

УДК 577.15.08

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЖЕЛАТИНАЗ В КЛЕТКАХ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2025 г. Н. П. Акентьева¹, *, А. Р. Гизатуллин¹, С. С. Шушанов²

¹Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук,
Черноголовка, Московская область, Россия

²НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: na_aken@icp.ac.ru

Поступила в редакцию 07.11.2024 г.

После доработки 29.11.2024 г.

Принята к публикации 11.12.2024 г.

Рак простаты остается одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний среди мужчин. Желатиназы, такие как MMP-13, MMP-7 и MMP-9, играют ключевую роль в инвазии и метастазировании опухолей. Простатический специфический антиген (PSA) и металлопротеиназы рассматриваются как потенциальные биомаркеры и мишени для диагностики и терапии рака простаты. В исследовании использовали желатиновую зимографию для оценки активности желатиназ в клеточной линии рака простаты PC-3. Результаты показали наличие белковых полос, соответствующих протеолитической активности желатиназ, в области размеров 20, 28 и 37 кДа, что совпадает с активностью MMP-13, MMP-7 и PSA. Таким образом, в клетках рака предстательной железы были идентифицированы желатиназы MMP-13, MMP-7 и PSA, которые могут быть использованы в качестве маркеров агрессивности и прогрессии рака простаты.

Ключевые слова: желатиназы, зимография, протеолитическая активность, рак простаты

DOI: 10.31857/S0042132425010018, **EDN:** DMRDDF

ВВЕДЕНИЕ

Рак простаты продолжает оставаться одним из наиболее распространенных видов онкологических заболеваний среди мужчин и представляет значительную проблему в области здравоохранения по всему миру (Siegel et al., 2020). Несмотря на значительные исследования, многие аспекты этого заболевания остаются недостаточно изученными (Attard et al., 2016). Особое внимание уделяется роли молекулярных факторов, влияющих на агрессивность и способность клеток рака простаты метастазировать (Vihinen, Kähäri, 2002).

Желатиназы, члены семейства металлопротеиназ, играют ключевую роль в регуляции межклеточной коммуникации, ремоделировании межклеточной матрицы и в патологических процессах, связанных с инвазией и метастазированием опухолей (Decock et al., 2011).

В раке простаты эти ферменты могут существенно влиять на прогрессирование опухолевого процесса, модулируя клеточную миграцию, инвазию в окружающие ткани, ангиогенез и иммунные реакции (Turgeenniemi-Hujanen, 2005). Простатический специфический антиген (PSA) и матриксные металлопротеиназы (MMP-13, MMP-7 и MMP-9) привлекают особое внимание как потенциальные биомаркеры и цели для диагностики, прогнозирования и терапии рака простаты (Nelson et al., 2002; Stephan et al., 2014).

Желатиновая зимография представляет собой метод, который позволяет изучать активность желатиназ в биологических образцах, включая ткани и биологические жидкости (Turgeenniemi-Hujanen, 2005). Этот метод обеспечивает информацию о количестве и активности матриксных металлопротеиназ, что может быть полезно для

оценки степени агрессивности и прогрессии рака простаты (Turpeenniemi-Hujanen, 2005).

Целью данного исследования является идентификация и оценка протеолитической активности желатиназ и простатического специфического антигена в клеточной линии рака простаты PC-3 с использованием метода желатиновой зимографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе использовали: Кумасси G-250 (Sigma-Aldrich, США), трипсин-ЭДТА T4049 (Sigma, США), раствор Версена для лабораторных целей (ПанЭко, Россия), дитиотрейтол DTT (Reanal, Венгрия), трис(гидроксиметил) аминометан (Tris, Serva, США), додецилсульфат натрия (SDS, Thermo Fisher Sceintific, США), Triton-X100 (Ferak, Германия), хлорид кальция CaCl_2 (Химмед, Россия), белковые маркеры для электрофореза (Precision Plus Protein Dual Color Standards, BioRad, США), ростовую среду DMEM (25 mM HEPES, 1 г/л глюкоза) (ПанЭко, Россия), L-глутамин (ПанЭко, Россия), гентамицин (ПанЭко, Россия), глицин (Reanal, Венгрия), персульфат аммония (Reanal, Венгрия), акриламид (Reanal, Венгрия), $\text{N}_1\text{N}'$ -метиленбис-акриламид (Reanal, Венгрия), бромфеноловый синий (химзавод им. Войкова, Россия), ТЕМЕД (Reanal, Венгрия), уксусную кислоту (Химмед, Россия), желатин (Миофарм, Россия).

Культивирование клеток

В работе использовали адгезивные клетки аденокарциномы простаты PC-3. Клетки культивировали в ростовой среде DMEM (25 mM HEPES, 1 г/л глюкоза) с добавлением 10%-го (объем/объем) раствора эмбриональной бычьей сыворотки, 150 мг L-глутамина и гентамицина (50 мкг/мл) при pH 7.2. Культуру клеток инкубировали в атмосфере 5%-го CO_2 при 37°C. После достижения 90% плотности клеток, клетки обрабатывали раствором 0.25%-го трипсин-ЭДТА, центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин, надосадочную фракцию отбрасывали, а клетки ре-суспендировали в натрий-фосфатном буфере pH = 7.2 и затем приготавливали клеточные лизаты. Клеточные лизаты получали методом многократного продавливания супензии клеток через иглу шприца (диаметр иглы 25 G). Далее клеточные лизаты использовали в эксперименте для определения активности желатиназ методом SDS-PAGE-электрофореза.

Определение белка

Количество белка в пробах определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976).

Определение активности желатиназ методом SDS-PAGE-электрофореза

Для определения активности желатиназ использовали метод зимографии с желатином (Oliver et al., 1999) в модификации И.В. Воронкиной (Воронкина и др., 2002). Источником желатиназ служили лизаты клеток рака простаты (PC-3). Лизаты клеток выдерживали в течение 30 мин в буфере для проб, содержащем 62.5 mM Tris-HCl и 0.1%-ный SDS, pH 6.8, и анализировали при помощи 10%-го SDS-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии 0.5 мг/мл желатина в разделяющем геле. Концентрирующий гель – 4%, разделяющий гель – 10%. Желатиновую зимографию проводили как в присутствии восстановителя, такого как DTT, так и без него. Пробы наносили в количестве, соответствующем 14 мкг белка на лунку. По окончании электрофореза гель дважды отмывали 2.5%-ным раствором Triton-X100 для удаления SDS и инкубировали в буфере, содержащем 5 mM CaCl_2 и 50 mM Tris-HCl, pH 7.2–7.4, в течение 18 ч при 37°C для ренатурации протеаз и протекания протеолитических реакций. После инкубации гель фиксировали в растворе, содержащем 25%-ный этанол и 10%-ную уксусную кислоту, в течение 30 мин и окрашивали Кумасси G-250. Анализ активности MMP методом SDS-PAGE-электрофореза проводили трижды.

Определение молекулярной массы желатиназ

Выявление положения зон, соответствующих желатиназам, оценивали по молекулярной массе. Для проведения количественного анализа гели сканировали и полученные изображения обрабатывали с помощью программы Quantity One. Протеолитическую активность желатиназ выражали в условных единицах, принятых в программе Quantity One (количество пикселей на интенсивность окраски) (BioRad, США). Результаты денситометрии представляли в виде графиков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стандартный метод зимографии основан на использовании SDS-PAGE-полиакриламидных гелей, сополимеризованных с белковым субстратом, в частности желатином, казеином или фибрином. С помощью этого метода можно анализировать протеазы, которые обладают

способностью ренатурировать после удаления SDS и проявлять протеолитическую активность на сополимеризованном субстрате. Желатиназы, такие как MMP-2 (желатиназа A, 72 кДа), MMP-7 (28 кДа), MMP-9 (желатиназа B, 92 кДа) и MMP-13 (19.6 кДа) можно обнаружить на зимограммах желатина. Окрашивание геля Кумасси синим выявляет участки протеолиза в виде белых полос на темно-синем фоне. Мы проводили электрофорез в присутствии и в отсутствии дитиотрейтоля (DTT), который является сильным восстановителем. Желатиновая зимография, проводимая как с дитиотрейтоловом, так и без него, используется для оценки разных форм матриксных металлопротеиназ. Отсутствие DTT позволяет сохранить естественные дисульфидные связи ферментов, что важно для исследования их нативной активности и структурных особенностей, особенно в условиях, приближенных к биологическим. Это помогает понять, как различные формы MMP функционируют без восстановителей, что полезно для анализа их активности в физиологических условиях, таких как опухолевое микроокружение (Toth et al., 2012).

На рис. 1 представлена зимограмма лизата клеток рака простаты, содержащая белковые полосы, ответственные за расщепление желатина. Мы проводили SDS-PAGE-электрофорез лизатов клеток PC-3 в присутствии DTT (рис. 1а) и в отсутствие DTT (рис. 1б).

На рис. 2 представлена протеолитическая активность желатиназ клеток рака простаты, измеренная с использованием программы Quantity One.

Согласно зимограмме, в обоих случаях мы наблюдали наличие интенсивных белых полос, соответствующих расщеплению желатина при 28 кДа и 37 кДа. Кроме того, наблюдается

диффузная белая полоса при 20 кДа. Из литературы известно, что желатин является субстратом для MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13 (Печерина, Барбара, 2019; Decock et al., 2011). Однако, в соответствии с молекулярной массой это могут быть только MMP-13 (молекулярная масса = 19.6 кДа), MMP-7 (молекулярная масса = 28 кДа) и PSA (молекулярная масса = 34 кДа) (Sharifi-Zahabi et al., 2021).

Мы предполагаем, что полоса, соответствующая по молекулярной массе 28 кДа, относится к протеолитической активности MMP-7. Изоформа MMP-7, одна из самых маленьких матриксных металлопротеиназ, состоит из про-домена и каталитического домена (Bassiouni et al., 2021). Фермент MMP-7 способен утилизировать большой ряд белков внеклеточного матрикса: коллаген IV типа, желатин, ламинин, агрекан, энтактин, эластин и верзикан (Kalluri, Zeisberg, 2006). Он активирует другие протеиназы, является активатором плазминогена урокиназного типа и про-MMP-1, -2, -9, а также расщепляет субстраты типа остеопонтина (Bassiouni et al., 2021). Впервые повышенная экспрессия мРНК MMP-7 при раке предстательной железы наблюдалась в эпителиальных клетках желез (Knox et al., 1996). Высокие уровни MMP-7 также были отмечены в антропных железах, которые были окружены инфильтратами воспалительных клеток. Более того, экспрессия MMP-7 чаще наблюдалась в неопластических предстательных железах, чем в нормальной ткани (Knox, et al., 1996). Позднее было показано, что MMP-7 синтезируется различными опухолями: молочной железы, простаты, толстого кишечника, желудка, верхних дыхательных путей и пищевода, легких и кожи (Mott, Werb, 2004; Piskó et al., 2020). Кроме того, было установлено, что MMP-7

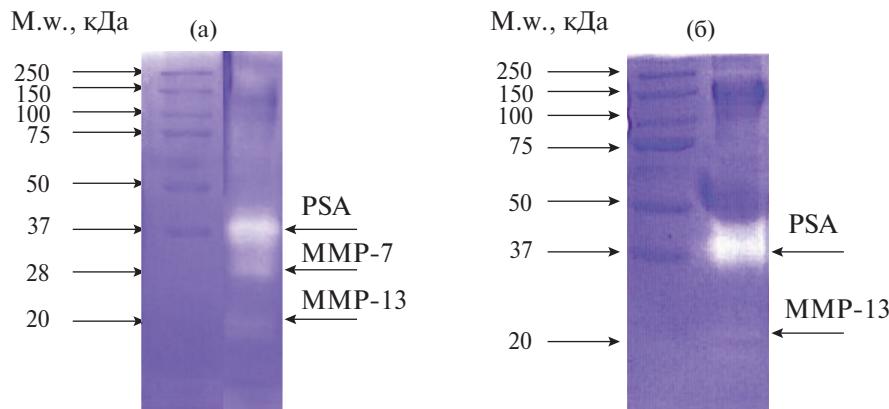


Рис. 1. Анализ желатиназной активности PSA, MMP-7 и MMP-13 в клетках рака простаты PC-3 при зимографии в присутствии DTT (а) и отсутствие DTT (б); M.w. (molecular weight) – молекулярный вес.

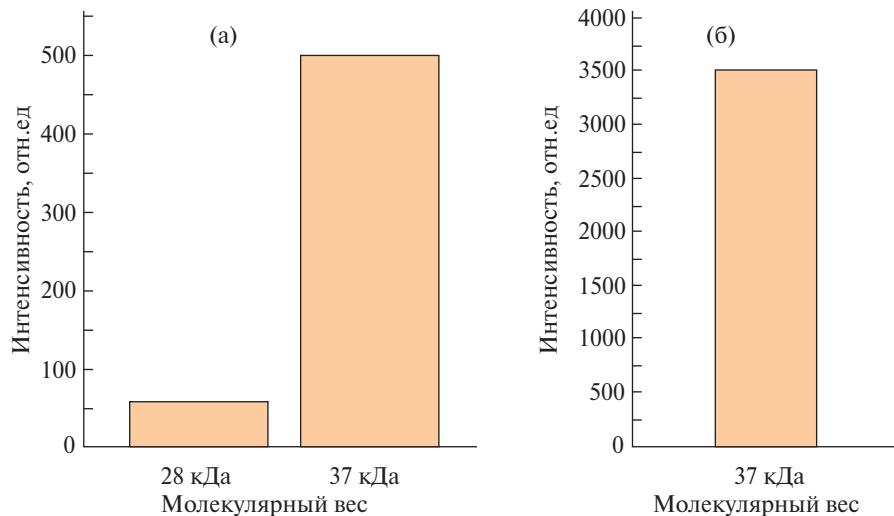


Рис. 2. Денситометрический анализ протеолитической активности желатиназ и определение молекулярной массы MMP-7 и PSA с DTT (а) и без DTT (б) с использованием программы Quantity One.

экспрессируется как в нормальных клетках (кардиомиоцитах и в нейронах), так и в патологически измененных эпителиальных клетках (Lindsey et al., 2006; Szklarczyk et al., 2007). Дальнейшие исследования роли MMP-7 в прогрессировании и росте опухоли рака предстательной железы показали, что в метастазах рака в кости наблюдались значительно более высокие уровни МРНК MMP-7 на границе опухоль–кость по сравнению с областью опухоли (Lynch et al., 2005). Кроме того, экспрессия MMP-7 показала хорошую корреляцию с индексом разрушения кости. Авторы (Lynch et al., 2005) также наблюдали, что MMP-7 не экспрессировалась клетками рака предстательной железы в областях, где происходили остеобластические изменения, тем самым предполагая, что роль MMP-7 была связана с остеолизом, вызванным раком предстательной железы. Кроме того, было показано, что сывороточные концентрации MMP-7 были значительно выше у пациентов с раком простаты с отдаленными метастазами в кости (Szarvas et al., 2011). Эти данные показали, что MMP-7 играет существенную роль в образовании костных метастазов. Таким образом, MMP-7 может быть потенциальным маркером для идентификации пациентов с метастатическим раком предстательной железы. Совсем недавно было показано (Piskó et al., 2020), что интерлейкин-17 индуцировал экспрессию изоформы MMP-7, которая расщепляла комплекс Е-кадгерин/β-катенин и высвобождала β-катенин, тем самым усиливая рост опухолевых клеток при раке предстательной железы. Эти данные свидетельствуют о том,

что MMP-7 может быть потенциальной мишенью для лечения этого типа рака.

Полученные нами результаты показали, что в отсутствии DTT наблюдается нативная активность PSA и MMP-13 в клетках PC-3. Вместе с тем, в присутствии DTT, когда дисульфидные связи восстанавливаются, мы наблюдали протеолитическую активность не только PSA и MMP-13, а также MMP-7. Из литературы известно, что структура MMP-7 содержит два домена: про-пептидный и каталитический (Bassiouni et al., 2021). Про-пептидный домен содержит остаток цистеина (часть переключателя цистеина), который взаимодействует с каталитическим цинком в активном центре, предотвращая его связывание с субстратом и сохраняя MMP-7 неактивным. Поэтому, когда DTT восстанавливает SH-группу в остатке цистеина, каталитический цинк в активном центре высвобождается, в результате чего фермент становится активным, и происходит связывание желатина с активным центром MMP-7. Таким образом, полученные нами результаты согласуются с литературными данными (Bassiouni et al., 2021).

Мы предполагаем, что полоса, соответствующая на зонограмме молекулярной массе 19.6 кДа, относится к изоформе MMP-13. MMP-13, также известная, как коллагеназа-3, обладает широкой субстратной специфичностью и играет важную роль в метастазировании и инвазивности раковых клеток (Stetler-Stevenson, 2001). Вначале MMP-13 была обнаружена в опухоли молочной железы (Balduyck et al., 2000). Дальнейшие исследования показали, что этот фермент продуцируется большим количеством различных

злокачественных клеток, включая плоскоклеточные опухоли головы и шеи, карциному верхних дыхательных путей, гортани и вульвы (Piura et al., 2003; Salaün et al., 2015; Ho et al., 2023). В работах (Luukkaa et al., 2006; Kudo, et al., 2012) было показано, что экспрессия MMP-13 коррелирует с инвазивностью, метастазированием раковых клеток и плохим прогнозом.

Недавние исследования показали, что MMP-13 является диагностическим маркером рака предстательной железы (Morgia et al., 2005; Kalantari et al., 2019). Растет количество исследований, подтверждающих важную роль MMP-13 в метастазировании опухолей предстательной железы. Так, анализ данных Gene Expression Omnibus и образцов тканей человека показал, что уровни экспрессии MMP-13 выше у пациентов с раком простаты, чем у здоровых людей без рака (Wang et al., 2021). С помощью метода ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) было показано, что плазменные концентрации MMP-2, MMP-9 и MMP-13 были выше у пациентов с раком предстательной железы с метастазами, чем в других группах, и их концентрации заметно снижались после начала терапии этих пациентов (Morgia et al., 2005). Результаты показали, что концентрация и активность MMP-13 в плазме в сочетании с определением PSA могут играть роль в диагностике, мониторинге терапии и оценке злокачественного прогрессирования при раке предстательной железы. Недавно, также была продемонстрирована роль MMP-13 и Е-кадгерина в миграции и инвазии клеток рака простаты (Bonaldi et al., 2015). Показано, что MMP-13 и Е-кадгерин являются потенциальными биомаркерами для прогноза рака предстательной железы.

Мы предполагаем, что наблюдаемая протеазная активность в области 37 кДа на зимограммах клеточной линии рака простаты PC-3 относится к PSA. Это подтверждается совпадением молекулярной массы (37 кДа) и известной активностью PSA по расщеплению желатина (Christensson et al., 1993; Darson et al., 1997, 1999).

Простат-специфический антиген с молекулярной массой 34 кДа представляет собой сериновую протеазу, продуцируемую эпителиальными клетками предстательной железы и секрецируемую в виде неактивного профермента (proPSA) в семенную жидкость (Lilja et al., 1987; Darson et al., 1997, 1999), где она может активироваться калликреин-родственной пептидазой 2 (hK2) и другими эндопептидазами простаты (Watt et al., 1986; Lilja et al., 1987; Christensson et al., 1993; Darson et al., 1997, 1999). PSA обладает ограниченной химотрипсиноподобной эндопротеолитической активностью,

расщепляя биологические субстраты, семеногелин 1 и 2 (Lilja et al., 1987; Darson et al., 1997, 1999) и фибронектин (Watt et al., 1986), а также ламинин и желатин (Watt et al., 1986). Известно, что PSA играет значимую роль в прогрессировании и метастазировании рака простаты, действуя как желатиназа и способствуя ремоделированию внеклеточного матрикса (Thompson et al., 2004; Duffy, 2006). Это указывает на его участие в процессах, которые способствуют инвазивности опухоли и образованию метастазов (Surasi et al., 2020).

Таким образом, мы идентифицировали в клетках рака предстательной железы матриксные металлопротеиназы: MMP-13, MMP-7 и PSA, используя метод желатиновой зимографии. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение влияния динитрозильных комплексов железа (доноров оксида азота, потенциальных противоопухолевых препаратов) на активность данных желатиназ и PSA, что может способствовать развитию новых подходов к диагностике и таргетной терапии рака простаты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует отметить, что матриксные металлопротеиназы являются многофункциональными протеазами, они участвуют в патогенезе различных патологических состояний, включая онкологические, сердечно-сосудистые и воспалительные заболевания.

Таким образом, наше исследование, использующее методы, такие как SDS-PAGE-электрофорез, не только расширяет наше знание о желатиназах, но также открывает перспективы для дальнейших исследований и клинического применения в области медицинской биологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность инженерам ФИЦ ПХФ и МХ РАН: Беспаловой О.О., Шкондиной Н.И., Никишиной Н.С. за техническую помощь в постановке экспериментов. В экспериментах использовали оборудование НОЦ МГОУ “Медицинская химия” в ФИЦ ПХФ и МХ РАН, г. Черноголовка.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Научная работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 124020500019-2 и Минздрава РФ № НИОКР 123021500068-8 NUYO-2023-0009 (2023–2025).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит исследования с участием человека и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воронкина И.В., Харисов А.М., Блинова М.И. и др.* Модель “воздушного пузыря” у мышей и изучение протеолитической активности раневого экссудата // Цитология. 2002. Т. 44 (3). С. 270–276.
- Печерина Т.Б., Барбараши О.Л.* Матриксные металлопротеиназы. Клиническая и прогностическая значимость у больных инфарктом миокарда // Фундам. и клин. медицина. 2019. Т. 4 (2). С. 84–94.
<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-2-84-94>
- Attard G., Parker C., Eeles R.A. et al.* Prostate cancer // Lancet. 2016. V. 387 (10013). P. 70–82.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61947-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61947-4)
- Bassiouni W., Ali M.A.M., Schulz R.* Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease // FEBS J. 2021. V. 288 (24). P. 7162–7182.
<https://doi.org/10.1111/febs.15701>
- Baldyucck M., Zerimech F., Gouyer V. et al.* Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells *in vitro* // Clin. Exp. Metastasis. 2000. V. 18 (2). P. 171–178.
<https://doi.org/10.1023/a:1006762425323>
- Bonaldi C.M., Azzalis L.A., Junqueira V.B. et al.* Plasma levels of E-cadherin and MMP-13 in prostate cancer patients: correlation with PSA, testosterone and pathological parameters // Tumori. 2015. V. 101 (2). P. 185–188.
<https://doi.org/10.5301/tj.5000237>
- Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Christensson A., Björk T., Nilsson O. et al.* Serum prostate specific antigen complexed to alpha 1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer // J. Urol. 1993. V. 150 (1). P. 100–105.
[https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)35408-3](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)35408-3)
- Darson M.F., Pacelli A., Roche P. et al.* Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker // Urology. 1997. V. 49 (6). P. 857–862.
[https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(97\)00108-8](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(97)00108-8)
- Darson M.F., Pacelli A., Roche P. et al.* Human kallikrein 2 expression in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases // Urology. 1999. V. 53 (5). P. 939–944.
[https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(98\)00637-2](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(98)00637-2)
- Decock J., Thirkettle S., Wagstaff L., Edwards D.R.* Matrix metalloproteinases: protective roles in cancer // J. Cell. Mol. Med. 2011. V. 15 (6). P. 1254–1265.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01302.x>
- Duffy M.J.* Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? // Clin. Chem. 2006. V. 52 (3). P. 345–351.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.059832>
- Ho H.Y., Chen M.K., Lin C.C. et al.* Epiberberine suppresses the metastasis of head and neck squamous cell carcinoma cells by regulating the MMP-13 and JNK pathway // J. Cell. Mol. Med. 2023. V. 27 (23). P. 3796–3804.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.17954>
- Kalantari E., Abolhasani M., Roudi R. et al.* Co-expression of TLR-9 and MMP-13 is associated with the degree of tumour differentiation in prostate cancer // Int. J. Exp. Pathol. 2019. V. 100 (2). P. 123–132.
<https://doi.org/10.1111/iep.12314>
- Kalluri R., Zeisberg M.* Fibroblasts in cancer // Nat. Rev. Cancer. 2006. V. 6 (5). P. 392–401.
<https://doi.org/10.1038/nrc1877>
- Knox J.D., Wolf C., McDaniel K. et al.* Matrilysin expression in human prostate carcinoma // Mol. Carcinogen. 1996. V. 15 (1). P. 57–63.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2744\(199601\)15:1<57::AID-MC8>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2744(199601)15:1<57::AID-MC8>3.0.CO;2-P)
- Kudo Y., Iizuka S., Yoshida M. et al.* Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) directly and indirectly promotes tumor angiogenesis // J. Biol. Chem. 2012. V. 287 (46). P. 38716–38728.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373159>
- Lindsey M.L., Escobar G.P., Mukherjee R. et al.* Matrix metalloproteinase-7 affects connexin-43 levels, electrical conduction, and survival after myocardial infarction // Circulation. 2006. V. 113 (25). P. 2919–2928.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.612960>
- Lilja H., Oldbring J., Rannevik G., Laurell C.B.* Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen // J. Clin. Invest. 1987. V. 80 (2). P. 281–285.
<https://doi.org/10.1172/JCI113070>
- Luukkaa M., Vihinen P., Krongqvist P. et al.* Association between high collagenase-3 expression levels and poor prognosis in patients with head and neck cancer // Head Neck. 2006. V. 28 (3). P. 225–234.
<https://doi.org/10.1002/hed.20322>
- Lynch C.C., Hikosaka A., Acuff H.B. et al.* MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL // Cancer Cell. 2005. V. 7 (5). P. 485–496.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.013>
- Morgia G., Falsaperla M., Malaponte G. et al.* Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer // Urol. Res. 2005. V. 33 (1). P. 44–50.
<https://doi.org/10.1007/s00240-004-0440-8>
- Mott J.D., Werb Z.* Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases // Curr. Opin. Cell Biol. 2004. V. 16 (5). P. 558–564.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.07.010>

- Nelson P.S., Clegg N., Arnold H. et al. The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium // PNAS USA. 2002. V. 99 (18). P. 11890–11895. <https://doi.org/10.1073/pnas.182376299>
- Oliver G.W., Stettler-Stevenson W.G., Kleiner D.E. Zymography, casein zymography, and reverse zymography: activity proteases and their inhibitors // Prot. Enzym. Tools Targets. 1999. P. 63–76.
- Piskór B.M., Przylipiak A., Dąbrowska E. et al. Matrilysins and stromelysins in pathogenesis and diagnostics of cancers // Cancer Manag. Res. 2020. V. 12. P. 10949–10964. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S235776>
- Piura B., Rabinovich A., Huleihel M. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in malignancies of the female genital tract // Harefuah. 2003. V. 142 (11). P. 786–791, 804.
- Salaün M., Peng J., Hensley H.H. et al. MMP-13 *in-vivo* molecular imaging reveals early expression in lung adenocarcinoma // PLoS One. 2015. V. 10 (7). P. e0132960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132960>
- Sharifi-Zahabi E., Hajizadeh-Sharafabad F., Abdollahzad H. et al. The effect of green tea on prostate specific antigen (PSA): A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // Complement. Ther. Med. 2021. V. 57. P. 102659. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102659>
- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2020 // CA: Cancer J. Clin. 2020. V. 70 (1). P. 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Stephan C., Rittenhouse H.G., Hu X.Y. et al. Prostate-specific antigen (PSA) screening and new biomarkers for prostate cancer (PCa) // EJIFCC. 2014. V. 25 (1). P. 55–78.
- Stettler-Stevenson W.G. The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis // Surg. Oncol. Clin. North Am. 2001. V. 10 (2). P. 383–392.
- Surasi D.S.S., Chapin B., Tang C. et al. Imaging and management of prostate cancer // Semin. Ultrasound. CT MR. 2020. V. 41 (2). P. 207–221. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2020.02.001>
- Szarvas T., Becker M., Vom Dorp F. et al. Elevated serum matrix metalloproteinase 7 levels predict poor prognosis after radical prostatectomy // Int. J. Cancer. 2011. V. 128 (6). P. 1486–1492. <https://doi.org/10.1002/ijc.25454>
- Szklarczyk A., Oyler G., McKay R. et al. Cleavage of neuronal synaptosomal-associated protein of 25 kDa by exogenous matrix metalloproteinase-7 // J. Neurochem. 2007. V. 102 (4). P. 1256–1263. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04625.x>
- Thompson I.M., Pauker D.K., Goodman P.J. et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level ≤ 4.0 ng per milliliter // N. Engl. J. Med. 2004. V. 350 (22). P. 2239–2246. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031918>
- Toth M., Sohail A., Fridman R. Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography // Meth. Mol. Biol. 2012. V. 878. P. 121–135. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-854-2_8
- Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and-9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers // Biochimie. 2005. V. 87 (3–4). P. 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.01.014>
- Vihinen P., Kähäri V.M. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets // Int. J. Cancer. 2002. V. 99 (2). P. 157–166. <https://doi.org/10.1002/ijc.10329>
- Wang S.W., Tai H.C., Tang C.H. et al. Melatonin impedes prostate cancer metastasis by suppressing MMP-13 expression // J. Cell Physiol. 2021. V. 236 (5). P. 3979–3990. <https://doi.org/10.1002/jcp.30150>
- Watt K.W., Lee P.J., M'Timkulu T. et al. Human prostate-specific antigen: Structural and functional similarity with serine proteases // PNAS USA. 1986. V. 83 (10). P. 3166–3170. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3166>

Identification of Gelatinases in Prostate Cancer Cells

N. P. Akentieva^a, *, A. R. Gizatullin^a, S. S. Shushanov^b

^a*Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russia*

^b*Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*

*e-mail: na_aken@icp.ac.ru

Prostate cancer remains one of the most common oncological diseases among men. Gelatinases, such as MMP-13 and MMP-7, play a key role in tumor invasion and metastasis. Prostate-specific antigen (PSA) and metalloproteinases are considered as potential biomarkers and targets for prostate cancer diagnosis and therapy. The study used gelatin zymography to assess gelatinase activity in the PC-3 prostate cancer cell line. The results showed the presence of protein bands corresponding to gelatinase activity in the size range of 20, 28 and 37 kDa, which coincides with the activity of MMP-13, MMP-7 and PSA in PC-3 cells. The results showed the presence of protein bands corresponding to the proteolytic activity of gelatinases in the size range of 20, 28 and 37 kDa, which coincides with the activity of MMP-13, MMP-7 and PSA. Thus, gelatinases MMP-13, MMP-7 and PSA were identified in prostate cancer cells, which can be used as markers of aggressiveness and progression of prostate cancer.

Keywords: gelatinases, zymography, proteolytic activity, prostate cancer