

Received: 2009.04.15
Accepted: 2009.05.20
Published: 2009.06.05

Znaczenie metaloproteinaz oraz ich inhibitorów w raku żołądka

The significance of metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer

Marta Łukaszewicz-Zajac, Barbara Mroczko, Maciej Szmitkowski

Zakład Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Streszczenie

Jednym z najistotniejszych etapów rozwoju i przerzutowania nowotworu jest degradacja białek przestrzeni pozakomórkowej (ECM) i błony podstawnej naczyń. Metaloproteinazy (MMPs) należą do enzymów zdolnych do degradacji kolagenu typu IV. Czynnikiem hamującą proteolityczną aktywność metaloproteinaz są tkankowe inhibitory metaloproteinaz (tissue inhibitors of metalloproteinases – TIMPs). Stwierdzono korelacje między ekspresją oraz stężeniem niektórych MMPs i TIMPs a parametrami kliniczno-patologicznymi nowotworu, tj.: stadium zaawansowania nowotworu, zasięgiem miejscowym guza pierwotnego, występowaniem lub brakiem przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych oraz przerzutów odległych. Sugeruje się możliwość zastosowania MMPs i TIMPs jako czynników prognostycznych w ocenie przeżycia chorych na raka żołądka.

Słowa kluczowe: rak żołądka • metaloproteinazy

Summary

A crucial step in tumor development and metastasis is degradation of the extracellular matrix (ECM). Matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes able to degrade type IV collagen. The proteolytic activity of MMPs is regulated by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). It has been shown that MMP and TIMP expression and concentration correlated with clinicopathological features of tumor, such as tumor stage, depth of tumor invasion, the presence of lymph node and distant metastases. Some clinical investigations have suggested the usefulness of MMPs and TIMPs as prognostic factors for the survival of gastric cancer patients.

Key words: gastric cancer • matrix metalloproteinase

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=887593>

Word count: 2951

Tables: 2

Figures: 1

References: 59

Adres autorki: mgr Marta Łukaszewicz-Zajac, Zakład Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, ul. J. Waszyngtona 15 a, 15-269 Białystok; e-mail: martha_21@interia.pl

Wykaz skrótów: **CA 19-9** – antygen węglowodanowy 19-9 (carbohydrate antigen 19-9); **CEA** – antygen karcynoembrionalny (carcinoembryonal antigen); **ECM** – przestrzeń pozakomórkowa (extracellular matrix); **ELISA** – metoda immunoenzymatyczna (enzyme-linked immunosorbent assay); **MMPs** – metaloproteinazy (matrix metalloproteinases); **MT-MMPs** – metaloproteinazy zakotwiczone w błonie komórkowej (membrane type metalloproteinases); **proMMPs** – proenzymy metaloproteinaz (proenzymes of matrix metalloproteinases).

CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA METALOPROTEINAZ I ICH INHIBITORÓW

Jednym z najistotniejszych etapów inwazji nowotworu jest degradacja błony podstawnej naczyń, która jest główną barierą na drodze migracji komórek nowotworowych [43]. Grupą enzymów proteolitycznych, należących do endopeptydaz, zdolnych do degradacji i przebudowy białek przestrzeni pozakomórkowej (extracellular matrix – ECM) i błony podstawnej naczyń są metaloproteinazy (matrix metalloproteinases – MMPs) [43,46]. Enzymy te są wytwarzane przez większość komórek organizmu, tj.: leukocyty, makrofagi, komórki śródbłonna, fibroblasty oraz komórki nowotworowe [10]. Są syntetyzowane w postaci proenzymów i uwalniane przez komórki jako proenzymy (proMMPs). Dotąd zidentyfikowano 28 metaloproteinaz, które mogą występować w postaci wolnej lub zakotwiczonej w błonie komórkowej (membrane type metalloproteinases – MT-MMP) [10,36]. MMPs podzielono na pięć grup: stromelizyny (MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-18), kolagenazy (MMP-1, MMP-8, MMP-13), żelatynazy (MMP-2, MMP-9), MMPs błonowe (MMP-14/MT1-MMP, MMP-15/MT2-MMP, MMP-16/MT3-MMP, MMP-17/MT4-MMP) oraz inne, tj. matrylizyna (MMP-7) i MMP-12 [15].

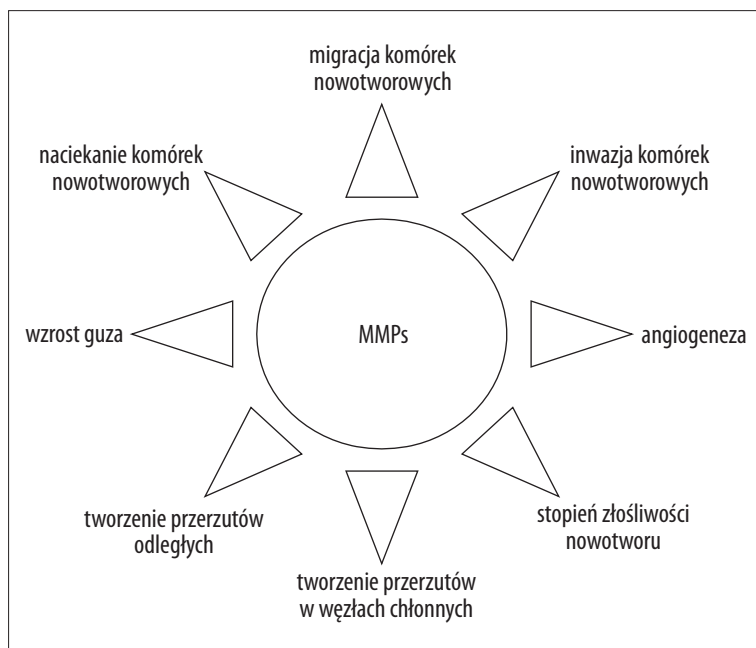
Metaloproteinazy odgrywają znaczącą rolę w wielu procesach fizjologicznych organizmu. Uczestniczą w przebudowie tkanki podporowej wszystkich narządów oraz są niezbędne do prawidłowego rozwoju szkieletu. Warunkują odnowę i naprawę tkanki łącznej, biorąc udział w gojeniu się ran i tworzeniu blizn. Mają także znaczenie w przebudowie endometrium i rozwoju zarodka. Sugeruje się udział MMPs w chorobach ośrodkowego układu nerwowego poprzez regulację mechanizmów naprawczych i degeneracyjnych. Wykazano zmiany stężeń metaloproteinaz i ich inhibitorów w chorobie Alzheimera, stwardnieniu rozsianym, stwardnieniu zanikowym bocznym, szpiczaku mnogim i czerniaku złośliwym [55]. Potwierdzono, że MMPs odgrywają rolę w rozwoju chorób o podłożu autoimmunologicznym, tj. reumatoidalnym zapaleniu stawów, toczniu trzewnym układowym [1,10,35,36]. Metaloproteinazy biorą udział w progresji nowotworu poprzez degradację ECM, umożliwiając wzrost, migrację i inwazję komórek nowotworowych, powstawanie przerzutów odległych oraz angiogenezę w obrębie guza [1,10,35,36]. Enzymy te są syntetyzowane przez komórki wielu nowotworów. Wśród MMPs, głównie MMP-2 oraz MMP-9 uczestniczą w trawieniu kolagenu typu IV [10,12,22]. Ekspresję MMP-9 wykazano na makrofagach i neutrofilach [10]. Enzym ten moduluje przepuszczalność śródbłonna naczyń krwionośnych, natomiast MMP-2 promuje degradację białek ECM i w przeciwieństwie do MMP-9 stałą, a jednocześnie słabą ekspresję tego enzymu stwierdza się na wielu rodzajach komórek, zarówno nowotworowych, śródbłonna naczyń, jak i zrębu guza [10,12,22]. Sugeruje się, że ekspresja MMP-2 może być pobudzana przez cząsteczkę EMMPRIN, czyli

glikoproteinę znajdującą się na powierzchni komórek nowotworowych, która stymuluje fibroblasty do wytwarzania MMP-2. Natomiast ekspresja MMP-9 na limfocytach T jest podwyższona dzięki działaniu takich czynników jak antygen 1 limfocyta (lymphocyte function-associated antigen 1 – LFA-1) i cząsteczka adhezyjna należąca do nadrodziny immunoglobulin (intercellular adhesion molecule 1 – ICAM-1) [35].

Sugeruje się, że tkankowy aktywator plazminogenu (tissue plasminogen activator – tPA-1) promuje syntezę MMP-9 przez neutrofile. Ponadto, MMP-9 uwalniany z neutrofilów różni się od MMP-9 wytwarzanego przez inne komórki, ze względu na brak zdolności dojrzałych neutrofilów do syntezy tego enzymu *de novo*, a niekiedy MMP-9 jest wytwarzana w późnym etapie dojrzewania prekursorów neutrofilii w szpiku kostnym i magazynowana w tej postaci przed uwolnieniem tego enzymu do ECM podczas aktywacji neutrofilów. Ponadto pro-MMP-9 wytwarzana przez ludzkie neutrofile nie jest zdolna do tworzenia kompleksu z TIMP-1. Dodatkowo MMP-9 może być uwalniana przez neutrofile w trzech różnych postaciach: monomery o masie cząsteczkowej 92 kDa, homodimeru o masie cząsteczkowej 200 kDa i cząsteczki MMP-9 (130 kDa) kowalencyjnie związanej z NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) [5].

Czynnikami hamującymi proteolityczną aktywność metaloproteinaz są ich tkankowe inhibitory (tissue inhibitors of metalloproteinases – TIMPs). Wykazano, że białka te mogą się wiązać zarówno z aktywnymi, jak i nieaktywnymi MMPs, regulując w ten sposób proces ich aktywacji [26]. TIMPs są wytwarzane przez fibroblasty, komórki nabłonkowe i śródbłonkowe, a także przez komórki nowotworowe. Stwierdzono obecność tych białek we krwi i przestrzeni międzykomórkowej [26]. Opisano cztery rodzaje tkankowych inhibitorów metaloproteinaz, tj.: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4 [23,26]. Mechanizm aktywacji MMPs jest ściśle kontrolowany na wielu etapach. Wykazano, że wśród wszystkich inhibitorów, TIMP-2 jako pierwszy wiąże się z umiejscowioną na powierzchni komórek metaloproteinazą błonową – MT1-MMP. Następnie związek TIMP-2/MT1-MMP działa jako receptor, umożliwiający powstanie potrójnego kompleksu z proMMP-2. Dochodzi do przekształcenia proMMP-2 w aktywną postać MMP-2 przez TIMP-2/wolny MT1-MMP, co z kolei prowadzi do aktywacji MMP-9 [46]. Innymi czynnikami hamującymi aktywność metaloproteinaz są: α_2 -makroglobulina, która ze względu na dużą masę cząsteczkową (750 kDa) obniża aktywności MMPs jedynie w kompartmentach naczyńnym oraz cytokiny przeciwzapalne, tj. interferon gamma (INF- γ) czy leki – deksametazon i indometacyna [10].

TIMPs pełnią istotną rolę w utrzymaniu równowagi między procesem degradacji a syntezą składników macierzy



Ryc. 1. Znaczenie MMPs w rozwoju nowotworów [1,10,21,29,35,36]

zewnątrzkomórkowej [26]. Działają antyangiogenicznie, hamując migrację i proliferację komórek śródbłonka naczyń, a tym samym inwazję komórek nowotworowych [26].

ZNACZENIE METALOPROTEINAZ I ICH INHIBITORÓW W ROZWOJU NOWOTWORÓW

MMP-2 i MMP-9 odgrywają najistotniejszą rolę w inwazji i przerzutowaniu komórek guza ze względu na zdolność tych enzymów do degradacji kolagenu typu IV, głównego składnika błony podstawnej naczyń i macierzy zewnątrzkomórkowej [21]. Konsekwencją tego procesu jest migracja komórek nowotworowych, umożliwiająca wzrost guza i tworzenie się przerzutów odległych [36]. W rozwoju nowotworu i powstawaniu przerzutów istotne znaczenie ma proces angiogenezy, w którym MMPs kontrolują aktywność czynników proangiogenicznych oraz biorą udział we wzroście komórek śródbłonka [29]. Znaczenie MMPs w rozwoju nowotworów przedstawiono na rycinie 1.

Dane literaturowe sugerują znaczenie metaloproteinaz, a zwłaszcza MMP-9, jako nowych, biochemicznych markerów choroby nowotworowej [59]. Wielu autorów zaobserwowało wzmożoną ekspresję MMP-9 w tkankach nowotworów o różnym umiejscowieniu, tj. raka piersi [52], przełyku [33] oraz głowy i szyi [41]. Wykazano także podwyższone stężenie MMP-2 lub/i MMP-9 w krwi chorych na raka żołądka [49], płuc [54], piersi [52], wątroby [34], jelita grubego [37], pęcherza moczowego [14], przełyku [32] czy też pacjentów z nowotworami głowy i szyi [41]. Potwierdzono korelację między stężeniem MMP-9 a niektórymi cechami kliniczno-patologicznymi nowotworu [14,32,52]. Guan i wsp. [14] stwierdzili, że stężenie tego enzymu wzrastało wraz ze stopniem zaawansowania i zróżnicowania raka pęcherza moczowego, a jego poziom był znacząco wyższy w surowicy chorych z przerzutami odległymi w porównaniu do pacjentów, u których nie wykryto przerzutów. Wu i wsp. [52] wykazali podwyższone stężenie MMP-9 w surowicy pacjentów z przerzutami

w regionalnych węzłach chłonnych, bardziej zaawansowanym stopniem nowotworu oraz krótszym czasem przeżycia chorych na raka piersi. Podobne zależności stwierdzono w przypadku oceny ekspresji MMP-9 w tkankach guza [52]. Oberg i wsp. [37] stwierdzili, że podwyższone stężenie MMP-2 w surowicy korelowało z krótszym czasem przeżycia chorych na raka jelita grubego. Znaczenie metaloproteinaz jako czynnika prognostycznego przeżycia pacjentów potwierdziło wielu autorów również w przypadku nowotworów o innym umiejscowieniu, tj.: w raku płuca [54] czy nowotworach głowy i szyi [41].

Metaloproteinazy, które odgrywają główną rolę w procesie inwazji i przerzutowania nowotworu, są wytwarzane zarówno przez komórki nowotworowe, jak i komórki zrębu guza [42]. W chwili aktywacji MMPs, komórki zrębu uwalniają tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMPs), które kontrolują proteolityczną aktywność tych enzymów [42]. Wykazano, że TIMP-1 jako inhibitor inwazji komórek nowotworowych, redukuje wzrost guza i tworzenie się przerzutów odległych [26]. TIMP-1 i TIMP-2 działają antyangiogenicznie przez hamowanie migracji i proliferacji komórek śródbłonka. Dodatkowo TIMP-2 jest odpowiedzialny za cytotoksyczne działanie na komórki guza, zamykając je w sieci śródmiąższowego kolagenu [10,23,26,59]. Wykazano wzmożoną ekspresję TIMP-1 w tkankach guza inwazyjnego [18,52,58] oraz potwierdzono znaczenie tego białka jako inhibitora aktywności metaloproteinaz, który hamuje inwazję nowotworu [38,39].

Ekspresję inhibitorów metaloproteinaz zaobserwowano w tkankach guzów o różnej lokalizacji, np. w raku piersi [52], trzustki [17] czy żołądka [18]. Wykazano podwyższone stężenie TIMPs we krwi chorych na raka płuca [54], jelita grubego [37] i piersi [52]. Oberg i wsp. [37] potwierdzili znaczącą zależność między podwyższonym stężeniem TIMP-1 w surowicy chorych na raka jelita grubego a wyższym stopniem zaawansowania guza. Podobną korelację zaobserwowano w przypadku nowotworów o in-

nym umiejscowieniu [52]. Stężenie TIMP-1 było podwyższone w surowicy pacjentów w bardziej zaawansowanym stadium nowotworu oraz z przerzutami w regionalnych węzłach chłonnych [52]. Ponadto znacząco wyższe stężenie inhibitora metaloproteinazy 1 korelowało z krótszym czasem przeżycia chorych na raka piersi [52], płuca [54], a także raka żołądka [56,57].

RAK ŻOŁĄDKA

Rak żołądka stanowi drugą co do częstości przyczynę zgonów z powodu choroby nowotworowej na świecie [3]. Częstość występowania tego nowotworu wykazuje nawet 10-krotne różnice między poszczególnymi regionami geograficznymi. Najwięcej przypadków stwierdza się w Japonii, Chinach i w Rosji, natomiast w Ameryce Północnej oraz Europie Zachodniej występuje znacznie rzadziej [3,20]. W Polsce nowotwór ten zajmuje trzecie miejsce wśród mężczyzn oraz ósme u kobiet pod względem zachorowalności na nowotwory złośliwe [20]. Epidemiologia raka żołądka w znacznym stopniu wymaga uwzględnienia jego dwóch histologicznych podtypów, tj. bardziej zróżnicowanego typu jelitowego ze spójnymi komórkami tworzącymi gruczoły oraz rozlanego z naciekającymi i słabiej zróżnicowanymi komórkami guza o niekorzystnym rokowaniu. Wykazano, że typ jelitowy pojawia się głównie w rejonach o dużej zapadalności na raka żołądka i często zależy od takich czynników etiologicznych jak płęć, palenie tytoniu, dieta, zakażenie *Helicobacter pylori*, przewlekły zanikowy nieżyt błony śluzowej żołądka czy też metaplasja jelitowa [3,20]. Natomiast rzadziej występujący typ rozlany stwierdza się ze zbliżoną częstością na całym świecie, głównie u ludzi młodych obu płci, a jego patogenezą prawdopodobnie jest związana ze zmianami genetycznymi [3,20].

Rak żołądka najczęściej umiejscawia się w części przedodźwiernikowej i odźwierniku, a w 25% przypadków w trzonie i dnie żołądka. Objawy kliniczne raka żołądka często są nieswoiste, a w 80% przypadków nowotworów we wczesnym stadium zaawansowania rozwój choroby jest asymptomatyczny [20]. Jest to przyczyną zbyt późnego rozpoznania nowotworu, najczęściej w zaawansowanym stadium, co wiąże się z krótszym czasem przeżycia pacjentów.

Poszukuje się nowych markerów użytecznych w procesie diagnostycznym raka żołądka, które mogłyby zwiększyć częstość wykrywania tego nowotworu we wczesnym stadium zaawansowania, a tym samym wydłużyć czas przeżycia pacjentów z chorobą nowotworową. Coraz więcej badań potwierdza istotne znaczenie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) i ich inhibitorów (TIMPs) w rozwoju wielu nowotworów, w tym także raka żołądka.

ZNACZENIE METALOPROTEINAZ W RAKU ŻOŁĄDKA

Znaczenie metaloproteinaz w rozwoju nowotworów żołądka wykazało wiele autorów (tabela 1). Stwierdzono, że ekspresja niektórych MMPs wzrastała wraz ze stopniem zaawansowania guza [2,6,27,58]. Wykazano zależność między ekspresją MMP-2, MMP-9 i M1-MMP a parametrami kliniczno-patologicznymi nowotworu, tj.: zasięgiem miejscowym guza pierwotnego, występowaniem lub brakiem przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych oraz przerzutów odległych [4,6,12,21,40,58]. Gao i wsp. [13]

potwierdzili, że ekspresja MMP-9 była znacząco wyższa u pacjentów z przerzutami odległymi i słabiej zróżnicowanym rakiem żołądka w porównaniu do chorych bez przerzutów i dobrze zróżnicowanym guzem. Wykazano zależność między wzmożoną ekspresją MMP-7, MMP-9 i MMP-13 a bardziej złośliwym fenotypem i agresywniejszym przebiegiem tego nowotworu [7,8,27]. Nadekspresja M1-MMP, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-13 oraz proenzymów MMP-2 i MMP-9 korelowała ze znacznie krótszym przeżyciem chorych na raka żołądka [4,7,8,27].

Badania wykazały, że najczulszą metodą oznaczania poziomu metaloproteinaz jest zymografia [25]. Dragutinovic i wsp. za pomocą zymografii zaobserwowali znacząco wyższą aktywność proteolityczną proMMP-9 w surowicy chorych na raka żołądka w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych, a aktywność tego enzymu wrastała wraz ze stadiem zaawansowania guza [9]. Potwierdzono, że stężenia MMP-9 oznaczone metodą immunoenzymatyczną (enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) znacząco korelowały z aktywnością tego enzymu ocenianego za pomocą zymografii [25,51]. Stwierdzono znacząco wyższe stężenia tego enzymu w osoczu pacjentów z nowotworami żołądka w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych [49,51]. Stężenia MMP-9 korelowały z parametrami kliniczno-patologicznymi nowotworu, tj.: stopniem zaawansowania, naciekiem komórek nowotworowych, obecnością przerzutów w węzłach chłonnych i narządach odległych oraz wielkością guza, sugerując znaczenie tego enzymu w wykrywaniu zarówno pierwotnego, jak i przerzutowego raka żołądka [49]. Wu i wsp. [51] wykazali istotnie statystyczną zależność między podwyższonym stężeniem tego enzymu w osoczu chorych na raka żołądka a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych, naciekiem naczyń limfatycznych i żylnych. Analizując wskaźniki diagnostyczne stwierdzono, że pole powierzchni pod krzywą ROC było znacząco wyższe w osoczu pacjentów z rakiem żołądka niż w surowicy chorych [51]. Ponadto czułość, swoistość i dokładność diagnostyczna oznaczeń MMP-9 w osoczu pacjentów przy wartości odcinającej 60 ng/ml wynosiły odpowiednio 82,5, 65,5, 75,1% i były wyższe w porównaniu do wartości wyliczonych w surowicy przy wartości odcinającej 293 ng/ml [51]. Sugeruje się, że oznaczanie stężenia MMP-9 w osoczu jest bardziej wartościowe diagnostycznie w porównaniu z surowicą i lepiej odzwierciedla zaawansowanie i progresję raka żołądka [51]. Wykazano, że stężenie MMP-9 w surowicy było trzykrotnie wyższe niż w osoczu, gdzie zastosowanym antykoagulantem była heparyna [19]. Przyczyną podwyższonego stężenia tych enzymów w surowicy w porównaniu do osocza jest uwalnianie metaloproteinaz przez płytki krwi lub leukocyty podczas ich aktywacji lub mobilizacji neutrofilów w trakcie procesu krzepnięcia [28,47]. Mimo to wielu autorów ocenia stężenie metaloproteinaz w surowicy chorych, przedstawiając ciekawe wnioski [11,48]. Wykazano znacząco wyższe stężenia prekursorowych postaci metaloproteinaz, tj. proMMP-2 i proMMP-9 w surowicy chorych na raka żołądka w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych [11]. Nie zaobserwowano zależności między poziomem tych enzymów a stężeniem klasycznego markera raka żołądka – antygenu karcynoembrionalnego (carcinoembryonal antygen – CEA), sugerując znaczenie tych białek jako markerów nowotworowych raka żołądka niezależnych od CEA [11]. Tan i wsp. [48] stwierdzili istot-

Tabela 1. Znaczenie wzmożonej ekspresji metaloproteinaz i ich inhibitorów w raku żołądka

Rodzaj MMPs/ TIMPs	Wyniki badań	Piśmiennictwo
MMP-9 TIMP-1	• istotna zależność między nasiloną ekspresją MMP-9 a typem histologicznym raka żołądka • istotna zależność między nasiloną ekspresją TIMP-1 a głębokością naciekania ściany żołądka i obecnością przerzutów w węzłach chłonnych	[44]
MMP-9	• znacząco wyższa ekspresja MMP-9 u pacjentów z przerzutami odległymi i słabiej zróżnicowanym guzem w porównaniu z chorymi bez przerzutów i dobrze zróżnicowanym guzem	[13]
MMP-9 TIMP-1	• istotna zależność między wzmożoną ekspresją MMP-9 oraz TIMP-1 a większym stopniem zaawansowania nowotworu, głębokością naciekania ściany żołądka i obecnością przerzutów w węzłach chłonnych	[58]
TIMP-1	• zależność między nasiloną ekspresją TIMP-1 a większym stopniem zaawansowania nowotworu i krótszym czasem przeżycia chorych	[18]

nie podwyższone stężenia MMP-9 w surowicy chorych na raka żołądka, które po zabiegu operacyjnym w ciągu tygodnia ulegały znacznemu obniżeniu do wartości prawidłowych. Stężenia tego enzymu wzrastały wraz ze stopniem inwazyjności guza, głębokością naciekania ściany żołądka i obecnością przerzutów w węzłach chłonnych [48]. Tan i wsp. [48] zaobserwowali, że stężenie MMP-9 w surowicy odpowiadało ekspresji MMP-9 i mRNA dla MMP-9 w tkance guza, potwierdzając użyteczność metody ELISA w oznaczaniu tych enzymów. Stwierdzono znaczenie tej metaloproteinazy jako czynnika prognostycznego przeżycia chorych na raka żołądka [45,51]. Wu i wsp. [51] wykazali, że podwyższone stężenie MMP-9 w osoczu (≥ 60 ng/ml) korelowało ze znacznie krótszym czasem przeżycia pacjentów w porównaniu z osobami, u których poziom tego enzymu był w granicach normy. Zależność ta nie została potwierdzona w przypadku surowicy, gdzie za wartość odcinającą uznano stężenie MMP-9 ≥ 293 ng/ml [51]. Shen i wsp. [45] stwierdzili, że pacjenci, u których stężenie MMP-9 w surowicy było poniżej 368,5 ng/ml lepiej rokowali w porównaniu do chorych ze stężeniem powyżej 368,5 ng/ml.

Wykazano, że polimorfizm pojedynczych nukleotydów w obrębie promotorów genów kodujących metaloproteinazy wpływa na ekspresję tych enzymów, a tym samym na rozwój wielu nowotworów [24]. Kubben i wsp. [24] zaobserwowali, że obecność polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w budowie regulatorowej części genu MMP-2 (-1306C>T) znacząco korelowało ze stężeniem tego enzymu w tkance raka żołądka. Sugeruje się zależność między polimorfizmem pojedynczego nukleotydu w budowie regulatorowej części genu MMP-2 (-1306C>T) a ryzykiem rozwoju raka żołądka [31]. Ponadto Matsumura i wsp. [30] wykazali istotną korelację między polimorfizmem pojedynczego nukleotydu w budowie regulatorowej części genu MMP-9 (-1562C>T) a stopniem złośliwości nowotworu, stadiem zaawansowania guza i zajęciem naczyń limfatycznych.

ZNACZENIE INHIBITORÓW METALOPROTEINAZ W RAKU ŻOŁĄDKA

W wielu badaniach potwierdzono rolę inhibitorów metaloproteinaz jako czynników stymulujących wzrost komórek – zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych [16].

Zaobserwowano wzmożoną ekspresję TIMP-1 i TIMP-2 w komórkach raka żołądka [18,58]. Stwierdzono istotnie statystyczną zależność między podwyższoną ekspresją TIMP-1 a głębokością nacieku nowotworowego, inwazją w obrębie naczyń limfatycznych i obecnością przerzutów w węzłach chłonnych, sugerując znaczenie tego białka jako wskaźnika progresji guza oraz tworzenia się przerzutów odległych [18,44,58]. Stwierdzono, że nadekspresja inhibitora MMPs przyczyniała się do bardziej agresywnego przebiegu raka żołądka [7,18].

Wang i wsp. [50] wykazali podwyższone stężenia TIMP-1 w surowicy chorych na raka żołądka w porównaniu z osobami zdrowymi. Stężenia tego białka dodatkowo korelowały z wielkością guza, głębokością nacieku ściany żołądka, obecnością przerzutów odległych w wątrobie, rozsiwem w obrębie otrzewnej, naciekiem naczyń chłonnych i nerwów obwodowych [50]. Istotna zależność między stężeniem TIMP-1 w osoczu a cechami kliniczno-patologicznymi nowotworu została potwierdzona przez innych autorów [56,57]. Yoshikawa i wsp. [56] porównali stężenie TIMP-1 z klasycznymi markerami stosowanymi w diagnostyce raka żołądka sugerując, że oznaczenie poziomu tego białka w osoczu pacjentów jest pomocne w przewidywaniu rozsiewu komórek nowotworowych z większą dokładnością niż klasyczne markery nowotworowe, tj. antygen karcynoembrionalny (CEA) oraz antygen węglowodanowy 19-9 (carbohydrate antigen 19-9 – CA 19-9). Wykazano też, że stężenie TIMP-1 było znacząco wyższe w osoczu chorych z nieresekcyjnym guzem w porównaniu do pacjentów z resekcyjnym rakiem żołądka [56]. Wielu autorów potwierdziło znaczenie inhibitorów metaloproteinaz w prognozowaniu przeżycia chorych na raka żołądka [50,57]. Podwyższone stężenie TIMP-1, zarówno w surowicy, jak i osoczu, znacząco korelowało z krótszym przeżyciem pacjentów z tym nowotworem [50,57]. Yoshikawa i wsp. [57] wykazali, że stężenie TIMP-1 w osoczu chorych na raka żołądka może służyć jako niezależny czynnik prognostyczny przeżycia pacjentów (tab. 1, 2).

RÓWNOWAGA MIĘDZY METALOPROTEINAZAMI A ICH INHIBITORAMI A ROZWÓJ NOWOTWORU

Aktywność proteolityczna metaloproteinaz jest determinowana nie tyle przez stopień ich ekspresji, ile przez wza-

Tabela 2. Znaczenie podwyższonego stężenia metaloproteinaz i ich inhibitorów we krwi chorych na raka żołądka

Rodzaj MMPs/ TIMPs	Wyniki badań	Piśmiennictwo
MMP-9	• stężenia MMP-9 wzrastały wraz ze stopniem inwazyjności guza, głębokością naciekania ściany żołądka i obecnością przerzutów w węzłach chłonnych	[48]
TIMP-1	• zależność między podwyższonym stężeniem TIMP-1 w surowicy a wielkością guza, głębokością nacieku ściany żołądka, obecnością przerzutów odległych w wątrobie, rozsiewem w obrębie otrzewnej, naciekiem naczyń chłonnych i nerwów obwodowych oraz krótszym czasem przeżycia chorych na raka żołądka	[50]
MMP-9	• zależność między podwyższonym stężeniem MMP-9 w osoczu a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych, naciekiem naczyń limfatycznych i żylnych • niekorzystny wskaźnik przeżycia chorych ze stężeniem MMP-9 w osoczu (≥ 60 ng/ml)	[51]
MMP-9	• zależność między podwyższonym stężeniem MMP-9 w osoczu a stopniem zaawansowania nowotworu, głębokością naciekania ściany żołądka, obecnością przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych i narządach odległych oraz wielkością guza	[49]
TIMP-1	• zależność między podwyższonym stężeniem TIMP-1 w osoczu a stadium zaawansowania guza, obecnością przerzutów w węzłach chłonnych i wątrobie, naciekiem błony surowiczej, rozsiewem w obrębie otrzewnej	[56,57]

jemny stosunek między MMPs a czynnikami hamującymi ich aktywność [23]. Zachowanie równowagi między aktywnością metaloproteinaz a ich inhibitorów odgrywa znaczącą rolę w utrzymaniu prawidłowej struktury tkanek i funkcjonowaniu organizmu, zapobiegając degradacji białek ECM [53,58]. Nadmierna ekspresja MMP-9 bez jej inhibitora w komórkach guza destabilizuje równowagę między tymi białkami, ułatwiając migrację komórek nowotworowych. Natomiast nadekspresja tylko TIMPs może świadczyć o całkowitym zahamowaniu aktywności MMP-9 przez jej inhibitor, co zapobiega degradacji ECM, hamując inwazję i tworzenie się przerzutów odległych [56,57,58]. Zgodnie z tą hipotezą komórki nowotworu we wczesnym stadium zaawansowania raka żołądka nie wykazują ekspresji TIMP-1, ale wraz z rozwojem nowotworu ekspresja MMP-9 będzie ulegała podwyższeniu, co z kolei pobudzi komórki podścieliska guza do wytwarzania TIMP-1. W znacznie zaawansowanym raku żołądka nadekspresja TIMP-1 hamuje aktywność MMP-9, wskazując na obecność guza o największej skłonności do tworzenia przerzutów [43]. Zhang i wsp. [58] stwierdzili, że zaburzenie równowagi między ekspresją MMP-9 a TIMP-1 może prognozować inwazję guza i powstanie przerzutów odległych. Badania wykazują, że MMP-9 działa głównie jako promotor inwazji nowotworu i tworzenia przerzutów, podczas gdy TIMP-1 jest inhibitorem aktywności proteolitycznej metaloproteinaz, hamując progresję nowotworu [44,58].

PIŚMIENICTWO

- [1] Ala-aho R., Kahari V.M.: Collagenases in cancer. *Biochimie*, 2005; 87: 273–286
- [2] Bando E., Yonemura Y., Endou Y., Sasaki T., Taniguchi K., Fujita H., Fushida S., Fujimura T., Nishimura G., Miwa K., Seiki M.: Immunohistochemical study of MT-MMP tissue status in gastric carcinoma and correlation with survival analyzed by univariate and multivariate analysis. *Oncol. Rep.*, 1998; 5: 1483–1488

PODSUMOWANIE

Rak żołądka jest jedną z głównych przyczyn zgonów z powodu nowotworów złośliwych na świecie. Charakteryzuje się często bezobjawowym, szybkim przebiegiem i zazwyczaj jest rozpoznawany w późnym stadium zaawansowania. Pięcioletnie przeżycie pacjentów z tym nowotworem wynosi zaledwie 47–60%. Jednym z najistotniejszych etapów inwazji nowotworu jest degradacja przestrzeni pozakomórkowej i błony podstawnej naczyń, które stanowią fizjologiczną barierę dla komórek nowotworowych, uniemożliwiając ich migrację. Metaloproteinazy, a zwłaszcza MMP-2 i MMP-9, trawiąc kolagen typu IV, ułatwiają wzrost, migrację i inwazję komórek nowotworowych, powstawanie przerzutów odległych oraz angiogenezę w obrębie guza. Aktywność proteolityczna metaloproteinaz jest hamowana przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMPs). Stwierdzono korelację między ekspresją i stężeniem niektórych MMPs i TIMPs a parametrami kliniczno-patologicznymi nowotworu, tj.: stadium zaawansowania nowotworu, zasięgiem miejscowym guza pierwotnego, występowaniem lub brakiem przerzutów w węzłach chłonnych oraz przerzutów odległych. Ponadto MMPs i ich inhibitory mogą służyć jako czynniki prognostyczne przeżycia chorych na nowotwory żołądka. Dalsze badania dotyczące roli tych białek w progresji i inwazji nowotworu są niezbędne do pełnego określenia ich znaczenia w diagnostyce i prognozowaniu pacjentów z chorobą nowotworową, w tym także z rakiem żołądka.

- [3] Brenner H., Rothenbacher D., Arndt V.: Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol. Biol.*, 2009; 472: 467–477
- [4] Caenazzo C., Onisto M., Sartor L., Scalera R., Giraldo A., Nitti D., Garbisa S.: Augmented membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP): MMP-2 messenger RNA ratio in gastric carcinomas with poor prognosis. *Clin. Cancer Res.*, 1998; 4: 2179–2186

- [5] Cuadrado E., Ortega L., Hernández-Guillamon M., Penalba A., Fernández-Cadenas I., Rosell A., Montaner J.: Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J. Leukoc. Biol.*, 2008; 84: 207–214
- [6] Czyżewska J., Guzińska-Ustymowicz K., Kemon A., Bandurski R.: The expression of matrix metalloproteinase 9 and cathepsin B in gastric carcinoma is associated with lymph node metastasis, but not with postoperative survival. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2008; 46: 57–64
- [7] De Mingo M., Morán A., Sánchez-Pernaute A., Iniesta P., Díez-Valladares L., Pérez-Aguirre E., de Juan C., García-Aranda C., Díaz-López A., García-Botella A., Martín-Antona E., Benito M., Torres A., Balibrea J.L.: Expression of MMP-9 and TIMP-1 as prognostic markers in gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 2007; 54: 315–319
- [8] Del Casar Lizcano J.M., Vizoso Piñeiro F., González Sánchez L.O., Martín Suárez A., Gava R., Cuesta Fernández E., Díez Santisteban M.C.: Expression and clinical significance of collagenase-3 (MMP-13) in gastric cancer. *Gastroenterol. Hepatol.*, 2003; 26: 1–7
- [9] Dragutinović V.V., Radovanović N.S., Izrael-Zivković L.T., Vrvčić M.M.: Detection of gelatinase B activity in serum of gastric cancer patients. *World J. Gastroenterol.*, 2006; 12: 105–109
- [10] Egeblad M., Werb Z.: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer.*, 2002; 2: 161–174
- [11] Endo K., Maehara Y., Baba H., Yamamoto M., Tomisaki S., Watanabe A., Kakeji Y., Sugimachi K.: Elevated levels of serum and plasma metalloproteinases in patients with gastric cancer. *Anticancer Res.*, 1997; 17: 2253–2258
- [12] Galis Z.S., Muszynski M., Sukhova G.K., Simon-Morrissey E., Unemori E.N., Lark M.W., Amento E., Libby P.: Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ. Res.*, 1994; 75: 181–189
- [13] Gao Z.L., Zhang C., Du G.Y., Lu Z.J.: Clinical significance of changes in tumor markers, extracellular matrix, MMP-9 and VEGF in patients with gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 2007; 54: 1591–1595
- [14] Guan K.P., Ye H.Y., Yan Z., Wang Y., Hou S.K.: Serum levels of endostatin and matrix metalloproteinase-9 associated with high stage and grade primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*, 2003; 61: 719–723
- [15] Gurevich L.E.: Role of matrix metalloproteinase 2 and 9 in determination of invasive potential of pancreatic tumors. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2003; 136: 494–498
- [16] Hayakawa T., Yamashita K., Tanzawa K., Uchijima E., Iwata K.: Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett.*, 1992; 298: 29–32
- [17] Jones L.E., Humphreys M.J., Campbell F., Neoptolemos J.P., Boyd M.T.: Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 2832–2845
- [18] Joo Y.E., Seo K.S., Kim H.S., Rew J.S., Park C.S., Kim S.J.: Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in gastric cancer. *Dig. Dis. Sci.*, 2000; 45: 114–121
- [19] Jung K., Laube C., Lein M., Lichtenhagen R., Tschesche H., Schnorr D., Loening S.A.: Kind of sample as preanalytical determinant of matrix metalloproteinase 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in blood. *Clin. Chem.*, 1998; 44: 1060–1062
- [20] Jurkowska G.: Choroby nowotworowe przewodu pokarmowego. *Gastroenterologia w praktyce*, red.: A. Gabryelewicz, PZWL, Warszawa 2002; 251–297
- [21] Kabashima A., Maehara Y., Kakeji Y., Baba H., Koga T., Sugimachi K.: Clinicopathological features and overexpression of matrix metalloproteinases in intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis. *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 3581–3584
- [22] Kleiner D.E Jr, Tuuttila A., Tryggvason K., Stetler-Stevenson W.G.: Stability analysis of latent and active 72-kDa type IV collagenase: the role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Biochemistry*, 1993; 32: 1583–1592
- [23] Kołomecki K.: Hamowanie funkcji metaloproteinaz – możliwości zastosowania klinicznego. *Onkol. Pol.*, 2000; 3: 163–167
- [24] Kubben F.J., Sier C.F., Meijer M.J., van den Berg M., van der Reijden J.J., Griffioen G., van de Velde C.J., Lamers C.B., Verspaget H.W.: Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer. *Br. J. Cancer.*, 2006; 95: 744–751
- [25] 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
- [26] Lambert E., Dasse E., Haye B., Petitfrere E.: TIMPs as multifaceted proteins. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2004; 49: 187–198
- [27] Liu X.P., Kawauchi S., Oga A., Tsushimi K., Tsushimi M., Furuya T., Sasaki K.: Prognostic significance of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression at the invasive front in gastric carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2002; 93: 291–295
- [28] Makowski G.S., Ramsby M.L.: Interaction of amorphous calcium phosphate with fibrin *in vitro* causes decreased fibrinolysis and altered protease profiles: implications for atherosclerotic disease. *Inflammation*, 2001; 25: 319–329
- [29] Marc A., Lafleur M., Handsley M., Dylan R.E.: Potential and established roles for the matrix metalloproteinases (MMPs) during angiogenesis. *Expert. Rev. Mol. Med.*, 2003; 5: 1–39
- [30] Matsumura S., Oue N., Nakayama H., Kitada Y., Yoshida K., Yamaguchi Y., Imai K., Nakachi K., Matsusaki K., Chayama K., Yasui W.: A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2005; 131: 19–25
- [31] Miao X., Yu C., Tan W., Xiong P., Liang G., Lu W., Lin D.: A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (–1306C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 2003; 63: 3987–3990
- [32] Mroczko B., Kozłowski M., Groblewska M., Łukaszewicz M., Nikliński J., Jelski W., Ludański J., Chyżewski L., Szmikowski M.: The diagnostic value of the measurement of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), squamous cell cancer antigen (SCC) and carcinoembryonic antigen (CEA) in the sera of esophageal cancer patients. *Clin. Chim. Acta*, 2008; 389: 61–66
- [33] Mroczko B., Kozłowski M., Groblewska M., Łukaszewicz M., Nikliński J., Ludański J., Chyżewski L., Szmikowski M.: Expression of matrix metalloproteinase-9 in the neoplastic and interstitial inflammatory infiltrate cells in the different histopathological types of esophageal cancer. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2008; 46: 471–478
- [34] Murawaki Y., Ikuta Y., Okamoto K., Mimura K., Koda M., Kawasaki H.: Plasma matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) in patients with hepatocellular carcinoma. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 2000; 108: 351–357
- [35] Nagase H., Woessner J.F Jr: Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 21491–21494
- [36] Nebeshima K., Inoue T., Shima Y., Sameshima T.: Matrix metalloproteinases in tumor invasion: Role for cell migration. *Pathol. Int.*, 2002; 52: 255–264
- [37] Oberg A., Höyhty M., Tavelin B., Stenling R., Lindmark G.: Limited value of preoperative serum analyses of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal cancer. *Anticancer Res.*, 2000; 20: 1085–1091
- [38] Partridge C.A., Jeffrey J.J., Malik A.B.: A 96-kDa gelatinase induced by TNF-alpha contributes to increased microvascular endothelial permeability. *Am. J. Physiol.*, 1993; 265: L438–L447
- [39] Richards C.D., Agro A.: Interaction between oncostatin M, interleukin 1 and prostaglandin E2 in induction of IL-6 expression in human fibroblasts. *Cytokine*, 1994; 6: 40–47
- [40] Rosch T.: The new TNM classification in gastroenterology (1997). *Endoscopy*, 1998; 30: 643–649
- [41] Ruokolainen H., Pääkkö P., Turpeenniemi-Hujanen T.: Serum matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma is a prognostic marker. *Int. J. Cancer*, 2005; 116: 422–427
- [42] Sato H., Kida Y., Mai M., Endo Y., Sasaki T., Tanaka J., Seiki M.: Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene*, 1992; 7: 77–83
- [43] Schwartz G.K.: Invasion and metastases in gastric cancer: *in vitro* and *in vivo* models with clinical correlations. *Semin. Oncol.*, 1996; 23: 316–324
- [44] Seo Y.S., Park J.J., Kim J.H., Kim J.Y., Yeon J.E., Kim J.S., Byun K.S., Bak Y.T.: Usefulness of MMP-9/TIMP-1 in predicting tumor recurrence in patients undergoing curative surgical resection for gastric carcinoma. *Dig. Dis. Sci.*, 2007; 52: 753–759
- [45] Shen K.H., Chi C.W., Lo S.S., Kao H.L., Lui W.Y., Wu C.W.: Serum matrix metalloproteinase-9 level associated with stromal reaction in patients with gastric cancer. *Anticancer Res.*, 2000; 20: 1307–1310

- [46] Shim K.N., Jung S.A., Joo Y.H., Yoo K.: Clinical significance of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric cancer. *J. Gastroenterol.*, 2007; 42: 120–128
- [47] Souza-Tarla C.D., Uzuelli J.A., Machado A.A., Gerlach R.F., Tanus-Santos J.E.: Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin. Biochem.*, 2005; 38: 410–414
- [48] Tan S.Y., Wang J.Y., Shen L., Luo H.S., Shen Z.X.: Relationship between preoperative staging by endoscopic ultrasonography and MMP-9 expression in gastric carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 2007; 13: 2108–2112
- [49] Torii A., Kodera Y., Uesaka K., Hirai T., Yasui K., Morimoto T., Yamamura Y., Kato T., Hayakawa T., Fujimoto N., Kito T.: Plasma concentration of matrix metalloproteinase 9 in gastric cancer. *Br. J. Surg.*, 1997; 84: 133–136
- [50] Wang C.S., Wu T.L., Tsao K.C., Sun C.F.: Serum TIMP-1 in gastric cancer patients: a potential prognostic biomarker. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 2006; 36: 23–30
- [51] Wu C.Y., Wu M.S., Chiang E.P., Chen Y.J., Chen C.J., Chi N.H., Shih Y.T., Chen G.H., Lin J.T.: Plasma matrix metalloproteinase-9 level is better than serum matrix metalloproteinase-9 level to predict gastric cancer evolution. *Clin. Cancer Res.*, 2007; 13: 2054–2060
- [52] Wu Z.S., Wu Q., Yang J.H., Wang H.Q., Ding X.D., Yang F., Xu X.C.: Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int. J. Cancer*, 2008; 122: 2050–2056
- [53] Yasui W., Oue N., Aung P.P., Matsumura S., Shutoh M., Nakayama H.: Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer*, 2005; 8: 86–94
- [54] Ylisirmio S., Hoyhtya M., Turpeenniemi-Hujanen T.: Serum matrix metalloproteinase-2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, -2 in lung cancer-TIMP-1 as prognostic marker. *Anticancer Res.*, 2000; 20: 1311–1316
- [55] Yong V.W., Power C., Forsyth P., Edwards D.R.: Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2001; 2: 502–511
- [56] Yoshikawa T., Saitoh M., Tsuburaya A., Kobayashi O., Sairenji M., Motohashi H., Yanoma S., Noguchi Y.: Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in the plasma of patients with gastric carcinoma. A possible marker for serosal invasion and metastasis. *Cancer*, 1999; 86: 1929–1935
- [57] Yoshikawa T., Tsuburaya A., Kobayashi O., Sairenji M., Motohashi H., Yanoma S., Noguchi Y.: Prognostic value of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients with gastric cancer. *Cancer Lett.*, 2000; 151: 81–86
- [58] Zhang S., Li L., Lin J.Y., Lin H.: Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 2003; 9: 899–904
- [59] Zucker S., Hymowitz M., Conner C., Zarrabi H.M., Hurewitz A.N., Matrisian L., Boyd D., Nicolson G., Montana S.: Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1999; 878: 212–227

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.