

Received: 2015.10.14
Accepted: 2016.09.15
Published: 2016.12.08

Metaloproteiny w raku krtani*

The matrix metalloproteinase in larynx cancer

Weronika Lucas Grzelczyk¹, Janusz Szemraj², Magdalena Józefowicz-Korczyńska¹

¹Katedra Otolaryngologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

²Zakładu Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Rak krtani to najczęstszy nowotwór złośliwy głowy i szyi. Mimo postępu w medycynie rokowanie u chorych na ten nowotwór w dalszym ciągu jest niezadowolające. W ostatnich latach duże zainteresowanie wzbudzają, odgrywające istotną rolę w procesie nowotworzenia, metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej – MMPs oraz ich tkankowe inhibitory – TIMPs, szczególnie MMP-2 i MMP-9. Wydaje się, że ich udział, spośród innych metaloproteinaz, w procesie powstawania i rozwoju raka krtani jest najbardziej znaczący. MMPs to grupa enzymów proteolitycznych zależnych od cynku i wapnia. Ich główną funkcją jest trawienie składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz błony podstawnej naczyń, ułatwiając wzrost guza, migrację komórek oraz inwazję nowotworu. Nasilają ponadto tworzenie przerzutów i angiogenezę wewnątrz guza. Zauważono wyraźną tendencję wzrostu poziomu ekspresji badanych metaloproteinaz i ich inhibitorów w raku krtani w stosunku do tkanek zdrowych. Stwierdzono, w ostatnio prowadzonych badaniach, że wzmożona ekspresja genu MMP-2 w tkance tego nowotworu koreluje ze stopniem zaawansowania klinicznego, stopniem zróżnicowania histopatologicznego, występowaniem przerzutów, występowaniem wznowy oraz z czasem przeżycia. Wielu autorów wykazało zwiększoną ekspresję MMP-2 jako potencjalnego markera inwazyjności guza oraz gorszego rokowania u pacjentów z rakiem krtani. Związki ekspresji genu MMP-9 z cechami kliniczno-patologicznymi raka krtani oraz czasem przeżycia chorych są niejednoznaczne, choć liczne prace wskazują na obecność takich zależności. Podobne korelacje daje się zauważyć w przypadku TIMPs, choć temat ten jest poruszany jedynie w nielicznych, dostępnych w piśmiennictwie artykułach.

Słowa kluczowe: rak krtani • metaloproteiny

Summary

One of the most common carcinoma occurring in the head and neck is laryngeal cancer. Despite the rapid scientific advances in medicine the prognosis for patients with such type of disease is not satisfying. In the last few years matrix metalloproteinases - MMPs and their tissue inhibitors – TIMPs, mostly MMP-2 and MMP-9, arouses a great interest, especially in the process of carcinogenesis. It seems that their impact in the formation and development of laryngeal cancer is significant. MMPs a group of zinc- and calcium- dependent endopeptidases play crucial role extracellular matrix collagen degradation. That are enzymes, that degrade and the basement membrane by facilitating tumor growth, cell migration and tumor invasion. They are implicated in metastasis and angiogenesis potentiate within the tumor. Clear tendency was observed towards the higher MMPs and TIMPs expression in larynx cancer than in the stroma. Recent studies show correlations between increased MMP-2 gene expression in the tumor tissue and clinical status, histopathological grading and metastases

* Praca wykonana w ramach grantu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, nr 503/2-036-02/503-21-002.

	occurrence. The similar MMP2 over expression dependence were found on tumor recurrence and survival. Many authors pointed out, significant higher MMP-2 expression as a potential marker of tumor invasiveness and worse prognosis in patients with larynx cancer. However, association of MMP 9 gene expression with laryngeal cancer clinicopathological features and survival of patients are ambiguous. Although, numerous researches show that this relationship does exist. Similar correlations could be found in TIMPs, but further studies are necessary because of small amount of literature.
Key words:	laryngeal cancer • matrix metalloproteinases
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1225952
Word count:	2849
Tables:	–
Figures:	–
References:	61

Adres autorki: prof. dr hab. n. med. Magdalena Józefowicz-Korczyńska, I Katedra Otolaryngologii UM w Łodzi, ul. Kopcińskiego 22, Łódź; e-mail: magdalena.jozefowicz-korczynska@umed.lodz.pl

Mimo rozwoju metod diagnostycznych i leczniczych, pięcioletnie przeżycia u chorych na raka krtani pozostają nadal niewielkie. Jest to jeden z najczęstszych nowotworów złośliwych głowy i szyi, rocznie na świecie stwierdza się około 600 000 nowych zachorowań [37]. W Polsce rak krtani jest siódmym pod względem częstości występowania nowotworem złośliwym u mężczyzn po raku płuca, gruczołu krokowego, jelita grubego, pęcherza moczowego, żołądka i nerki [26]. Stanowi 4% wszystkich nowotworów u mężczyzn i 0,5% u kobiet. Ryzyko zachorowania na raka krtani jest prawie 8-krotnie wyższe u mężczyzn niż u kobiet. Wzrasta wraz z wiekiem i osiąga najwyższe wskaźniki zachorowalności oraz umieralności między 45 a 69 rokiem życia. Szczyt zachorowań przypada na 6 i 7 dekadę życia. Zachorowalność u mężczyzn na nowotwory złośliwe krtani w grupach wiekowych jest podobna jak w populacji ogólnej. U mężczyzn w średnim i starszym wieku, do połowy lat 90 ub.w. następował wzrost zachorowalności, jednak obecnie obserwuje się jego spadek. U kobiet do początku XXI w. następował powolny wzrost zachorowalności, ale obecnie utrzymuje się na stałym poziomie [26]. W 2010 r. w Polsce częstość zachorowań oraz umieralność na nowotwory krtani była wyższa niż średnia dla krajów Unii Europejskiej zarówno u mężczyzn jak i kobiet [26]. Zgony z powodu raka krtani stanowią 2-3% wszystkich zgonów w Polsce dla obu płci [3]. Obserwuje się częstsze występowanie raka krtani w populacji miejskiej w stosunku do wiejskiej, a współczynnik miasto/wieś wynosi 1,32 dla mężczyzn oraz 1,67 dla kobiet [26].

Udowodniono, że zachorowanie na raka krtani uwarunkowane jest wieloma czynnikami. Palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, promieniowanie UV, niektóre substancje chemiczne, a zwłaszcza infekcje wirusowe, takie jak wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV, Human Papilloma Virus), szczególnie typem HPV 16 i 18, towarzyszą wzrostowi liczby przypadków raka głowy i szyi w tym raku krtani na świecie [17, 21, 22].

Wśród czynników ryzyka wystąpienia raka krtani nadal na pierwszym miejscu pozostaje palenie tytoniu, przy czym przewlekłe spożywanie alkoholu łącznie z paleniem tytoniu znacznie zwiększa to ryzyko o około 330 razy [16, 45, 54]. Najczęstszym typem histologicznym nowotworu złośliwego krtani jest rak płaskonabłonkowy (ponad 95% nowotworów krtani). Pozostałe 5% to najczęściej gruczolakorak i rak brodawkowy (*adenocarcinoma, carcinoma verrucosum*) [20]. Najczęstszą lokalizacją raka krtani jest głośnia (ponad 45%) i okolica z piętra nadgłośniowego (około 40%), a najrzadsze umiejscowienie to okolica podgłośniowa (2,3%) [45]. W ostatnich 50 latach zaobserwowano trwałą tendencję do zmiany umiejscowienia pierwotnej raka krtani. Stopniowo wzrasta liczba nowotworów wywodzących się z piętra nadgłośniowego, a spada - mimo dominacji - liczba na głośni [43]. W Polsce, w chwili rozpoznania ponad 60% przypadków raka krtani to guzy o zaawansowaniu klinicznym T3 i T4 według klasyfikacji TNM. U ponad 45% chorych stwierdza się przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych. Analiza epidemiologiczna raka krtani i gardła dolnego przeprowadzona przez Bienia i wsp. [3] wykazała, że u około 2% chorych są obecne przerzuty odległe. Rokowanie u pacjentów z rakiem krtani jest ściśle związane z wielkością guza, umiejscowieniem, stopniem złośliwości histologicznej, wiekiem pacjenta oraz z obecnością przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych szyi. Wystąpienie przerzutów odległych powoduje, że przeżycie pacjentów spada do 50% [48].

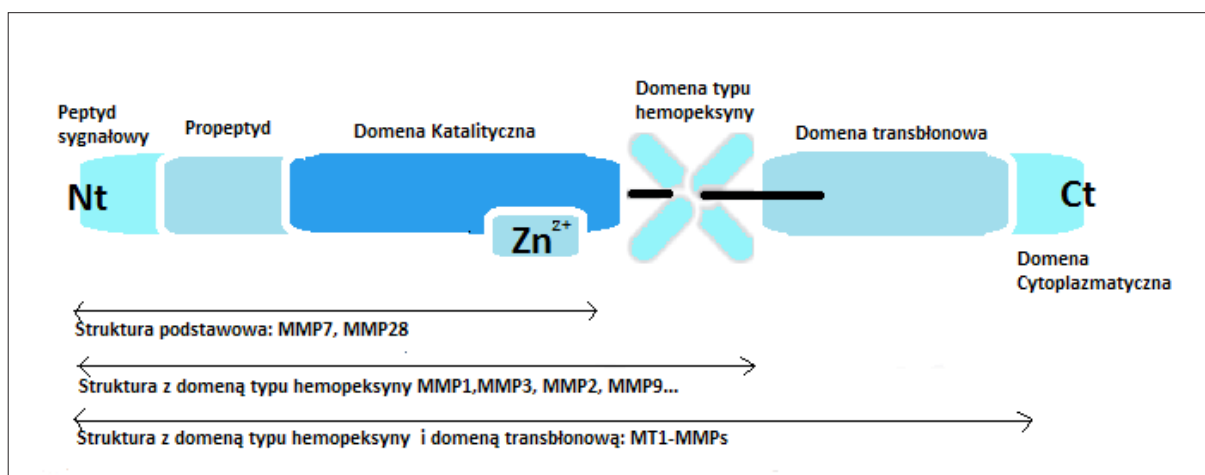
Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) to grupa enzymów proteolitycznych zależnych od cynku i wapnia. Ich główną funkcją jest trawienie składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) (extracellular matrix), takich jak: składniki błon podstawnych, kolagen typu IV, laminina, elastyna, fibronektyna, entakyna, proteoglikany oraz liczne białka, które nie są jej typowymi składnikami [30, 50, 56]. Metaloproteiny odpowiadają za

ciągły proces przebudowy struktury macierzy zewnątrzkomórkowej i za jej prawidłowy skład [25]. Enzymy te zostały wykryte w 1962 r., pierwsza poznana metaloproteina, kolagenaza 1 (MMP-1), opisana była u płazów [15]. Obecnie wykrytych zostało 28 metaloproteinaz, w tym 22 z nich u człowieka [14].

Wyodrębniono cztery duże grupy metaloproteinaz występujących w świecie zwierząt oraz u ludzi są to: serralizyny, astacyny, reprotolizyny (inaczej adamalizyny lub dezintegryny) oraz matriksyny (metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej) [51]. Metaloproteiny występujące u ludzi zostały podzielone na pięć podgrup, ze względu na budowę domen oraz typy trawionych przez nie substratów są to: matrylizyny, kolagenazy, żelatynazy, stromelizyny, metaloproteiny błonowe oraz metaloproteiny gdzie indziej niesklasyfikowane. Do dodatkowo stworzonej podgrupy szóstej zalicza się wszystkie pozostałe MMPs nieuwzględnione w pięciu głównych podgrupach [31,56]. U człowieka metaloproteiny kodują różne geny zlokalizowane na chromosomach 11 i 16 [12]. Metaloproteiny mają wiele wspólnych cech dotyczących zarówno pełnionej funkcji jak i struktury. W budowie MMPs występuje: propeptyd i stanowiący jego część peptyd sygnałowy, który kieruje MMPs do miejsca docelowego. Wszystkie MMPs zawierają również domenę katalityczną [31,56]. Powstają jako nieczynny zymogen, którego aktywacja jest niezbędna do powstania czynnej postaci enzymu. Metaloproteiny o najprostszej strukturze (MMP-7, MMP-28) są zbudowane tylko z wymienionych wcześniej elementów, pozostałe zawierają dodatkowo domenę, która jest zakończoną grupą karboksylową zbliżoną w budowie do hemopeksyny (globuliny wiążącej hem i jego pochodne). Funkcją liczącej około 210 aminokwasów domeny jest wiązanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz udział w mechanizmie aktywacji i inhibicji metaloproteinazy [53].

Oprócz omówionej budowy ogólnej, każda z podgrup metaloproteinaz ma również elementy tylko dla niej charakterystyczne. Metaloproteiny błonowe mają dodatkowo domenę przezbłonową, która kotwiczy je w błonie

komórkowej. Żelatynazy (MMP-2 i -9) zawierają w domenie katalitycznej trzy powtórzone sekwencje, które wiążą żelatynę. Natomiast w strukturze metaloproteinaz typu błonowego, a także stromelizyny obecna jest sekwencja rozpoznawana przez furyny, która umożliwia ich aktywację niezależną od innych enzymów z tej kategorii [44]. Metaloproteiny odgrywają istotną rolę w różnych procesach fizjologicznych, natomiast procesy zapalne i nowotworowe przebiegają z podwyższoną aktywnością MMPs [10,18,42]. O tym jak bardzo istotna jest ich rola świadczy to, że geny metaloproteinaz podlegają ekspresji w niemal wszystkich komórkach, typu stacjonarnego, tj. makrofagach, fibroblastach, keratynocytach, komórkach dendrytycznych Langerhansa, miocytach, komórkach endotelialnych, komórkach mikrogleju czy neuronach, jak i w komórkach występujących w nacieku zapalnym, tj. leukocytach, monocytach i limfocytach T [10]. Poziom aktywności systemu metaloproteinaz w danej tkance jest ściśle regulowany. Wysoki występujący w wielu jednostkach chorobowych powoduje nadmierną proteolizę białek macierzy zewnątrzkomórkowej, natomiast niski hamuje degradację białek ECM, co prowadzi do procesu włóknienia [11]. Kontrola aktywności metaloproteinaz odbywa się na dwóch głównych poziomach, transkrypcji genu (MMPs indukcyjne) oraz poziomie potranskrypcyjnym (MMPs konstytutywne). Transkrypcja genów MMPs jest zmieniana przez regulujące ten poziom aktywności liczne cytokiny i czynniki wzrostu. Natomiast potranskrypcyjna regulacja aktywności MMPs odbywa się pod wpływem kilku mechanizmów, takich jak: stabilizacja mRNA, modyfikacja potranslacyjna, regulacja sekrecji enzymu, aktywacja proteolityczna proenzymu (zymogenu), inhibicja aktywnego enzymu (rola endogennych inhibitorów metaloproteinaz TIMP) i wreszcie przez katabolizm enzymów, czyli degradację MMPs. Mechanizm związany ze stabilnością mRNA może wydłużać okres półtrwania mRNA – takim czynnikiem wydłużającym okres półtrwania jest np. TGF-beta1 (transforming growth factor beta 1). Ważny mechanizm regulacji aktywności MMPs przez kontrolę aktywacji proteolitycznej wynika z tego, że niemal wszystkie metaloproteiny powstają w postaci zymogenu, do zaktywowania którego jest konieczne odcięcie prodomeny.



Ryc. 1. Schemat budowy metaloproteinaz

Wydaje się, że MMPs syntetyzowane w komórkach, jako wydzielnicze lub błonowe proenzymy (zymogeny) są aktywowane przez usunięcie propeptydu z N-końca cząsteczki, przez odpowiednie osoczowe lub tkankowe proteazy. Usunięty propeptyd utrzymywał enzym w postaci nieaktywnej (latencji) przez interakcję z aktywnym miejscem metaloproteiny [57]. Taka aktywacja może wystąpić zewnątrzkomórkowo w macierzy pozakomórkowej lub w środowisku wewnątrzkomórkowym. Jednak większość enzymów proteolitycznych jest aktywowana na zewnątrz komórki.

Podsumowując, zmiany aktywności układu metaloproteinaz zachodzą pod wpływem swoistych aktywatorów oraz inhibitorów (cytokin, hormonów, czynników wzrostu) działających na poziomie m.in.: ekspresji genów, stabilizacji mRNA, aktywacji pro-MMP, a także przez udział swoistych i nieswoistych inhibitorów zaktywowanych metaloproteinaz. Udowodniono, że niskie pH oraz podwyższona temperatura także prowadzą do aktywacji MMPs [31]. Należy podkreślić szczególną rolę jaką w regulacji ekspresji metaloproteinaz odgrywają specyficzne tkankowe i nieswoiste osoczowe inhibitory MMPs. I tak poziom aktywności MMPs w tkankach jest kontrolowany przez cztery tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP-1 do TIMP-4), które są zdolne do hamowania aktywności metaloproteinaz ze wszystkich podgrup. Inhibitory te działają poprzez dwa mechanizmy:

- hamowanie aktywacji proenzymu,
- inaktywacja enzymu już aktywnego przez utworzenie kompleksu TIMP-MMP.

Natomiast głównymi nieswoistymi osoczowymi inhibitorami MMPs są alfa2-makroglobulina, alfa1-antyproteaza oraz inne nieswoiste proteazy [30].

Liczne badania nad procesami nowotworowymi w ciągu ostatnich 20 lat wykazały, że metaloproteiny macierzy odgrywają kluczową rolę w skomplikowanym mechanizmie progresji nowotworu [60]. Za główny etap w rozwoju wielu raków nabłonkowych uważa się niszczenie błony podstawnej i naciekanie leżącej poniżej tkanki łącznej przez komórki nowotworowe. Dzięki inwazji do podścieliska jest możliwy wzrost guza, naciekanie miększu, ścian narządów, a także przyległych struktur organizmu. W tym okresie nowotwór przekracza błonę podstawną naczyń krwionośnych, co umożliwia powstawanie odległych przerzutów [19,30]. Uważa się, że niszczenie tych barier przyspieszają enzymy proteolityczne, głównie metaloproteiny, uwalniane przez guzy nowotworowe, a także ich zmienione inhibitory. W procesach inwazji guza nowotworowego udział bierze wiele różnych proteaz w tym katepsyny, urokinaza oraz metaloproteiny macierzy pozakomórkowej [9]. W nowotworach piersi, nerki, stercza, płuc, jelita grubego udowodniono zależność między ekspresją genów na poziomie białka metaloproteinaz i ich inhibitorów a określonymi cechami guzów, w tym przede wszystkim stopniem zaawansowania klinicznego i zróżnicowania histopatologicznego, występowaniem przerzutów, wznowy oraz czasem przeżycia. Wielokrotnie podejmowano również próby określenia wartości prognostycznej ekspresji wymienionych enzymów

u pacjentów z chorobą nowotworową. Wydaje się bardzo możliwe, że podobne zależności mogą występować w raku krtani tak, jak przedstawiają to opisane niżej badania.

ROLA METALOPROTEINAZ I ICH TKANKOWYCH INHIBITORÓW U CHORYCH NA RAKA KRTANI

Udowodniono, że procesy wzrostu oraz inwazji guza nowotworowego wiążą się z zaburzeniem równowagi między czynnikami, które wpływają na degradację i tymi, które warunkują podtrzymanie fizjologicznych procesów okolicznych tkanek. Za degradację macierzy pozakomórkowej odpowiadają enzymy proteolityczne, w tym metaloproteiny, których rola zasługuje na szczególną uwagę. W licznych badaniach wykazano, że metaloproteiny występują w większych ilościach w tkankach nowotworowych niż w prawidłowych [1,6,49]. Ponadto zauważono, że ich ekspresja jest wyższa w guzach złośliwych, zwłaszcza na inwazyjnym froncie guza w porównaniu z nowotworami niezłośliwymi [2,40,49].

W raku krtani najwięcej artykułów dotyczy badań nad ekspresją genów metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9. Mniej uwagi poświęcano matryksynom MMP-1, MMP-13, MMP-7, MMP-10, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16 oraz MMP-20 [13,23,28,62]. Tylko w nielicznych pracach natomiast oceniano ekspresję genów pozostałych metaloproteinaz np. MMP-11, MMP-12 [8,24,33,52]. Najczęściej oceniane MMP-2 oraz MMP-9 to enzymy odpowiadające za degradację w pierwszej kolejności kolagenu IV – głównego budulca struktury błon podstawnych [41]. Przez rozkładanie błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej są czynnikami mającymi zasadnicze znaczenie w procesie inwazji guza. Pojedyncze prace dotyczące tkankowych inhibitorów metaloproteinaz w raku krtani omawiały ekspresję genów TIMP-1 oraz TIMP-2. Ekspresję genów metaloproteinaz oraz tkankowych inhibitorów metaloproteinaz w raku krtani oceniano z wykorzystaniem głównie dwóch metod laboratoryjnych. Dominującą techniką było immunohistochemiczne barwienie wykorzystujące przeciwciała przeciwko wybranym MMPs i TIMPs [4,34,38,55,59,62]. W metodzie tej porównywano intensywność zabarwienia oraz liczbę komórek nowotworowych, które uległy zabarwieniu w preparacie raka krtani w stosunku do nieobjętej procesem nowotworowym otaczającej tkanki, jako kontrola u tego samego pacjenta. Druga technika to odwrotna transkrypcja RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) oceniająca ekspresję genów MMP i TIMP na poziomie mRNA [13,23,34,38,55,59,62]. Udowodniono, że metaloproteinazami wykazującymi większą ekspresję w nowotworowo zmienionej tkance krtani są: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-14, MMP-15, MMP-16, przy czym najwięcej artykułów dotyczyło ekspresji MMP-2 i MMP-9 [4,23,32,38,55,59,62]. Wyniki badań Zhanga i wsp. [62] wykazały, że zarówno ekspresja genu na poziomie mRNA, jak i białka MMP-14, -15 i -16 były zwiększone w tkance raków nadgłośniających w porównaniu do ekspresji otaczających tkanek nienowotworowych. Zaobserwowano ponadto istotnie statystycznie zmienioną ekspresję genu MMP-14 zarówno na poziomie białka, jak i mRNA w tkankach raków

nadgłośniowych w stadium T3 lub z przerzutami do węzłów chłonnych szyi w porównaniu z tkankami raków nadgłośniowych w stadiach T1-2 lub bez przerzutów. Tak więc ekspresja genu MMP-14 na poziomie mRNA oraz białka była wyższa w guzach u pacjentów w stadiach zaawansowania klinicznego III-IV niż w stadiach I-II. Wykazano, że wysoki poziom ekspresji genu MMP-14 na etapie białka wiązał się z gorszym rokowaniem pacjentów.

Minqiang Xie i wsp. [59] porównali ekspresję genów MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-9 i MMP-10 na etapie transkrypcji i translacji w raku krtani. Stwierdzili, że ekspresja genu na poziomie mRNA oraz białek dla trzech metaloproteinaz MMP-2, MMP-7 i MMP-9 w tkance raka krtani była zwiększona w porównaniu z tkanką zdrową, w ponad 63% przypadków. Podwyższona ekspresja tych metaloproteinaz istotnie korelowała z powstawaniem przerzutów do węzłów chłonnych szyi. Autorzy sugerują, że określanie ekspresji metaloproteinaz może być przydatne do prognozowania wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych, jednak zastrzegają, że do potwierdzenia tej hipotezy jest niezbędna większa liczba badań. Podobnie Tang i wsp. [55] zaobserwowali, że poziom mRNA oraz stężenie białek metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w raku krtani był znacząco wyższy niż w zdrowych tkankach. Wysoki poziom ekspresji białek MMP-2 oraz MMP-9 był ściśle związany z wielkością guza pierwotnego, stopniem zaawansowania klinicznego, a także z przerzutowaniem do węzłów chłonnych. Ogólny wskaźnik przeżycia był również niższy u pacjentów z podwyższoną ekspresją genu MMP-9. Autorzy wnioskują, że metaloproteinazy MMP-2 oraz MMP-9 odgrywają rolę w inwazji guza oraz przerzutowaniu.

Liu i wsp [32] przeprowadzili metaanalizę, która potwierdziła tezę o występowaniu znacznie zwiększonego stężenia białka MMP-2 w raku krtani. Przeszukali dostępne bazy danych różnych krajów i przeanalizowali 86 prac (48 w języku angielskim i 38 chińskich). Do metaanalizy włączono 7 prac spełniających wszystkie założone kryteria. Analiza dotyczyła 529 pacjentów. Wykazano, że ekspresja genu MMP-2 na poziomie białka była wyższa w wysoko zróżnicowanych rakach krtani w porównaniu do tych

o średnim oraz niskim zróżnicowaniu. Potwierdzono znacznie podwyższone stężenie białka MMP-2 w rakach krtani z przerzutami do węzłów chłonnych w porównaniu z rakami krtani, w których przerzuty do węzłów chłonnych były nieobecne. Autorzy podkreślają, że wysoka ekspresja genu na poziomie białka MMP-2 może odgrywać ważną rolę w powstawaniu, rozwoju oraz w rokowaniu raka krtani.

Gorogh i wsp. [13] oceniali ekspresję genów metaloproteinaz MMP-1, MMP-2, MMP-9 i MMP-10 w płaskonabłonkowym raku krtani i wykazali korelację między ekspresją genu MMP-2 zarówno na poziomie białka, jak i mRNA w raku krtani a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Nie wykazali natomiast korelacji między ekspresją MMP-1, MMP-9 i MMP-10 a wielkością guza i obecnością przerzutów. Badacze sugerują, że ekspresja genu MMP-2 zwiększa zdolność do tworzenia przerzutów raka płaskonabłonkowego krtani.

Kręcicki i wsp. [27] oceniali stężenie białka MMP-2 w nowotworach krtani, nie stwierdzili korelacji między ekspresją genu na poziomie białka MMP-2, a parametrami kliniczno-patologicznymi nowotworu, natomiast korelacja stężenia białka MMP-2 oraz obecności przerzutów w węzłach była na pograniczu błędu statystycznego.

Liu i wsp. [34] nie stwierdzili istotnego związku między ekspresją metaloproteinaz MMP-2 oraz MMP-9 a cechami kliniczno-patologicznymi u chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani. Wykazano natomiast znaczącą różnicę w 5-letnich całkowitych przeżyciach między pacjentami z pozytywną i negatywną ekspresją genu MMP-2, gdzie znacząco niższy wskaźnik przeżycia występował w grupie ze zwiększoną ekspresją MMP-2. W badaniu dotyczącym MMP-2 w raku głośni opublikowanym przez Mallisa i wsp. [39] podano podobne wyniki wskazując na różnicę w całkowitych 5-letnich przeżyciach wśród pacjentów z pozytywną i negatywną ekspresją genu MMP-2. Stwierdzono obniżone wskaźniki przeżycia w pozytywnej ekspresji MMP-2, ale nie wykazało związku ekspresji genu MMP-2 z kliniczno-patologicznymi cechami guza. Jednak w obu przytoczonych wyżej pracach autorzy zauwa-

Tabela 1. Ekspresja genów kodujących metaloproteinazy i ich inhibitory w LSCC

Ekspresja MMP lub TIMP w LSCC										
MMP	Krótszy czas przeżycia		Większy rozmiar guza nowotworowego		Większa skłonność do tworzenia przerzutów do węzłów chłonnych		Większa skłonność do tworzenia przerzutów odległych		Wyższy stopień zaawansowania choroby	
	korelacja	Brak korelacji	Korelacja	Brak korelacji	Korelacja	Brak korelacji	Korelacja	Brak korelacji	Korelacja	Brak korelacji
MMP-2	[7,39]		[32]	[27]	[13,32,55,59]	[27]			[4,55]	
MMP-9	[5,55]		[5,46,55]	[13,34,58]	[5,46,55]	[13,34,58]	[5,46]	[13]	[4,5,46]	[34]

żają, że ekspresja genu MMP-2 może być potencjalnym markerem gorszego rokowania. Wyniki badań oceniających zależności między ekspresją genów metaloproteinaz (głównie MMP-2 i MMP-9), a cechami kliniczno-patologicznymi raka krtani, takimi jak: wielkość guza, przerzuty do węzłów chłonnych, stopnie zaawansowania nowotworu czy czas przeżycia, są niejednoznaczne. Wiele wyników dotyczących analiz oceny ekspresji genów metaloproteinaz, przede wszystkim MMP-2 i MMP-9, jest niepewnych i niejednoznacznych. Może to wynikać ze zróżnicowania doboru badanego materiału, zbyt małej liczby ocenianych, innego umiejscowienia nowotworu, stadium zaawansowania choroby, zastosowania odmiennych metod laboratoryjnych i różnic w ocenie statystycznej.

Badania dotyczące zależności między ekspresją genów tkankowych inhibitorów MMP (głównie TIMP-1 i TIMP-2), a cechami kliniczno-patologicznymi raka krtani są nieliczne. Warto podkreślić, iż mimo że Wittekindt i wsp. [58] stwierdzili brak korelacji między zwiększoną ekspresją genu MMP-9, a wzrostem guza, przerzutami do węzłów oraz wznową, to zaobserwowali zależność między pozytywną ekspresją genu MMP-9, a stopniem zróżnicowania nowotworu. Pozytywna ekspresja genu MMP-9 była częściej obecna w rakach krtani o średnim oraz niskim stopniu zróżnicowania. Christopoulos i wsp. [4] oceniając ekspresję MMP-9 zaobserwowali, że zwiększona ekspresja genu MMP-9 wzrasta wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania nowotworu. W tkankowych inhibitorach metaloproteinaz opisywano wzrost poziomu ekspresji genów TIMP-1 i TIMP-2 następujący wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania nowotworu krtani [4,23]. Gorogh i wsp. [13] sugerują, że zwiększona ekspresja genów TIMP-1 i TIMP-2 upośledza rozwój procesu nowotworowego w raku płaskonabłonkowym krtani. Wykazali ujemną korelację zachodzącą między ekspresją TIMP-1 i TIMP-2, a powstawaniem przerzutów do węzłów chłonnych oraz ujemną korelację między eks-

presją TIMP-2, a wielkością guza. Analizy przeżywalności nie wykazały istotnej różnicy pomiędzy czasem przeżycia u chorych w grupach o wysokiej i niskiej ekspresji genu TIMP-2.

PODSUMOWANIE

Wyniki wielu badań dowodzą, że wszystkie geny MMP oraz TIMP wykazują ekspresję w zdrowej tkance krtani. Przy czym nie budzi wątpliwości to, że komórki nowotworowe wykazują podwyższoną ekspresję genów MMP w stosunku do komórek zdrowych. O raku krtani najwięcej artykułów dotyczy badań nad ekspresją metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9. Istnieją rozbieżności wyników oceniających związek ekspresji ich genu z cechami kliniczno-patologicznymi guza, co może wynikać z odmiennego doboru badanego materiału, liczebności próby, metod badawczych czy oceny statystycznej.

Warto podkreślić, że wykryto pewne powiązania. Wzmocniona ekspresja genu MMP-2 w raku krtani koreluje ze stopniem zaawansowania klinicznego, stopniem zróżnicowania histopatologicznego, występowaniem przerzutów, wznowy oraz z czasem przeżycia. O związku ekspresji genu metaloproteinazy 9 z cechami kliniczno-patologicznymi raka krtani oraz czasem przeżycia chorych wnioski wynikające z badań są niejednoznaczne, choć liczne prace wskazują na istnienie takich zależności. Wielu autorów wykazało zwiększoną ekspresję genu MMP-2 jako potencjalnego markera inwazyjności guza oraz gorszego rokowania u pacjentów z rakiem krtani. Podkreślają, że mimo iż na obecnym etapie wyniki różnych badań są niejednoznaczne, to można je uznać za zachęcające do dalszych prac na większym materiale z wykorzystaniem standaryzowanych metod badawczych [4,7,13,32,39,55,59]. Dotyczy to również tkankowych inhibitorów metaloproteinaz, chociażby ze względu na nieliczne artykuły dostępne w piśmiennictwie na ten temat.

PIŚMIENICTWO

- [1] Bachmeier B.E., Iancu C.M., Jochum M., Nerlich A.G.: Matrix metalloproteinases in cancer: comparison of known and novel aspects of their inhibition as a therapeutic approach. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2005; 5: 149-163
- [2] Baker E.A., Bergin F.G., Leaper D.J.: Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br. J. Surg.*, 2000; 87: 1215-1221
- [3] Bień S.: Epidemiologia i klasyfikacja raka krtani. *Pol. Merk. Lek.*, 2005; 19: 464-466
- [4] Christopoulos T.A., Papageorgakopoulou N., Ravazoula P., Mastroiannis N.S., Papadas T.A., Theocharis D.A., Vynios D.H.: Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in squamous cell laryngeal carcinoma. *Oncol. Rep.*, 2007; 18: 855-860
- [5] Colović Z., Pesutić-Pisac V., Poljak N.K., Racić G., Cikojević D., Kantić M.: Expression of matrix metalloproteinase-9 in patients with squamous cell carcinoma of the larynx. *Coll. Antropol.*, 2013; 37: 151-155
- [6] Danilewicz M., Sikorska B., Wagrowska-Danilewicz M.: Prognostic significance of the immunoexpression of matrix metalloproteinase MMP2 and its inhibitor TIMP2 in laryngeal cancer. *Med. Sci. Monit.*, 2003; 9: MT42-MT47
- [7] Duan S., Guo Y.: Expression and clinical significance of stromelysin-3 in laryngeal cancer. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2008; 22: 104-107
- [8] Duffy M.J.: The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis*, 1992; 10: 145-155
- [9] Dzikowska-Bartkowiak B., Waszczykowska E., Żebrowska A.: Udział metaloproteinaz i ich inhibitorów w patomechanizmie wybranych chorób skóry. *Alergia Astma Immunol.*, 2004; 9: 71-79
- [10] Fini M.E., Parks W.C., Rinehart W.B., Girard M.T., Matsubara M., Cook J.R., West-Mays J.A., Sadow P.M., Burgeson R.E., Jeffrey J.J., Raizman M.B., Krueger R.R., Zieske J.D.: Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury. *Am. J. Pathol.* 1996; 149: 1287-1302
- [11] Gacko M.: Metaloproteiny macierzy międzykomórkowej (MMPs). *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 1997; 51: 577-589

- [12] Görögh T, Beier U.H., Bäumken J., Meyer J.E., Hoffmann M., Gottschlich S., Maune S.: Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*, 2006; 28: 31-39
- [13] Groblewska M., Tycińska A., Mroczko B., Musiał W., Szmikowski M.: Metalloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej w chorobach układu krążenia. *Pol. Merkur. Lekarski*, 2011; 30: 235-240
- [14] Gross J., Lapiere C.M.: Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1962; 48: 1014-1022
- [15] Hashibe M., Boffetta P., Zaridze D., Shagina O., Szeszenia-Dabrowska N., Mates D., Fabiánová E., Rudnai P., Brennan P.: Contribution of tobacco and alcohol to the high rates of squamous cell carcinoma of the supraglottis and glottis in Central Europe. *Am. J. Epidemiol.*, 2007; 165: 814-820
- [16] Iqbal A., Warrach R., Udeabor S.E., Rana M., Eckardt A.M., Gellrich N.C., Rana M.: Role of human papillomavirus infection and other factors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Dis.*, 2014; 20: 288-293
- [17] Itoh T., Matsuda H., Tanioka M., Kuwabara K., Itoharu S., Suzuki R.: The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J. Immunol.*, 2002; 169: 2643-2647
- [18] Itoh T., Tanioka M., Yoshida H., Yoshioka T., Nishimoto H., Itoharu S.: Reduced angiogenesis and tumour progression in a gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res.*, 1998; 58: 1048-1051
- [19] Jassem J., Kawecki A., Krajewski R., Krzakowski M.: Nowotwory nabłonkowe narządów głowy i szyi. Zalecenia diagnostyczno-terapeutyczne Polskiej Unii Onkologii. Nowotwory, 2003; 53: 552-569
- [20] Józefowicz-Korczyńska M., Mazerant M., Morshed K., Olejniczak I., Bojanowska-Poźniak K.: Wstępna ocena zależności pomiędzy zakażeniem HPV a wybranymi cechami nowotworu u chorych na raka krtani. *Otarynolaryngologia – przegląd kliniczny*. 2014; 13: 155-162
- [21] Jurkiewicz D., Dżaman K., Rapiejko P.: Czynniki ryzyka raka krtani. *Pol. Merkur. Lekarski*, 2006; 21: 94-98
- [22] Kapral M., Strzałka-Mrozik B., Paluch J., Kowalczyk M., Jurzak M., Węglarz L.: Evaluation of gene expression of selected matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in laryngeal cancer. *Farm. Przegł. Nauk.*, 2010; 10: 41-46
- [23] Kim J.M., Kim H.J., Koo B.S., Rha K.S., Yoon Y.H.: Expression of matrix metalloproteinase-12 is correlated with extracapsular spread of tumor from nodes with metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2013; 270: 1137-1142
- [24] Kotulska-Wolwender K., Larysz-Brysz M., Fus Z., Korczyńska I., Górka D., Lewin-Kowalik J.: Metalloproteinazy macierzy pozakomórkowej- perspektywy ich wykorzystania w medycynie. *Wiad. Lek.*, 2002; 55: 463-471
- [25] Krajowy Rejestr Nowotworów 2010; <http://onkologia.org.pl/>
- [26] Kręcicki T., Fraczek M., Jelen M., Podhorska M., Szkudlarek T., Zatonski T.: Expression of collagenase-1 (MMP-1), collagenase-3 (MMP-13) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in laryngeal squamous cell carcinomas. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2003; 260: 494-497
- [27] Kręcicki T., Zalesska-Krecicka M., Jelen M., Szkudlarek T., Horobowska M.: Expression of type IV collagen and matrix metalloproteinase-2 (type IV collagenase) in relation to nodal status in laryngeal cancer. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.*, 2001; 26: 469-472
- [28] Kubben F.J., Sier C.F., van Duijn W., Griffioen G., Hanemaaijer R., van de Velde C.J., van Krieken J.H., Lamers C.B., Verspaget H.W.: Matrix metalloproteinase-2 is a consistent prognostic factor in gastric cancer. *Br. J. Cancer*, 2006; 94: 1035-1040
- [29] Kwiatkowski P., Godlewski J., Śliwińska-Jewsiewicka A., Kmieć Z.: Rola metalloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w procesie inwazji nowotworu. *Pol. Ann. Med.*, 2008; 15: 43-50
- [30] Lipka D., Boratyński J.: Metalloproteinazy MMP. Struktura i funkcja. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 328-336
- [31] Liu R.R., Li M.D., Li T., Tan Y., Zhang M., Chen J.C.: Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) protein expression and laryngeal cancer prognosis: a metaanalysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015; 8: 2261-2266
- [32] Liu W., Xiang C., Jia S.: Study on the expression of matrix metalloproteinase-12 and NM_002426 in squamous laryngeal carcinoma. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, 2006; 20: 1120-1123
- [33] Liu W.W., Zeng Z.Y., Wu Q.L., Hou J.H., Chen Y.Y.: Overexpression of MMP-2 in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2005; 132: 395-400
- [34] Liu Y., Li Y., Liu Z., Zhang L., Anniko M., Duan M.: Prognostic significance of matrix metalloproteinase-20 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol.*, 2011; 131: 769-773
- [35] Łapka A., Drąg J., Goździalska A., Jaśkiewicz J.: Metalloproteinazy macierzy pozakomórkowej w glejakach. *Postępy Psychiatrii i Neurologii*, 2008; 17: 207-211
- [36] Machiels J.P., Lambrecht M., Hanin F.X., Duprez T., Gregoire V., Schmitz S., Hamoir M.: Advances in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck. *F1000Prime Rep.*, 2014; 6: 44
- [37] Magary S.P., Ryan M.W., Tarnuzzer R.W., Kornberg L.: Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma: a quantitative analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 2000; 122: 712-716
- [38] Mallis A., Teymoortash A., Mastronikolis N.S., Werner J.A., Papadas T.A.: MMP-2 expression in 102 patients with glottic laryngeal cancer. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2012; 269: 639-642
- [39] Murray G.I., Duncan M.E., O'Neil P., McKay J., Melvin W.T., Fothergill J.E.: Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. *J. Pathol.*, 1998; 185: 256-261
- [40] Nelson A.R., Fingleton B., Rothenberg M.L., Matrisian L.M.: Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol.*, 2000; 18: 1135-1149
- [41] Nissinen L., Kähäri V.M.: Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014; 1840: 2571-2580
- [42] Nowak K., Szyfter W.: Nowotwory krtani. W: Szyfter W., red. Nowotwory w Otolaryngologii. Poznań: Termedia, 2012: 275-329
- [43] O-charoenrat P., Rhys-Evans P.H., Eccles S.A.: Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2001; 127: 813-820
- [44] Osuch-Wójcikiewicz E.: Rak krtani i gardła dolnego. W: Janczewski G. (red.), *Otarynolaryngologia Praktyczna*. Via Medica; Gdańsk: 2007: 507-517
- [45] Papadas T.A., Naxakis S.S., Mastronikolis N.S., Stathas T., Karabekos N.C., Tsiambas E.: Determination of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) protein expression in laryngeal squamous cell carcinomas based on digital image analysis. *J. BUON*, 2013; 18: 977-981
- [46] Peschos D., Damala C., Stefanou D., Tsanou E., Assimakopoulos D., Vougiouklakis T., Charalabopoulos K., Agnantis N.J.: Expression of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) in benign, premalignant and malignant laryngeal lesions. *Histol. Histopathol.*, 2006; 21: 603-608
- [47] Rosenthal E.L., Matrisian L.M.: Matrix metalloproteinases in head and neck cancers. *Head Neck*, 2006; 28: 639-648
- [48] Samantaray S., Sharma R., Chattopadhyaya T.K., Datta Gupta S., Ralhan R.: Increased expression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2004; 130: 37-44
- [49] Shields S.E., Ogilvie D.J., McKinnell R.G., Tarin D.: Degradation of basement membrane collagens by metalloproteinases released by human, murine and amphibian tumours. *J. Pathol.*, 1984; 143: 193-197

- [50] Stocker W., Grams F., Baumann U., Reinemer P., Gomis-Ruth F.X., McKay D.B., Bode W.: The metzincins – topological and sequential relations between the astacins, adamalysins and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.*, 1995; 4: 823-840
- [51] Suarez-Alvarez B., Garcia Suarez M.M., Argüelles M.E., Sampedro A., Alvarez Marcos C., Mira E., Van den Brul F.A., Liu F.T., Chowdhury P.S., de los Toyos J.R.: Circulating IgG response to stromelysin-3, collagenase-3, galectin-3 and mesothelin in patients with pharynx/larynx squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.*, 2001; 21: 3677-3684
- [52] Śliwowska I., Kopczyński Z.: Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej-charakterystyka biochemiczna i kliniczna wartość oznaczania u chorych na raka piersi. *Współ. Onkol.*, 2005; 9: 327-335
- [53] Talamini R., Bosetti C., La Vecchia C., Dal Maso L., Levi F., Bidoli E., Negri E., Pasche C., Vaccarella S., Barzan L., Franceschi S.: Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control.*, 2002; 13: 957-964
- [54] Tang X., Shen X., Qian X., Gao X.: Expressions of HMGB1, MMP-2 and MMP-9 and prognostic value in human laryngeal carcinoma. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2013; 27: 181-187
- [55] Visse R., Nagase H.: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.*, 2003; 92: 827-839
- [56] Vu T.H., Werb Z.: Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.*, 2000; 14: 2123-2133
- [57] Wittekindt C., Jovanovic N., Guntinas-Lichius O.: Expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and blood vessel density in laryngeal squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol.*, 2011; 131: 101-106
- [58] Xie M., Sun Y., Li Y.: Expression of matrix metalloproteinases in supraglottic carcinoma and its clinical implication for estimating lymph node metastases. *Laryngoscope*, 2004; 114: 2243-2248
- [59] Yana I., Seiki M.: MT-MMPs play pivotal roles in cancer dissemination. *Clin. Exp. Metastasis*, 2002; 19: 209-215
- [60] Yüce I., Bayram A., Çağlı S., Canöz O., Bayram S., Güney E.: The role of CD44 and matrix metalloproteinase-9 expression in predicting neck metastasis of supraglottic laryngeal carcinoma. *Am. J. Otolaryngol.*, 2011; 32: 141-146
- [61] Zhang H., Liu M., Sun Y., Lu J.: MMP-14 can serve as a prognostic marker in patients with supraglottic cancer. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2009; 266: 1427-1434

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.