

## РОЛЬ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСА В ПРОЦЕССАХ АНГИОГЕНЕЗА ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ КАРЦИНОМЕ

Сеферов Б. Д., Голубинская Е. П., Кальфа М. А., Зяблицкая Е. Ю.

Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С. И. Георгиевского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» (Медицинский институт им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского»), 295051, бул. Ленина, 5/7, Симферополь, Россия

**Для корреспонденции:** Зяблицкая Евгения Юрьевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории, Медицинский институт им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», e-mail: evgu79@mail.ru

**For correspondence:** Evgeniia Yu. Ziablitskaya, MD, Leading Researcher at the Central Research Laboratory, Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky V. I. Vernadsky Crimean Federal University (Medical Institute named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU), e-mail: evgu79@mail.ru

### Information about authors:

Seferov B. D., <https://orcid.org/0000-0003-0191-7665>

Golubinskaya E. P., <https://orcid.org/0000-0003-3917-924X>

Kalfa M. A., <https://orcid.org/0000-0002-7179-3402>

Ziablitskaya E. Yu., <http://orcid.org/0000-0001-8216-4196>

### РЕЗЮМЕ

Экстрацеллюлярный матрикс, составляющий большую часть стромы опухоли, играет ведущую роль в прогрессировании различных видов рака, включая колоректальную карциному, и, следовательно, способствует созданию среды, способствующей метастазированию. Целью данной работы стало изучение клинического значения иммуногистохимической активности металлопротеиназ (MMP-9, MMP-12) и проангиогенных факторов (HIFa, VEGF-A, Ang1, Ang2) и выявление их связи с клинико-морфологическими характеристиками и прогнозом колоректального рака (КРР). Материал и методы. Для исследования был собран гистологический материал пациентов с верифицированной колоректальной карциномой (n=263). Все пациенты были разделены на две группы: 1-ая (n=132) – пациенты с метастатическим КРР (мКРР), 2-ая (n=131) – пациенты с КРР без метастазов (нмКРР). Материалом для исследования являлись фрагменты тканей опухоли, полученные в ходе операционного вмешательства для последующего гистологического и иммуногистохимического исследования с маркерами металлопротеиназ 9, 12 типа (MMP12, MMP9), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A), фактора, индуцируемого гипоксией-1A (HIF1α), ангиопоэтинов 1 и 2 типа (Ang1, Ang2). Оценка экспрессии металлопротеиназ и проангиогенных факторов позволила подтвердить их клиническую значимость в прогрессировании неопластических процессов. Результаты. Полученные данные о тесной функциональной взаимосвязи между проангиогенными факторами и металлопротеиназами, свидетельствуют о перспективности их использования в качестве прогностических биомаркеров. Предполагается, что определение указанных маркеров позволит идентифицировать подкласс пациентов с более высоким риском рецидива/прогрессирования колоректальной карциномы. Таким образом, применение иммуногистохимических методов диагностики, определяющих экспрессию таких маркеров как: MMP12, MMP9, HIFa, VEGF-A, Ang1, Ang2 с оценкой интенсивности реакции и корреляции между ними, открывает новые перспективы в онкодиагностике. Заключение. Проведение рекомендованных диагностических исследований позволит не только предсказать прогноз течения заболевания, но и поможет с дальнейшим определением терапевтической тактики.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, экстрацеллюлярный матрикс, металлопротеиназы, проангиогенные факторы, иммуногистохимия

### EVALUATION OF EXTRACELLULAR MATRIX BIOMARKERS IN COLORECTAL CARCINOMA

Seferov B. D., Golubinskaya E. P., Kalfa M. A. Ziablitskaya E. Yu.

Medical Institute named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

### SUMMARY

Extracellular matrix, which constitutes the majority of tumor stroma, plays a leading role in the progression of various cancers, including colorectal carcinoma, and, therefore, contributes to the creation of an environment conducive to metastasis. The aim of this work was to study the clinical significance of the immunohistochemical activity of metalloproteinases (MMP-9, MMP-12) and proangiogenic factors (HIFa, VEGF-A, Ang1, Ang2) and to identify their relationship with the clinical and morphological characteristics and prognosis of colorectal cancer (CRC). Material and methods. For the study, histological material was collected from patients with verified colorectal carcinoma (n=263). All patients were divided into two groups: 1st - with metastatic colorectal cancer (n=132); 2nd - with non-metastatic colorectal cancer (n=131). The study material was tumor tissue fragments obtained during surgery for subsequent histological and immunohistochemical studies with markers of metalloproteinases type 9, 12 (MMP12, MMP9), vascular

endothelial growth factor (VEGF-A), hypoxia-inducible factor-1A (HIF1 $\alpha$ ), angiopoietins type 1 and 2 (Ang1, Ang2). Evaluation of the expression of metalloproteinases and proangiogenic factors confirmed their clinical significance in the progression of neoplastic processes. Results. The obtained data on the close functional relationship between pro-angiogenic factors and metalloproteinases indicate the promise of their use as prognostic biomarkers. It is assumed that the determination of these markers will identify a subclass of patients with a higher risk of recurrence/progression of colorectal carcinoma. Thus, the use of immunohistochemical diagnostic methods that determine the expression of such markers as: MMP12, MMP9, HIFa, VEGF-A, Ang1, Ang2 with an assessment of the intensity of the reaction and the correlation between them, opens up new prospects in oncodiagnostics. Conclusion. Conducting the recommended diagnostic studies will not only predict the prognosis of the disease, but will also help with the further determination of therapeutic tactics.

**Key words:** colorectal cancer, extracellular matrix, metalloproteinases, proangiogenic factors, immunohistochemistry.

В ходе физиологического клеточного деления могут образовываться неопластические клетки с мутантными генами, однако гомеостаз функционально адекватного микроокружения и механизмы апоптоза предотвращают дальнейшее деление этих клеток [1]. Формирование патологического микроокружения опухоли, состоящего из сосудистой сети опухоли, соединительной ткани и инфильтрирующих иммунных клеток позволяет неопластическим клетками обеспечить ускользание от механизмов иммунного надзора и разрушения, что проявляется в их неконтролируемом росте, диссеминации и метастазировании [2].

Внеклеточный матрикс образован многочисленными белками, среди которых основными компонентами являются протеогликан, коллаген и ламинин. Они обеспечивают структурную поддержку клеток, взаимодействуют с рецепторами на поверхности клеток, регулируя передачу сигналов и динамическое равновесие тканевой системы [3]. Известно, что экстрацеллюлярный матрикс, составляющий большую часть стромы опухоли, играет ведущую роль в прогрессировании различных видов рака, включая колоректальный рак (КРР), и, следовательно, способствует созданию среды, способствующей метастазированию [4]. Ремоделирование сети внеклеточного матрикса облегчает подвижность клеток, ангиогенез, воспаление, коагуляцию, стимуляцию аутофагии и выработку экзосом [5]. Дисрегуляция белков матрикса, а также модуляторов – металлопротеиназ играют ведущую роль не только в структурном ремоделировании микроокружения опухоли [6], но и формирование и распространение новых сосудов внутри опухоли, что актуализирует их потенциальное значение в клинической практике [7; 8].

Сегодня среди молекулярно-биологических показателей, которые могут влиять на клиническое течение КРР, особое место отводится поиску биологических маркеров, характеризующих ангиогенную и инвазивную активности опухоли.

Экспрессия и участие нескольких MMP и проангиогенных факторов (фактора роста эндо-

телия сосудов (VEGF-A), фактора, индуцируемого гипоксией-1A (HIF1 $\alpha$ ), ангиопоэтинов 1 и 2 типа (Ang1, Ang2)) в прогрессировании КРР были определены в ряде исследований, которые, однако, продемонстрировали противоречивые результаты относительно их вклада в патоморфологический процесс и прогноз заболевания [9].

В связи с этим целью нашей работы стало изучение клинического значения иммуногистохимической активности металлопротеиназ (MMP-9, MMP-12) и проангиогенных факторов (HIFa, VEGF-A, Ang1, Ang2) и выявление их связи с клинико-морфологическими характеристиками и прогнозом КРР.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включено 263 пациента с морфологически верифицированной колоректальной карциномой, проходивших наблюдение и лечение в ГБУЗ РК «Крымском республиканском онкологическом клиническом диспансере имени В. М. Ефетова». Согласно дизайну исследования все пациенты были распределены на две группы: 1-ая (n=132) – пациенты с метастатическим КРР (мКРР), 2-ая (n=131) – пациенты с КРР без метастазов (нмКРР).

Проведение работы одобрено локальным этическим комитетом Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского». Исследование выполнено в соответствии с Протоколом Хельсинской декларации по правам человека (1964 г.). Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Материалами исследования выступали фрагменты тканей опухоли, полученные в ходе операционного вмешательства. При гистологическом исследовании материала оценивали степень дифференцировки опухоли, глубину инвазии в слоистую стенку кишки, наличие некрозов в опухоли, наличие и степень выраженности воспалительной инфильтрации, степень выраженности стромы в

опухоли. Оценку экспрессии маркеров MMP-9, MMP-12, HIFa, VEGF-A, Ang1, Ang2 в опухолевой ткани проводили с помощью иммуногистохимического метода (ИГХ).

Вырезку, фиксацию, пропитывание парафином, нарезку и обзорную окраску проводили по стандартной методике с использованием автоматического комплекса (Leica, Германия), аналитический этап – на стейнере Bond-maX и микроскопе DM2000 (Plan 10, 20, 40x) с камерой DFC295 того же производителя. Протокол включал депарафинизацию, высокотемпературную демаскировку эпитопа, блокировку эндогенной пероксидазы, инкубацию с первичным антителом, визуализацию метки диаминобензидином и окраску ядер. Использовали систему визуализации на основе полимера Novolink Polymer Detection System (Leica Biosystems, Великобритания), концентрированные моно- и поликлональные антитела с кроссреактивностью к ткани человека производства Abcam (MMP9, MMP12, Ang1, AB94684 и Ang2, AB8452), Epitomics (HIF1a, клон EP118) и Thermo Scientific (VEGF, клон RB-9031-P1) в разведениях и протоколах, рекомендованных производителем. Экспрессию оценивали по 4-балльной шкале, где 0 – полное отсутствие окрашивания, 1 – слабое окрашивание менее половины площади поля зрения, 2 – окрашивание средней интенсивности трети и более площади препарата, 3 – яркое интенсивное окрашивание трети и более площади поля зрения.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 12.0. Проверку нормальности проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка. Сравнение признаков в случае нормально распределенных данных проводили с использованием параметрического t-критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна-Уитни, если распределение было отличным от нормального. Связь между переменными оценивали с помощью метода ранговой корреляции Спирмена. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

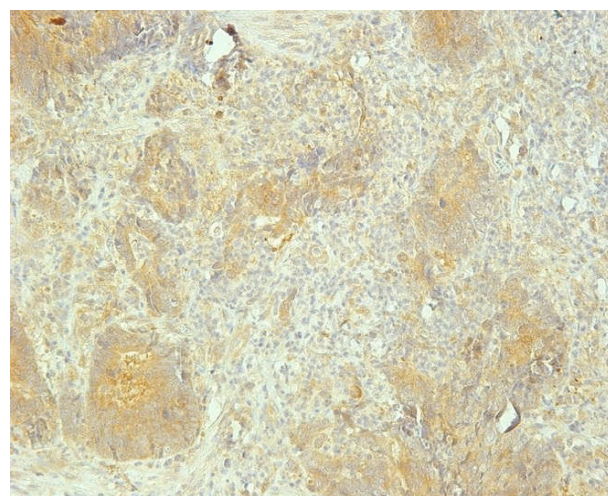
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническо-морфологическая характеристика пациентов исследуемых групп представлена в таблице 1.

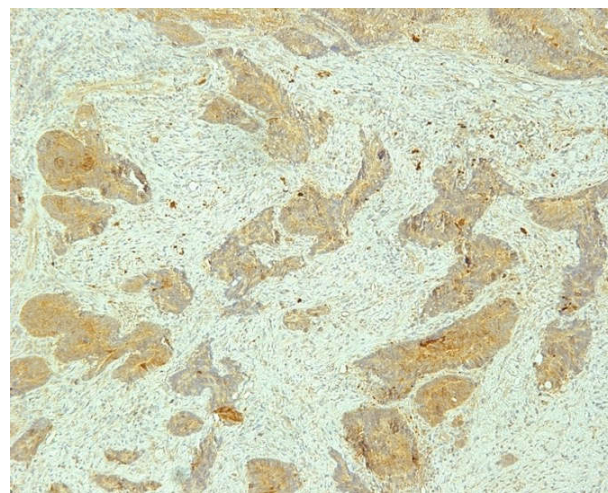
Как видно из представленной таблицы, на светоптическом уровне абсолютное большинство опухолей соответствует карциномам низкой степени злокачественности (G1-G2). У 25 (9,5%) пациентов обеих групп отмечено наличие карциномы солидного строения высокой степени злокачественности (G3): 21 (15,9%) пациент в группе мКРР; 4 (3,1%) - в группе нМКРР. Во всех случаях отмечена лимфоваскулярная инвазия и высокие

показатели опухолевого баддинга (Bd3) в виде участков почкования, наличия плохо дифференцируемых кластеров и разрозненных опухолевых клеток. При сопоставлении данных морфологии и стадии опухоли, лимфоваскулярной инвазии и опухолевого баддинга выявлена прямая значимая зависимость ( $r=0,987$ ,  $p<0,05$ ).

В результате сравнительного анализа уровня MMP-12 было продемонстрировано достоверное преобладание экспрессии данного маркера в группе мКРР ( $7,2 \pm 0,3\%$  против  $4,2 \pm 0,1\%$  в группе нМКРР,  $p=0,02$ ). При этом экспрессия MMP-9 была примерно на одинаковом уровне как в группе метастатического, так и неметастатического КРР ( $5,3 \pm 0,1\%$  и  $6,1 \pm 0,2\%$  соответственно,  $p>0,05$ ). (табл. 2, рис. 1).



А



В

Рис. 1. Иммуногистохимическая экспрессия маркеров: А-MMP-9; В-MMP-12

Fig. 1. Immunohistochemical expression of markers: А-MMP-9; В-MMP-12

**Таблица 1. Клиническо-морфологическая характеристика пациентов с метастатическим и неметастатическим КРР.****Table 1. Clinical and morphological characteristics of patients with metastatic and non-metastatic colorectal cancer**

| Характеристика                                           | мКРР (n=132) | нмКРР (n=131) | p      |
|----------------------------------------------------------|--------------|---------------|--------|
| Пол, абс (%)                                             |              |               |        |
| мужской                                                  | 60 (45,4)    | 58 (44,3)     | 0,058  |
| женский                                                  | 72(54,5)     | 73 (55,7)     |        |
| Возраст, абс (%)                                         |              |               |        |
| <60 лет                                                  | 62 (46,9)    | 65 (49,6)     | 0,441  |
| >60 лет                                                  | 70 (53,1)    | 66 (50,4)     |        |
| Распространенность опухолевого процесса, абс (%)         |              |               |        |
| pT2                                                      | 10 (7,6)     | 122 (93,1)    | <0,001 |
| pT3                                                      | 108 (81,8)   | 9 (6,9)       |        |
| pT4a                                                     | 14 (10,6)    | 0             |        |
| Степень дифференцировки, абс (%)                         |              |               |        |
| Low Grade (G1-G2)                                        | 111 (84,1)   | 127 (96,9)    | <0,001 |
| High Grade (G3)                                          | 21 (15,9)    | 4 (3,1)       |        |
| Лимфоваскулярная инвазия, абс (%)                        |              |               |        |
| LV1                                                      | 132 (100)    | 81 (61,8)     | <0,001 |
| LV0                                                      | 0            | 50 (38,2)     |        |
| Периневральная инвазия, абс (%)                          |              |               |        |
| Pn1                                                      | 48 (36,3)    | 17 (12,9)     | <0,001 |
| Pn0                                                      | 84 (63,7)    | 114 (87,1)    |        |
| Опухолевый баддинг, абс (%)                              |              |               |        |
| Bd1 (low) 0-4                                            | 15 (11,4)    | 79 (60,3)     | <0,001 |
| Bd2 (intermediate) 5-9                                   | 31 (23,5)    | 48 (36,6)     |        |
| Bd3 (high) >10                                           | 86 (65,1)    | 4 (3,1)       |        |
| Опухоль-ассоциированная лимфоидная инфильтрация, абс (%) |              |               |        |
| Слабая                                                   | 48 (36,4)    | 36 (27,5)     | <0,001 |
| Умеренная                                                | 52 (39,4)    | 27 (20,6)     |        |
| Выраженная                                               | 32 (24,2)    | 68 (51,9)     |        |

**Таблица 2. Экспрессия металлопротеиназ (ММР-9 и ММР-12) при метастатическом и неметастатическом КРР.****Table 2. Expression of metalloproteinases (MMP-9 and MMP-12) in metastatic and non-metastatic colorectal cancer.**

| ИГХ-маркер    | мКРР (n=132) | нмКРР (n=131) | p    |
|---------------|--------------|---------------|------|
| MMP9, m±M, %  | 5,3±0,1      | 6,1±0,2       | 0,78 |
| MMP12, m±M, % | 7,2±0,3      | 4,2±0,1       | 0,02 |

**Примечание:** М – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего арифметического.

**Note:** M — arithmetic mean, m – standard error of the mean.

Анализ иммуногистохимических реакций с HIF1a и VEGF-A позволил дифференцировать изученные образцы опухоли на «холодные», «промежуточные» и «горячие». Так «холод-

ные» очаги характеризовались минимальными показателями опухоль-ассоциированной инфильтрации, а также клеточных популяций, экспрессирующих HIF1a и VEGF-A (до 15%).

«Промежуточные» равномерно распределенные клеточные популяции в строме опухоли и перифокальных участках (15-50%). «Горячие» опухоли с выраженной густоклеточной инфильтрацией лимфоидными клетками и макрофагами стромы опухоли и перифокальных участков, а так же высокими показателями интенсивности экспрессии HIF1a и VEGF-A

(более 50%). При этом обращают на себя внимание статистически значимое увеличение экспрессии HIF1a и VEGF-A в группе пациентов с метастатическим КРР по сравнению с группой нмКРР ( $p<0,001$ ). Реакция с антителами Ang1 и Ang2 была положительной в 100% образцов пациентов, как в группе мКРР, так и в группе нмКРР ( $p<0,05$ ) (табл. 3).

**Таблица 3. Иммуногистохимическая активности металлопротеиназ (MMP-9, MMP-12) и проангиогенных факторов (HIFa, VEGF-A, Ang1, Ang2) при метастатическом и неметастатическом КРР.**  
**Table 3. Immunohistochemical activity of metalloproteinases (MMP-9, MMP-12) and proangiogenic factors (HIFa, VEGF-A, Ang1, Ang2) in metastatic and non-metastatic colorectal cancer.**

| Характеристика          | мКРР (n=132) | нмКРР (n=131) | p      |
|-------------------------|--------------|---------------|--------|
| HIF1a, абс (%)          |              |               |        |
| «холодные опухоли»      | 10 (7,6)     | 16 (12,2)     | <0,001 |
| «промежуточные опухоли» | 49 (37,1)    | 54 (41,2)     |        |
| «горячие опухоли»       | 73 (55,3)    | 61 (46,5)     |        |
| VEGF-A, абс (%)         |              |               |        |
| «холодные опухоли»      | 9 (6,8)      | 15 (11,5)     | <0,001 |
| «промежуточные опухоли» | 42 (31,8)    | 41 (31,3)     |        |
| «горячие опухоли»       | 81 (61,4)    | 75 (57,2)     |        |
| Angiotensin, абс (%)    |              |               |        |
| Ang1                    | 132 (100)    | 131 (100)     | 1,00   |
| Ang2                    | 132 (100)    | 131 (100)     |        |
| MMP9, абс (%)           |              |               |        |
| Слабая интенсивность    | 52 (39,4)    | 54 (41,2)     | 0,069  |
| Умеренная интенсивность | 80 (60,6)    | 77 (58,7)     |        |
| MMP12, абс (%)          |              |               |        |
| Слабая интенсивность    | 4 (3,1)      | 72 (54,9)     | <0,001 |
| Умеренная интенсивность | 128 (96,9)   | 59 (45,1)     |        |

Проведенный корреляционный анализ между экспрессией ИГХ-маркеров и данными о патологоанатомической стадии опухоли, дифференцировки опухоли, лимфоваскулярной инвазии, опухолевого баддинга позволил выявить ряд достоверных ассоциаций в каждой из исследуемых групп пациентов.

Так, в группе мКРР уровень MMP-9 продемонстрировал обратную связь с размером опухоли pT2 ( $r=-0,757$ ,  $p=0,015$ ), низкой степенью злокачественности (G1-G2) ( $r=-0,867$ ,  $p=0,038$ ) и прямую – с наличием лимфоваскулярной инвазии опухоли (LV1) ( $r=0,655$ ,  $p=0,011$ ); MMP-12 положительно коррелировала с распространенностью опухолевого процесса pT3 и pT4 ( $r=0,989$ ,  $p=0,001$  и  $r=0,991$ ,  $p<0,001$  соответственно), высокой степенью злокачественности (G3) ( $r=0,877$ ,  $p=0,021$ ), с наличием лимфоваскулярной инвазии

опухоли (LV1) ( $r=0,912$ ,  $p=0,003$ ), промежуточной и высокой степенью опухолевого баддинга (Bd 2 и Bd3) ( $r=0,781$ ,  $p=0,048$  и  $r=0,978$ ,  $p=0,001$  соответственно); степень экспрессированности VEGF имела отрицательную ассоциацию с низкой степени злокачественности опухоли (G1-G2) ( $r=-0,806$ ,  $p<0,001$ ).

В группе нмКРР экспрессия MMP9 также отрицательно коррелировала с размером опухоли pT2 ( $r=-0,786$ ,  $p=0,04$ ), с низкой степенью злокачественности (G1-G2) ( $r=0,933$ ,  $p=0,015$ ), положительно – с наличием лимфоваскулярной инвазии опухоли (LV1) ( $r=0,712$ ,  $p=0,005$ ); маркер MMP-12 имел сильную положительную связь с размерами опухоли pT3 и pT4 ( $R=0,899$ ,  $p=0,003$  и  $R=0,923$ ,  $p=0,017$ ), высокой степенью злокачественности (G3) ( $r=0,905$ ,  $p<0,001$ ), с с наличием лимфоваскулярной инвазии опухоли

(LV1 ( $r=0,823$ ,  $p=0,029$ ), степенью опухолевого баддинга Bd3 ( $r=0,962$ ,  $p=0,001$ ); также была зафиксирована отрицательная взаимосвязь между уровнем VEGF низкой степени злокачественности опухоли (G1-G2) ( $r=0,798$ ,  $p=0,025$ ).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка биологических факторов, коррелирующих с инвазивным и ангиогенным потенциалом опухоли особенно важна для определения риска раннего метастазирования и прогноза КРР. В настоящее время продолжается активное изучение молекулярных прогностических факторов при КРР, что имеет большое практическое значение в консультировании пациентов, стратификации пациентов по группам риска, индивидуальном подборе таргетной терапии.

Несмотря на длительную историю ИГХ, возможности данного метода позволяют его использовать не только с диагностической целью, но и для поиска новых мишеней для противоопухолевой терапии, факторов прогноза течения заболевания и биологического поведения опухоли. В нашем исследовании мы решили прибегнуть к определению наиболее перспективных ИГХ-маркеров у пациентов с КРР.

Известно, что фундаментальным аспектом пролиферативного и метастатического потенциала злокачественной опухоли является протеолитическая деградация экстрацеллюлярного матрикса, сопряженная с активностью различных подтипов ММР.

ММП-9 (желатиназа В) является одним из основных протеолитических ферментов, который расщепляет компоненты базальной мембраны, что является первым этапом инвазии карциномы [10]. Ранее выполненные исследования, демонстрируют повышение уровня ММП-9 в сыворотке крови пациентов с КРР и отмечают высокую диагностическую чувствительность данного биомаркера в отношении неблагоприятного прогноза [11-13]. Среди других многочисленных потенциальных опухолевых маркеров внимание исследователей привлекает молекула ММП-12. ММП-12, или металлоэластаза, может переваривать различные субстраты. В нескольких работах ген ММП-12 рассматривался как антиметастатический агент [14; 15]. Между тем, Klupp F. и соавт. показали, что пациенты с КРР характеризуются более высокими сывороточными уровнями экспрессии белка ММП-12 по сравнению с группой здоровых добровольцев [16]. В нашем исследовании было выявлено достоверное повышение экспрессированности ММП12 в группе пациентов с метастатической формой карциномы по сравнению с группой пациентов без метастазов. Это указывает на вовлеченность данной метал-

лопротеиназы в, способствующие деградации внеклеточного матрикса, что облегчает инвазию опухолевых клеток и повышает метастатический потенциал опухоли.

Другой важный аспект биологии опухоли, который определяет прогноз заболевания – выраженность ангиогенеза. Не вызывает сомнения тот факт, что уже на ранних стадиях опухоль не может развиваться и расти без образования в ней разветвленной сети сосудов, обеспечивающих снабжение клеток кислородом и питательными веществами. Относительно недавно, в результате изучения молекулярных механизмов ангиогенеза, было продемонстрировано наличие целого ряда регуляторных ангиогенных и антиангиогенных факторов, динамический баланс которых обеспечивает формирование и распространение новых сосудов внутри опухоли.

Проангиогенные факторы особенно интенсивно экспрессируются в опухолях «горячего типа». Известно, что «горячие» опухоли создают благоприятную почву для применения иммунотерапии [17]. В текущем исследовании проведенная оценка ИГХ-реакции проангиогенных факторов при КРР, дает возможность применения таргетной терапии в опухолях, активно экспрессирующих данные маркеры. Благодаря терапевтическому применению концепции «горячих и холодных» опухолей будущее лечение КРР может быть основано на иммунофенотипе опухолевых клеток, при уменьшении значимости других классификаций, открытии концептуально новых стратегий лечения рака.

Весьма неожиданные результаты были получены нами в отношении активности ангиопоэтинов. Уровень Ang 1 и 2 типа демонстрирует стабильно высокие показатели независимо от метастатического статуса опухолевого роста, что может свидетельствовать об активации параллельного с VEGF-A механизма ангиогенеза и указывать на необходимость поиска новых терапевтических подходов [18].

Особо в данной работе подчеркивается факт тесной функциональной взаимосвязи металлопротеиназами экстрацеллюлярного матрикса с изучаемыми проангиогенными факторами при КРР. В литературе накоплены некоторые данные, касающиеся вовлеченности ММР в регуляцию ангиогенеза. Было показано, что специфические ММР усиливают образование новых кровеносных сосудов, высвобождая, связанные с экстрацеллюлярным матриксом, ангиогенные факторы роста, связанные с экстрацеллюлярным матриксом, открывая скрытые сайты связывания интегрина и расщепляя плотные контакты между эндотелиоцитами [19]. Текущее исследование расширяет данные представления и, демонстрирует синер-

гичное корреляционное взаимодействие MMP-9 и MMP-12 с VEGF-A. Вероятно, что в случае KPP ММП участвуют в контроле ангиогенеза, регулируя биодоступность и высвобождение связанных с экстрацеллюлярным матриксом изоформы VEGF за счет внутримолекулярного протеолиза [9].

Также нами отмечено, что нарастание экспрессии MMP-9, MMP-12 и VEGF-A в опухолевых тканях о прогрессировании карциномы, что справедливо как для метастатической, так и неметастатической формы KPP.

Полученные результаты, частично согласуются с результатами зарубежных коллег, которые указывают на ассоциацию повышенной экспрессии ММП с такими клинико-патологическими переменными, как III и IV стадия KPP, метастазы лимфатических узлов, отдаленные метастазы, перитуморальный воспалительный инфильтрат и степени дифференциации клеток II и III [11-13; 20; 21].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Текущее исследование подтверждает важную роль MMP12 и MMP9, играет важную роль в инвазии и метастазировании рака толстой кишки, а также расширяет имеющиеся представления о вовлеченности указанных ферментов в регуляцию процессов ангиогенеза при КР. Применение иммуногистохимических методов диагностики, определяющих экспрессию таких маркеров как: MMP12, MMP9, HIFa, VEGF-A, Ang1, Ang2 с оценкой интенсивности реакции и корреляции между ними, открывает новые перспективы в онкодиагностике. Оценка экспрессии указанных биомаркеров позволит не только предсказать прогноз течения заболевания, но и поможет с дальнейшим определением терапевтической тактики у пациентов с KPP.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

**Финансирование.** Работа финансирована государственным заданием по науке Министерства высшего образования и науки Российской Федерации FZEG-2023-0009 «Изучение гетерогенности микроокружения опухоли как фактора ее агрессивности и резистентности к терапии».

**Funding.** The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, state assignment FZEG-2023-0009 «Study of the heterogeneity of the tumor microenvironment as a factor in its aggressiveness and resistance to therapy».

### ЛИТЕРАТУРА

1. Kim M. S., Ha S. E., Wu M., Zogg H., Ronkon C. F., Lee M. Y., Ro S. Extracellular Matrix

Biomarkers in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17):9185. doi:10.3390/ijms22179185.

2. Asiry S., Kim G., Filippou P. S., Sanchez L. R., Entenberg D., Marks D. K., Oktay M. H., Karagiannis G. S. The Cancer Cell Dissemination Machinery as an Immunosuppressive Niche: A New Obstacle Towards the Era of Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 2021;12:654877. doi:10.3389/fimmu.2021.654877.

3. Karamanos N. K. Extracellular matrix: Key structural and functional meshwork in health and disease. *FEBS J* 2019;286:2826-29. doi:10.1111/febs.14992.

4. Yuzhalin A. E., Lim S. Y., Kutikhin A. G., Gordon-Weeks A. N. Dynamic matrisome: ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 2018;1870:207-228. doi: 10.1016/j.bbcan.2018.09.002.

5. Sanderson R. D., Elkin M., Rapraeger A. C., Ilan N., Vlodavsky I. Heparanase regulation of cancer, autophagy and inflammation: new mechanisms and targets for therapy. *FEBS J* 2017;284(1):42-55. doi:10.1111/febs.13932.

6. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: The role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol* 2003;200:448-464. doi:10.1002/path.1400.

7. Petersen E. V., Chudakova D. A., Skorova E. Y., Anikin V., Reshetov I. V., Mynbaev O. A. The Extracellular Matrix-Derived Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, and Personalized Therapy of Malignant Tumors. *Front. Oncol* 2020;10:575569. doi:10.3389/fonc.2020.575569.

8. Henke E., Nandigama R., Ergun S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front. Mol. Biosci* 2019;6:160. doi:10.3389/fmolb.2019.00160.

9. Herszényi L., Hritz I., Lakatos G., Varga M. Z., Tulassay Z. The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13(10):13240-63. doi:10.3390/ijms131013240.

10. Pezeshkian Z., Nobili S., Peyravian N., Shojaee B., Nazari H., Soleimani H., Asadzadeh-Aghdaei H., Ashrafian Bonab M., Nazemalhosseini-Mojarad E., Mini E. Insights into the Role of Matrix Metalloproteinases in Precancerous Conditions and in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(24):6226. doi:10.3390/cancers13246226.

11. Unsal D., Akyurek N., Uner A., Erpolat O. P., Han U., Akmansu M., Montes B.B., Dursun A. Gelatinase B expression as a prognostic factor in patients with stage II/III rectal carcinoma treated by postoperative adjuvant therapy. *Am J Clin Oncol.* 2008;31(1):55-63. doi:10.1097/COC.0b013e318068b4e2.

12. Chu D., Zhao Z., Zhou Y., Li Y., Li J., Zheng J., Zhao Q., Wang W. Matrix metalloproteinase-9 is associated with relapse and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(1):318-325. doi:10.1245/s10434-011-1686-3.
13. Buhmeida A., Bendardaf R., Hilska M., Collan Y., Laato M., Syrjänen S., Syrjänen K., Pyrhönen S. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in stage II colorectal carcinoma. *J Gastrointest Cancer.* 2009;40(3-4):91-97. doi:10.1007/s12029-009-9091-x.
14. Asano T., Tada M., Cheng S., Takemoto N., Kuramae T., Abe M., Takahashi O., Miyamoto M., Hamada J., Moriuchi T., Hamada J., Moriuchi T., Kondo S. Prognostic values of matrix metalloproteinase family expression in human colorectal carcinoma. *J. Surg. Res.* 2008;146:32-42.
15. Yang W., Arai S., Gorris-Rivas M. J., Mori A., Onodera H., Imamura M. Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance. *Cancer.* 2001;91:1277-1283.
16. Klupp F., Neumann L., Kahlert C., Diers J., Halama N., Franz C., Schmidt T., Koch M., Weitz J., Schneider M., Ulrich A. Serum MMP7, MMP10 and MMP12 level as negative prognostic markers in colon cancer patients. *BMC Cancer.* 2016;16:494. doi:10.1186/s12885-016-2515-7.
17. Wang L., Geng H., Liu Y., Liu L., Chen Y., Wu F., Liu Z., Ling S., Wang Y., Zhou L. Hot and cold tumors: Immunological features and the therapeutic strategies. *MedComm.* 2023;4(5):e343. doi:10.1002/mco2.343.
18. Fagiani E., Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett.* 2013;328(1):18-26. doi:10.1016/j.canlet.2012.08.018.
19. Rundhaug J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005;9(2):267-85. doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00355.x.
20. Delektorskaya V. V., Perevoshchikov A. G., Golovkov D. A., Kushlinskii N. E. Prognostic significance of expression of matrix metalloproteinase in colorectal adenocarcinomas and their metastases. *Bull Exp Biol Med.* 2007;143(4):455-458. doi:10.1007/s10517-007-0155-2.
21. Cavdar Z., Canda A. E., Terzi C., Sarioglu S., Fuzun M., Oktay G. Role of gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9), vascular endothelial growth factor and endostatin on clinicopathological behaviour of rectal cancer. *Colorectal Dis.* 2011;13(2):154-160. doi: 10.1111/j.1463-1318.2009.02105.x.
1. Kim M. S., Ha S. E., Wu M., Zogg H., Ronkon C. F., Lee M. Y., Ro S. Extracellular Matrix Biomarkers in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17):9185. doi:10.3390/ijms22179185.
2. Asiry S., Kim G., Filippou P. S., Sanchez L. R., Entenberg D., Marks D. K., Oktay M. H., Karagiannis G. S. The Cancer Cell Dissemination Machinery as an Immunosuppressive Niche: A New Obstacle Towards the Era of Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol* 2021;12:654877. doi:10.3389/fimmu.2021.654877.
3. Karamanos N. K. Extracellular matrix: Key structural and functional meshwork in health and disease. *FEBS J* 2019;286:2826-29. doi:10.1111/febs.14992.
4. Yuzhalin A. E., Lim S. Y., Kutikhin A. G., Gordon-Weeks A. N. Dynamic matrisome: ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 2018;1870:207-228. doi:10.1016/j.bbcan.2018.09.002.
5. Sanderson R. D., Elkin M., Rapraeger A. C., Ilan N., Vlodavsky I. Heparanase regulation of cancer, autophagy and inflammation: new mechanisms and targets for therapy. *FEBS J* 2017;284(1):42-55. doi:10.1111/febs.13932.
6. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: The role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol* 2003;200:448-464. doi: 10.1002/path.1400.
7. Petersen E. V., Chudakova D. A., Skorova E. Y., Anikin V., Reshetov I. V., Mynbaev O. A. The Extracellular Matrix-Derived Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, and Personalized Therapy of Malignant Tumors. *Front. Oncol* 2020;10:575569. doi:10.3389/fonc.2020.575569.
8. Henke E., Nandigama R., Ergun S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front. Mol. Biosci* 2019;6:160. doi:10.3389/fmolb.2019.00160.
9. Herszényi L., Hritz I., Lakatos G., Varga M. Z., Tulassay Z. The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13(10):13240-63. doi:10.3390/ijms131013240.
10. Pezeshkian Z., Nobili S., Peyravian N., Shojae B., Nazari H., Soleimani H., Asadzadeh-Aghdai H., Ashrafi Bonab M., Nazemalhosseini-Mojarad E., Mini E. Insights into the Role of Matrix Metalloproteinases in Precancerous Conditions and in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(24):6226. doi:10.3390/cancers13246226.
11. Unsal D., Akyurek N., Uner A., Erpolat O. P., Han U., Akmansu M., Montes B.B., Dursun A. Gelatinase B expression as a prognostic factor in patients with stage II/III rectal carcinoma treated by postoperative adjuvant therapy. *Am J Clin Oncol.* 2008;31(1):55-63. doi:10.1097/COC.0b013e318068b4e2.

## REFERENCES

12. Chu D., Zhao Z., Zhou Y., Li Y., Li J., Zheng J., Zhao Q., Wang W. Matrix metalloproteinase-9 is associated with relapse and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(1):318-325. doi:10.1245/s10434-011-1686-3.
13. Buhmeida A., Bendardaf R., Hilska M., Collan Y., Laato M., Syrjänen S., Syrjänen K., Pyrhönen S. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in stage II colorectal carcinoma. *J Gastrointest Cancer.* 2009;40(3-4):91-97. doi: 10.1007/s12029-009-9091-x.
14. Asano T., Tada M., Cheng S., Takemoto N., Kuramae T., Abe M., Takahashi O., Miyamoto M., Hamada J., Moriuchi T., Hamada J., Moriuchi T., Kondo S. Prognostic values of matrix metalloproteinase family expression in human colorectal carcinoma. *J. Surg. Res.* 2008;146:32-42.
15. Yang W., Arai S., Gorrin-Rivas M. J., Mori A., Onodera H., Imamura M. Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance. *Cancer.* 2001;91:1277-1283.
16. Klupp F., Neumann L., Kahlert C., Diers J., Halama N., Franz C., Schmidt T., Koch M., Weitz J., Schneider M., Ulrich A. Serum MMP7, MMP10 and MMP12 level as negative prognostic markers in colon cancer patients. *BMC Cancer.* 2016;16:494. doi:10.1186/s12885-016-2515-7.
17. Wang L., Geng H., Liu Y., Liu L., Chen Y., Wu F., Liu Z., Ling S., Wang Y., Zhou L. Hot and cold tumors: Immunological features and the therapeutic strategies. *MedComm.* 2023;4(5):e343. doi:10.1002/mco2.343.
18. Fagiani E., Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett.* 2013;328(1):18-26. doi:10.1016/j.canlet.2012.08.018.
19. Rundhaug J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005;9(2):267-85. doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00355.x.
20. Delektorskaya V. V., Perevoshchikov A. G., Golovkov D. A., Kushlinskii N. E. Prognostic significance of expression of matrix metalloproteinase in colorectal adenocarcinomas and their metastases. *Bull Exp Biol Med.* 2007;143(4):455-458. doi:10.1007/s10517-007-0155-2.
21. Cavdar Z., Canda A. E., Terzi C., Sarioglu S., Fuzun M., Oktay G. Role of gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9), vascular endothelial growth factor and endostatin on clinicopathological behaviour of rectal cancer. *Colorectal Dis.* 2011;13(2):154-160. doi:10.1111/j.1463-1318.2009.02105.x.