клеток и животных, и свидетельствующими о том, что повышенная экспрессия ММП, которая достигалась путем трансфекции генов соответствующих ММП, вызывает в морфологически нормальных клетках спонтанную пролиферацию и/или увеличивает чувствительность их к канцерогенам, а иногда приводит к трансформации клеток.

На втором этапе работы исследование проводилось на коммерческих клеточных линиях карцином шейки матки, которые отличались по типу HPV и количеству копий вируса: C33A(HPV-отсутствует), SiHa(1-2 копии HPV-16), Caski (500-600 копий HPV-16), Hela (10-50 копий HPV-18) и C4-1(1 копия HPV-18). Работа проводилась с использованием методов RT-PCR и определения энзимологической активности клеток.

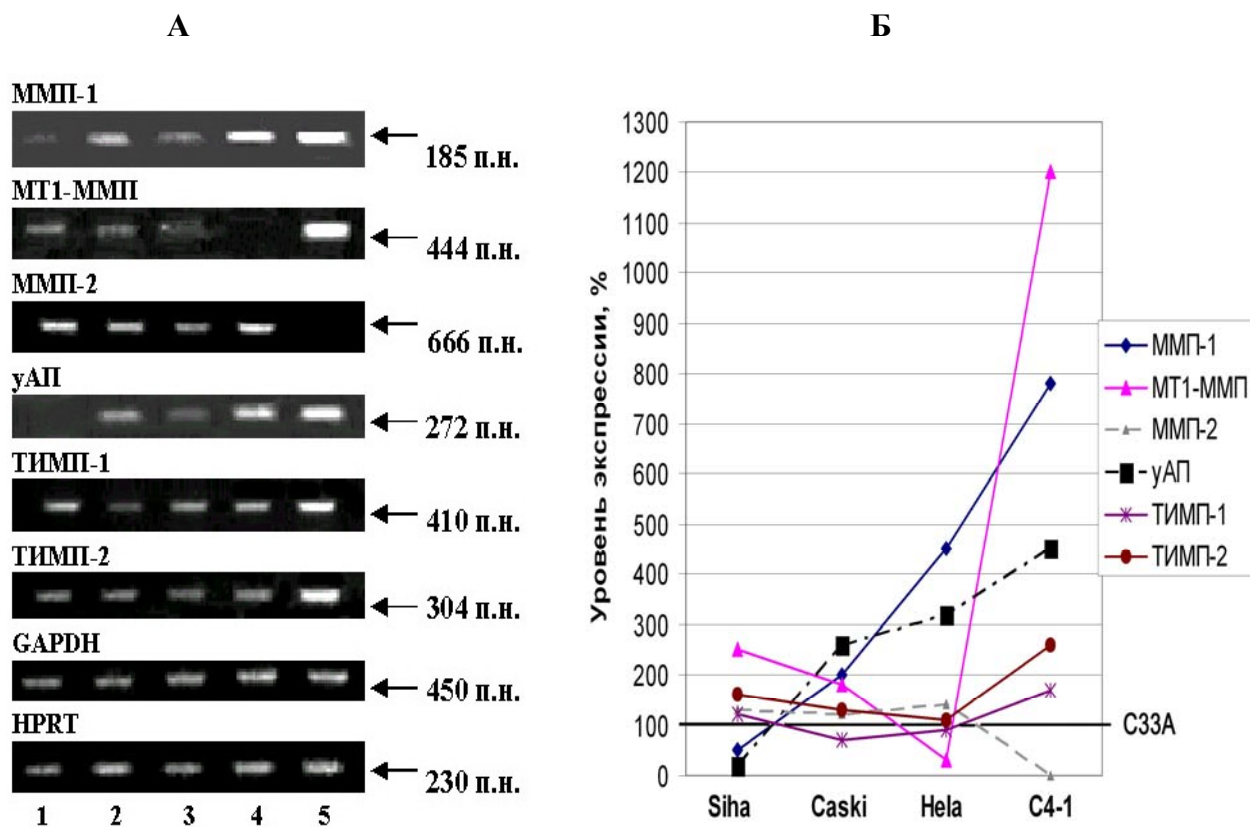
## **2. Сравнительное исследование экспрессии ММП-1,2, МТ1-ММП и регуляторов их активности уАП, ТИМП-1,2 в коммерческих клеточных линиях карцином шейки матки человека, ассоциированных с HPV-16 и HPV-18.**

Для более полной характеристики деструктивного (инвазивного) потенциала клеток наряду с экспрессией мРНК ММП-1 и МТ1-ММП (ферментов, отвечающих за деструкцию фибриллярных коллагенов) исследовали экспрессию ММП-1 и ММП-9 (ферментов, отвечающих за деструкцию коллагена IV типа – основу базальных мембран), а также эндогенных регуляторов их активности. Следует отметить, что вирусы HPV16 и HPV18, как этиологический фактор возникновения рака шейки матки, являются наиболее агрессивными и наиболее распространенными среди онкогенных вирусов HPV.

### **Экспрессия генов ММП-1, 2, МТ1-ММП и эндогенных регуляторов их активности.**

Проведено сравнительное исследование экспрессии мРНК ММП-1, МТ1-ММП и ММП-2, ММП-9, а также эндогенных регуляторов их активности уАП – активатора ММП-1 и

тканевых ингибиторов этих ферментов ТИМП-1 и ТИМП-2 в линиях клеток Siha и Caski, трансформированных онкогенами HPV16 и линиях клеток Hela и C4-1, трансформированными онкогенами HPV18. На рис.4 приведены результаты типичных опытов по данным RT-PCR (рис.4,А) и денситометрии (рис.4,Б). Результаты по экспрессии ММП-9 в клеточных линиях получить не удалось, поскольку праймеры, подобранные к гену ММП-9 человека и дающие положительный результат на клинических образцах, в случае клеточных линий продукта не дали. Проверка экспрессии ММП-9 во всех линиях клеток методом иммуногистохимии показала, что экспрессия ММП-9 обнаружена только в линии клеток Hela. Количественная оценка данных RT-PCR (рис.4 А) проведена методом денситометрии и представлена на рис.4Б. За 100% (контроль) условно принят уровень экспрессии мРНК в линии С33-А, не содержащей копий HPV. Денситометрические данные по всем линиям клеток соотнесены с данными в линии С33А (рис.4 Б)



**Рис.4** Экспрессия м-РНК генов ММП-1, MT1-ММП, ММП-2, уАП, ТИМП-1, ТИМП-2 по данным RT-PCR (А) и денситометрии (Б) в клеточных линиях: 1.-Siha; 2. Caski; 3. С33-А; 4. Hela; 5. С4-1. Количество к-ДНК, вносимое в реакцию соответствовало равному количеству продукта гена GAPDH (глицеральдегидфосфатдегидрогеназы) и HPRT(гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза) для каждого клона клеток.

Полученные результаты (рис.4 А,Б) свидетельствуют о том, что в линиях клеток HPV-18 - Hela, C4-1 (рис.4А, треки 4 и 5) экспрессия ММП, как правило, была выше, чем в клетках HPV-16 - Siha, Caski (рис.4А, треки 1 и 2). В обоих типах клеток экспрессия ММП-1 и MT1-ММП существенно увеличивалась (от 2 до 12 раз), исключение составляют клетки Siha для

ММП-1 и Hela для МТ1-ММП, где наблюдалось снижение экспрессии указанных ферментов (рис.4 А). Экспрессия ММП-2 изменялась незначительно (на 20-40%) в обоих типах клеток (рис.4 А). Высший уровень экспрессии ММП-1 и МТ1-ММП (в 8-12 раз) обнаружен в линии С4-1, ассоциированной с 1 копией HPV-18, в то время как в клетках Hela, ассоциированных с 10-50 копиями HPV-18, уровень экспрессии ММП-1 был в 4,5 раза выше контроля, а уровень экспрессии МТ1-ММП снижался до 30% от контроля (рис.4 А).

В линиях клеток, ассоциированных с HPV16, экспрессия ММП-1 и МТ1-ММП изменялась всего в 2-2,5 раза, а в Siha уровень экспрессии ММП-1 составлял всего 50% от контроля (рис.4 А,Б). Следует отметить, что количество копий HPV16 в Caski составляет 500-600, а в Siha – 1-2 копии. Следовательно, количество копий гена не оказывало влияния на степень экспрессии ММП. Экспрессия ингибиторов в основном была в пределах контроля (рис.4 А,Б). Исключение составила линия С4-1, где экспрессия ТИМП-1 и ТИМП-2 была увеличена в 1,7 и 2,6 раза соответственно. Экспрессия уАП увеличена во всех линиях клеток (от 2 до 4,5 раз), кроме Siha, где она была снижена до 20% (рис.4 А,Б). Полученные данные свидетельствуют о том, что в трансформированных клетках существенно нарушено соотношение фермент/ингибитор/активатор, которое происходит в основном за счёт увеличения экспрессии ферментов и в меньшей степени - уменьшения экспрессии ингибитора, что приводит к увеличению деструктивного потенциала клеток.

Имеющиеся в литературе немногочисленные данные по экспрессии мРНК в исследованных линиях клеток достаточно противоречивы. Данные по экспрессии ММП-1 практически отсутствуют. Наши результаты согласуются с литературными данными по экспрессии мРНК в случае МТ1-ММП и ТИМП-1 во всех линиях клеток кроме линии С4-1, где нами была обнаружена максимальная экспрессия МТ1-ММП и ТИМП-1, в то время как по литературным данным экспрессия этих генов в линии С4-1 была минимальна. По нашим данным уровни экспрессии ММП-2 во всех клеточных линиях были очень близки (рис.4), кроме С4-1, где экспрессия отсутствовала. Литературные данные в отношении экспрессии ММП-2 противоречивы и различаются по степени экспрессии. Существенные различия между нашими данными и литературными оказались в случае экспрессии ММП-9. Несмотря на то, что и условия проведения реакции и состав праймеров были идентичны, экспрессии ММП-9 была обнаружена нами только в клеточной линии Hela, в то время как по литературным данным она обнаружена в линиях Siha, Caski и С4-1. Такую разницу в результатах можно объяснить гетерогенностью клеточного материала, находящегося в разных банках.



### Сравнительное исследование коллагенолитической активности.

Исследование коллагенолитической активности ММП-1 (по гидролизу флюорогенного коллагена I типа) выявило активность ММП-1 во всех линиях клеток только в кондиционированной среде. В лизатах клеток, достоверной активности обнаружено не было, в отличие от клеточных линий фибробластов крысы, где активность ММП-1 в лизатах была существенной, хотя и значительно ниже, чем в кондиционированной среде (рис. 5).

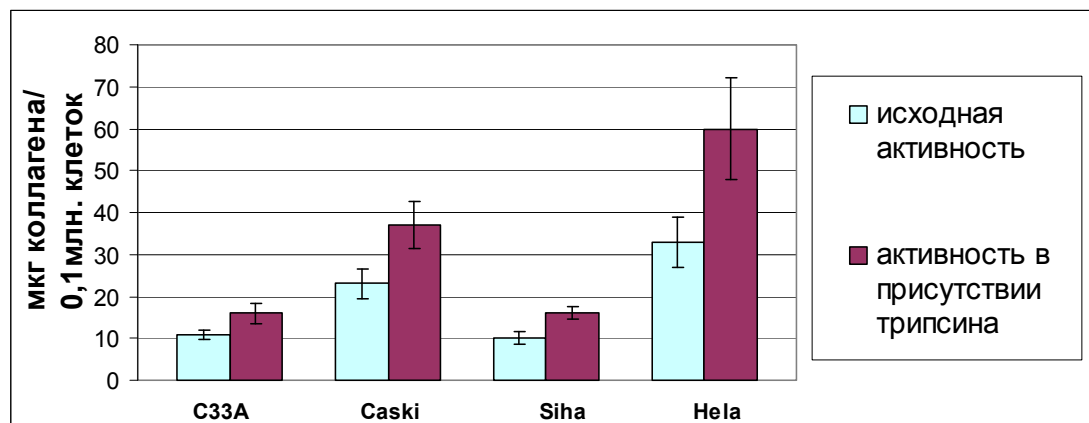


Рис. 5 Секретируемая коллагенолитическая активность.

Уровень коллагенолитической активности в клеточных линиях соотносили с уровнем активности в линии C33A, где отсутствуют копии HPV-16 и 18. В клеточной линии SiHa активность была сопоставима с активностью в линии C33A, в линии Caski активность была выше, чем в C33A в 2,3 раза, а в линии HeLa в 3,3раза.

Активация про-ММП-1 трипсином приводила к значительному увеличению активности (в 1,5- 2 раза) во всех клеточных линиях, что свидетельствуют о наличии значительного количества ММП в форме предшественников. Полученные данные указывают на то, что клеточная линия HeLa, ассоциированная с HPV-18, обладала более высокой коллагенолитической активностью, чем линии Caski и SiHa, ассоциированные с HPV-16. Ферментативная активность клеточных линий, отличающихся по количеству копий HPV-16 – SiHa(1-2 копии), Caski (500-600 копий) различалась всего в 1,5 – 2 раза в пользу линии Caski, т.е. существенных различий в экспрессии ММП в зависимости от количества копий HPV-16 не было обнаружено. Была предпринята попытка оценить наличие свободных эндогенных ингибиторов в кондиционированной среде клеточных линий карцином шейки матки методом разведений. Однако, в отличие от модели фибробластов крысы в клеточных линиях карцином шейки матки свободных эндогенных ингибиторов в кондиционированной среде не было обнаружено.

Данные по исследованию коллагенолитической активности согласуются с данными по экспрессии мРНК и свидетельствуют о том, что: 1. в клетках, трансформированных HPV-18 деструктивный потенциал значительно выше, чем в клетках, трансформированных HPV-16.

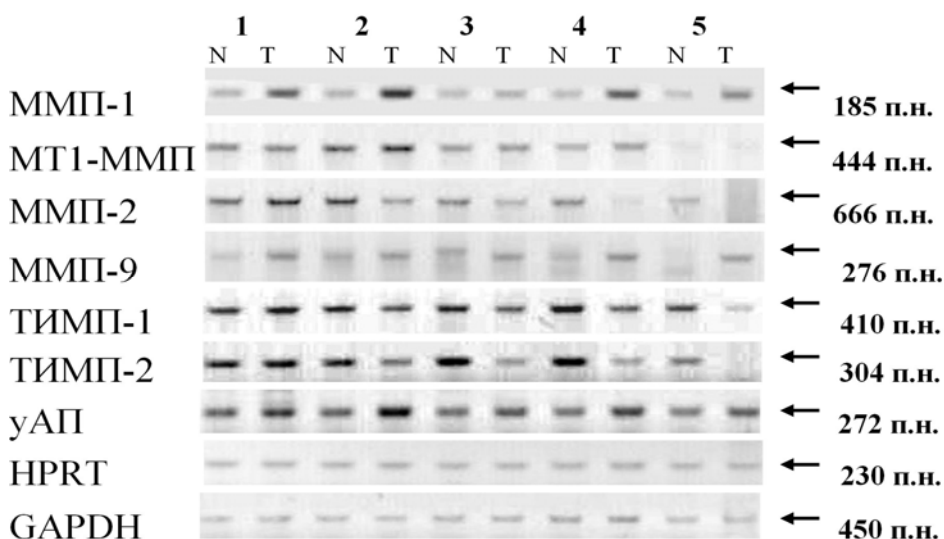
2. Основной вклад в деструктивный (инвазивный) потенциал обеих линий клеток вносят ММП-1 и МТ1-ММП, в то время как экспрессия ММП-2 существенно не изменяется, а ММП-9 (по данным иммуногистохимии) экспрессируется только в линии клеток Hela.

### 3. Исследование экспрессии ММП-1, МТ1-ММП, ММП-2, ММП-9 и регуляторов их активности уАП, ТИМП-1,2 в плоскоклеточных карциномах шейки матки.

Для оценки деструктивного (инвазивного) потенциала опухолевой ткани работу проводили на образцах плоскоклеточных карцином шейки матки, взятых во время операций. Во всех образцах экспрессировался ген E7 HPV16. Исследовали экспрессию двух групп ММП, как и при исследовании на клеточных линиях человека, а именно ММП-1, МТ1-ММП и ММП-2, ММП-9, а также регуляторов активности ММП. Работа проводилась с использованием четырёх методов: RT-PCR, иммуногистохимии, зимографии и определения коллагенолитической активности.

#### Эспрессия генов ММП-1, МТ1-ММП, ММП-2, ММП-9 и регуляторов их активности уАП, ТИМП-1 и ТИМП-2 в плоскоклеточных карциномах шейки матки.

Исследование проводилось на 36 образцах карцином шейки матки и 11 образцах морфологически нормальной ткани, прилегающей к опухоли. Экспрессию ММП и их эндогенных тканевых ингибиторов оценивали в сравнении с экспрессией в образцах прилегающей ткани. В качестве иллюстрации приведены 5 пар образцов (рис. 6).

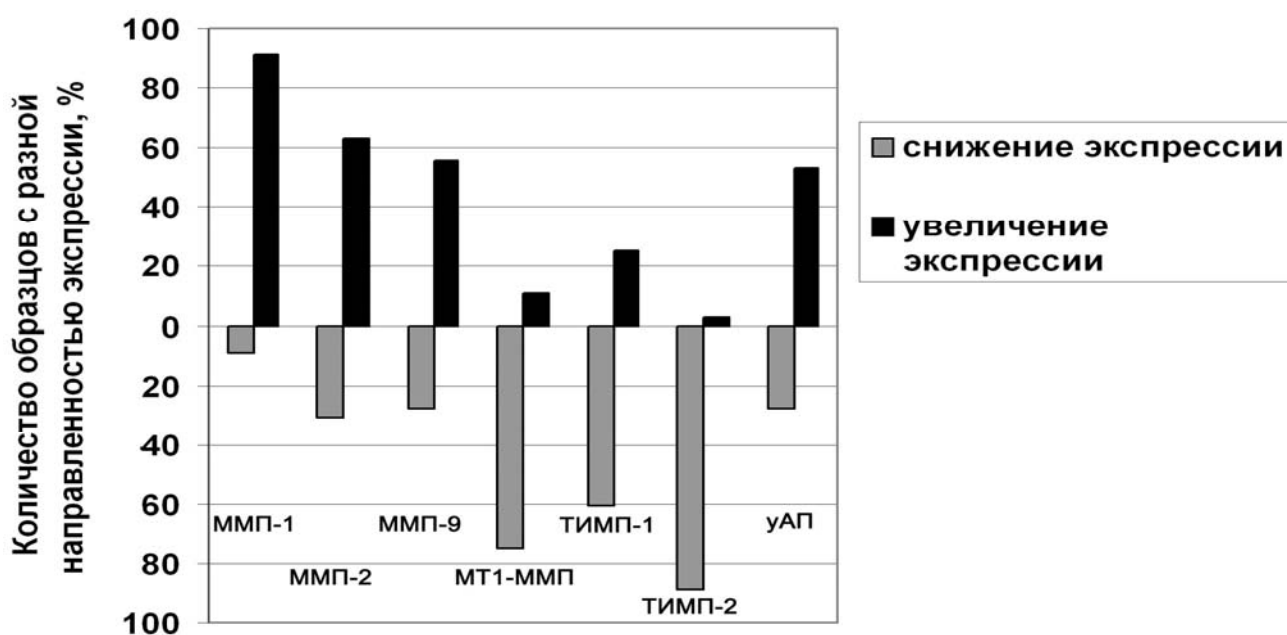


**Рис 6. Экспрессия мРНК генов ММП-1, МТ1-ММП, ММП-2, ММП-9, у-РА, ТИМП-1, ТИМП-2 в образцах плоскоклеточных карцином шейки матки.** Количество к-ДНК, вносимое в реакцию, соответствовало равному количеству продукта гена GAPDH (глицеральдегидфосфатдегидрогеназы) и гена HPRT (гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза) для каждого клона клеток.

Из представленных на рис.6 данных следует, что выраженное увеличение экспрессии мРНК ММП-1 наблюдалось в большинстве образцов, увеличение экспрессии ММП-2 и

ММП-9 было менее выражено, а в случае ингибиторов в большинстве образцов наблюдалось снижение экспрессии мРНК.

Количественная оценка экспрессии ММП и их ингибиторов с помощью денситометрии показала, что увеличение экспрессии происходило не более, чем в два раза, а в ряде случаев было равно экспрессии в норме или было ниже нормы, т.ч. разброс данных был достаточно велик. Статистическая обработка данных денситометрии по экспрессии генов ММП и их регуляторов не позволила выявить достоверных существенных различий в экспрессии как ММП, так и их ингибиторов в исследуемых образцах опухоли по сравнению с морфологически нормальной тканью. В связи с этим мы попытались рассмотреть положительную и отрицательную направленность экспрессии ММП и их ингибиторов в исследуемых образцах, для этого выделили две группы данных с увеличением и уменьшением экспрессии в опухолях по сравнению с контролем. Оказалось (рис.7), что во всей группе исследованных образцов, которую принимаем за 100%, увеличение экспрессии ММП-1 обнаружено в 86% образцов, ММП-2 в 66% , ММП-9 в 58%, уАП в 53%, при этом наблюдалось снижение экспрессии ТИМП-1 и ТИМП-2 (61% образцов и 89% соответственно), и снижение экспрессии МТ1-ММП в 75% образцов.

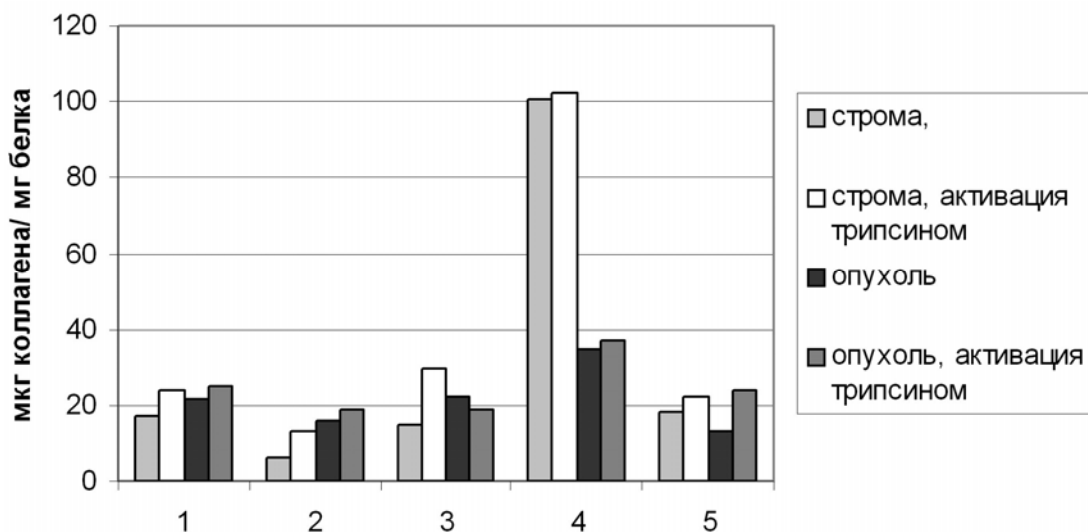


**Рис. 7. Направленность экспрессии ММП и их регуляторов в образцах карцином шейки матки.**

Полученные данные свидетельствуют о том, что в большей части опухолевых образцов экспрессия ММП была повышена, а экспрессия их ингибиторов снижена по сравнению с прилегающей к опухоли нормальной тканью, т.е. экспрессия как ММП, так и их ингибиторов была направлена на увеличение деструктивного потенциала клеток.

## Исследование коллагенолитической активности (по флюорогенному коллагену I типа).

Коллагенолитическую активность определяли в лизатах образцов опухоли и прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани (строме). Коллагенолитическая активность представляет собой сумму активности ММП-1 и МТ1-ММП. Следует учитывать, что ММП-1 является секретируемой, а МТ1-ММП – мембраносвязанной металлопротеиназой. На рис. 8 представлены результаты, полученные на пяти парах образцов, включающих ткань опухоли и прилегающую к опухоли морфологически нормальную ткань. Полученные данные свидетельствуют о том, что коллагенолитическая активность была обнаружена как в опухоли, так и в строме (рис. 8). В первых трёх парах образцов активность в опухоли превышает активность в нормальной ткани (от 1,3 до 2,7 раза). В образцах 4 и 5 наблюдается обратная картина, активность в нормальной ткани превышала активность в опухоли (в 3 и 1,4 раза). При этом активность в опухоли была достаточно высокой во всех образцах, т.е. экспрессия ММП-1 и МТ1-ММП была достаточно выраженной.



**Рис.8 Коллагенолитическая активность в образцах карцином шейки матки.**

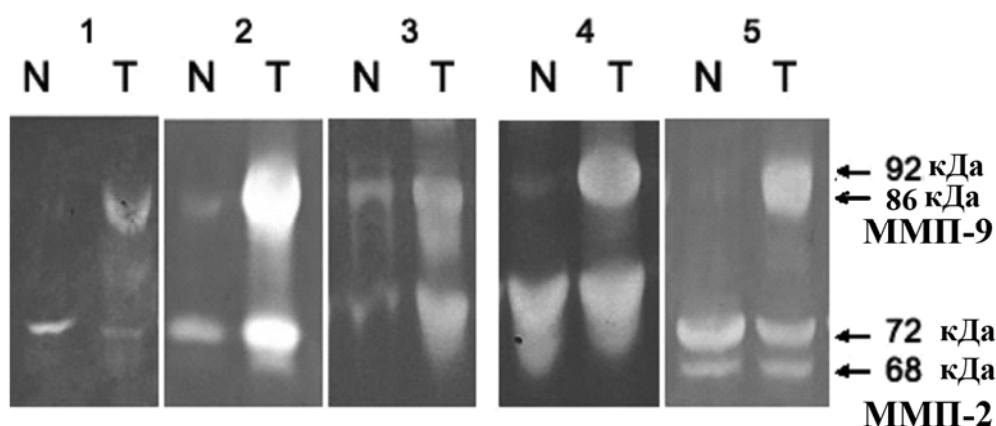
Активация трипсином приводила к увеличению активности в опухолевых тканях и в строме (рис.8.). Полученные данные свидетельствуют о наличии значительного протеолитического потенциала, как в опухолевых клетках, так и в строме. Результаты согласуются с литературными данными о том, что в ряде видов опухолей активность ММП в окружающей опухоль ткани была сравнима или существенно выше, чем в самой опухоли за счёт активации ММП стромы с помощью различных факторов, вырабатываемых опухолью. Данные о присутствии активности ММП в прилегающей к опухоли шейки матки ткани отсутствуют в литературе. Результаты могут быть использованы для оценки деструктивного

потенциала прилегающей к опухоли ткани и, по-видимому, для определения размеров операционного поля при хирургическом вмешательстве.

### **Исследование ММП-2, ММП-9 методом зимографии.**

Спектр и активности ММП-2 и ММП-9 в образцах морфологически нормальных и опухолевых тканей исследовали методом зимографии.

Работа проводилась на 19 образцах карцином шейки матки и 15 образцах прилегающих к опухоли тканей. На рис.9 представлены данные зимографии типичных опытов. Из полученных данных следует, что во всех образцах опухоли и контроля присутствовала ММП-2. Необходимо отметить, что ММП-2 относится к конститутивным ферментам, уровень которых в тканях мало зависит от факторов, индуцирующих синтез. Ярко выраженная экспрессия ММП-9 (индуцируемый фермент) наблюдалась в 94% образцов опухолей. Активность ММП-9 резко увеличивалась во всех образцах опухоли по сравнению со стромой, где она присутствовала в очень незначительных количествах (рис.9). Активность ММП-2 обнаружена как в опухоли, так и в строме, причем в образцах 1-3 в прилегающей ткани она была значительно ниже, чем в опухоли, а в 4 и 5 образцах активность в строме была на уровне опухоли или несколько выше неё.



**Рис.9 Идентификация коллагеназ IV типа – ММП-2 и ММП-9 с помощью метода зимографии.** N - морфологически нормальная ткань, T - ткань опухоли. Супернатанты лизатов тканей нанесены из расчета 50мкг белка в трек. SDS-электрофорез проводили – в 7,5% ПААГ с 0,1% желатином.

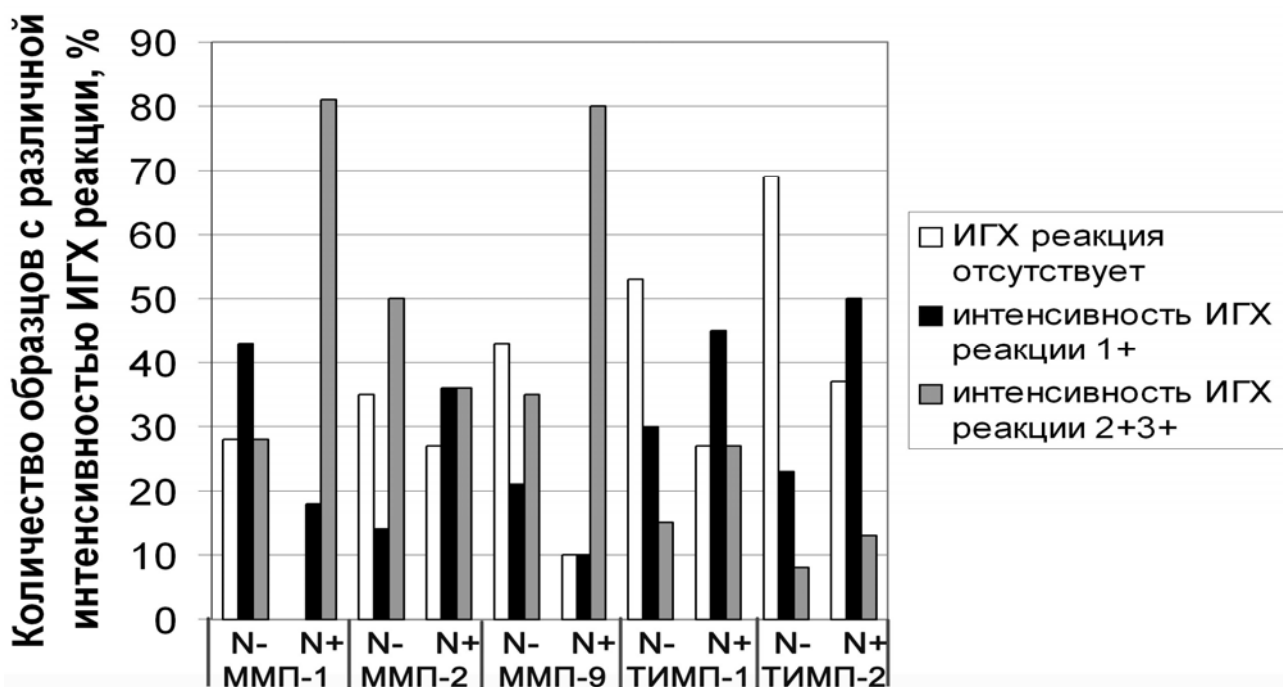
Результаты, полученные по исследованию активности ММП-2 и ММП-9 свидетельствуют о том, что экспрессия этих ферментов происходит не только в опухолевых клетках, но и в прилегающей к ним морфологически нормальной ткани (рис.9).

### **Иммуногистохимическое исследование.**

Работа проводилась совместно с отделением патологической анатомии Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена.

Иммуногистохимические исследования были предприняты с целью выяснения возможных различий по экспрессии ММП и их регуляторов в зависимости от клинических показателей, таких как, наличие метастазов и степень дифференцировки опухолевых клеток.

Исследование экспрессии ММП-1, ММП-2, ММП-9, ТИМП-1 и ТИМП-2 методом иммуногистохимии было проведено на 24 образцах карцином шейки матки. Количественная оценка результатов проводилась по интенсивности реакции полуколичественным методом по бальной шкале от 0 до 3 баллов. Материал был разделен на две группы с учетом наличия (N+) или отсутствия (N-) метастазов в региональные лимфатические узлы. Для сравнительного иммуногистохимического анализа было взято 13 образцов опухолей без метастазов (N-) и 11 образцов опухолей, в которых были обнаружены неотдаленные метастазы (N+).



**Рис.10** Зависимости уровня экспрессии ММП и их ингибиторов и наличия метастазов образцах карцином шейки матки.

Как видно из диаграммы (рис.10), во всех без исключений образцах опухолей, где были обнаружены метастазы экспрессировалась ММП-1, причем в большинстве случаев экспрессия оценивалась в 2-3 балла, в образцах без метастазов высокая экспрессия ММП-1 была обнаружена только в 29% случаев, в остальном же она была низкой или отсутствовала. ММП-9 экспрессировалась в 90% образцов, из них в 80% экспрессия была наивысшей и оценивалась в 2-3 балла. Выраженных различий в экспрессии ММП-2 в образцах с метастазами и без метастазов обнаружено не было, причем в образцах без метастазов высокая активность ММП-2 была обнаружена даже в большем количестве образцов, чем в

случае образцов с метастазами. Слабая экспрессия ТИМП-1 и ТИМП-2 была обнаружена в образцах метастазирующих опухолей, так же как и в опухолях без метастазов.

Корреляционный анализ результатов показал, что данные по степени дифференцировки клеток опухоли имеют обратную корреляцию с высоким уровнем экспрессии ММП-1, ММП-2 и ММП-9 (коэффициенты корреляции 0,5, 0,43 и 0,36 соответственно), а данные по экспрессии ММП-1 и ММП-9 имеют прямую корреляцию с данными о наличии метастазов (коэффициенты корреляции 0,4 и 0,37 соответственно).

Полученные данные, как на исследованных клеточных линиях, так и на образцах опухолей, свидетельствуют о том, что основной вклад в деструктивный (инвазивный) потенциал трансформированных клеток вносит увеличение экспрессии ММП-1 и ММП-9, и в меньшей степени - увеличение экспрессии ММП-2 и снижение экспрессии ингибиторов – ТИМП-1 и ТИМП-2.

## ВЫВОДЫ

1. Трансформация фибробластов крысы геном E7 HPV16 сопровождается увеличением деструктивного (инвазивного) потенциала клеток, которое связано с увеличением экспрессии мРНК фермента – мембраносвязанной матриксной металлопротеиназы (MT1-ММП) и снижением экспрессии тканевого ингибитора ММП (ТИМП-1), в то время как экспрессия активатора - уАП (активатора плазминогена уракиназного типа) остается на уровне контроля. Эти данные согласуются с увеличением коллагенолитической активности (ММП-1, MT1-ММП) в трансформированных фибробластах и снижением уровня эндогенных ингибиторов (ТИМП-1, ТИМП-2) в этих клетках.
2. Иммуортализация фибробластов крысы LT-геном вируса полиомы сопровождается увеличением деструктивного потенциала клеток, хотя на значительно более низком уровне, чем в трансформированных фибробластах, и связано с увеличением экспрессии мРНК фермента (MT1-ММП) и активатора (уАП), которое приводит к увеличению коллагенолитической активности ферментов (ММП-1, MT1-ММП).
3. В коммерческих линиях клеток человека, трансформированных онкогенами HPV18 (Hela, C4-1), деструктивный потенциал значительно выше, чем в клетках, трансформированных HPV16 (Siha, Caski). Увеличение деструктивного потенциала всех линий клеток связано с увеличением экспрессии ММП-1 и MT1-ММП, в то время как экспрессия ММП-2 существенно не изменяется, а ММП-9 была обнаружена только в линии клеток Hela. Экспрессия ТИМП-1 и ТИМП-2 находится на уровне контроля.
4. В большинстве взятых во время операции образцов плоскоклеточных карцином шейки матки экспрессия ММП носит более выраженный характер, чем в исследованных клеточных линиях. Деструктивный потенциал образцов опухолей ассоциирован с экспрессией ММП-1 и ММП-9 (и в меньшей степени ММП-2), а также с низким уровнем экспрессии ТИМП-1, ТИМП-2 и MT1-ММП. Иммуногистохимические данные по экспрессии ММП-1, ММП-2, ММП-9 в опухолевой ткани имеют обратную корреляцию с данными по степени дифференцировки клеток (коэффициенты корреляции – 0,5, 0,43 и 0,36 соответственно), а данные по экспрессии ММП-1 и ММП-9 имеют прямую корреляцию с данными о наличии метастазов (коэффициенты корреляции – 0,4 и 0,37 соответственно).
5. В прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани обнаружена существенная экспрессия ММП-1, ММП-2, ММП-9, которая, по-видимому, вносит свой дополнительный вклад в увеличение деструктивного потенциала опухоли.



## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Рыжакова О.С., Соловьева Н.И. Метод определения активности тканевых коллагеназ с помощью коллагена меченного флуоресцеин изотиоцианатом. //Биомедицинская химия. - 2005. - Т. 51. - С. 432-438.

2. Рыжакова О.С., Гуреева Т.А., Журбицкая В.А., Соловьева Н.И. Экспрессия интерстициальной коллагеназы и эндогенных регуляторов ее активности в фибробластах , трансформированных геном E7 HPV-16. //Биомедицинская химия. – 2007. - Т. 53. - С. 322-331.

2a. Ryzhakova O.S., Gureeva T.A., Zhurbitskaya V.A., Solovyeva N.I. Expression of interstitial collagenase and its endogenous regulators in immortalized and transformed by HPV16 E7 gene fibroblasts. // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.- 2007.- Vol.1.- №4.-pp. 342-347

3. Рыжакова О.С., Киселева Н.П., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Петров А.Н., Франк Г.А., Соловьева Н.И. Экспрессия матриксных металлопротеиназ и их эндогенных ингибиторов в плоскоклеточных карциномах шейки матки. //Материалы международной конференции « Протеолиз, механизмы его регуляции и роль в физиологии и патологии клетки» - Минск. – 2007. - С.68-69

4. Рыжакова О.С. ,Гуреева Т.А., Соловьева Н.И. Экспрессия интерстициальной коллагеназы и эндогенных регуляторов ее активности в иммортализованных и трансформированных геном E7 HPV-16 фибробластах. //Материалы VI симпозиума “Химия протеолитических ферментов”. - Москва. - 2007. - С.137.

5. Соловьева Н. И., Гуреева Т. А., Рыжакова О.С. Матриксные металлопротеиназы и их эндогенные регуляторы в клетках трансформированных онкогенами HPV16 и HPV18. //Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. - Новосибирск - 2008. - С.222

6. Рыжакова О.С., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Франк Г.А., Соловьева Н.И. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы в плоскоклеточных карциномах шейки матки. //Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. – Новосибирск. - 2008. - С.444

Для заметок