Ekspresja metaloproteinaz MMP-1, MMP-9 oraz tkankowego inhibitora metaloproteinazy TIMP-1 w przypadkach raka endometrium oraz rozrostów błony śluzowej jamy macicy

Expression of metalloproteinases MMP-1 and MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-1 in cases of endometrial carcinoma and endometrial hyperplasia

Edyta Wlaźlak[1], Grzegorz Surkont[1], Józef Kobos[2], Wiesław Tyliński[1], Tomasz Stetkiewicz[3], Jacek Suzin[1]

[1]Klinika Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej I Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi; kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Jacek Suzin

[2]Katedra i Zakład Patomorfologii Akademii Medycznej w Łodzi, Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej, Państwowy Szpital Kliniczny nr 4 AM w Łodzi, Instytut Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi; kierownik Pracowni Patomorfologii: prof. dr hab. med. Józef Kobos

[3]Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki; kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński

Przegląd Menopauzalny 2006; 6: 363–366

Streszczenie

Nadmierna aktywacja proteolizy zewnątrzkomórkowej, związana z zaburzeniami regulacji aktywności metaloproteinaz (MMPs), obserwowana jest w wielu inwazyjnych chorobach nowotworowych.

Cel pracy: Porównanie ekspresji metaloproteinaz:MMP-1 i MMP-9 oraz tkankowego inhibitora metaloproteinazy TIMP-1 w komórkach raka endometrium oraz łagodnego rozrostu błony śluzowej jamy macicy.

Materiał i metody: Z 500 próbek pobranych z jamy macicy kobiet hospitalizowanych w I Katedrze Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi do obecnej analizy wybrano 24: 12 przypadków raka endometrium oraz 12 rozrostu endometrium bez cech atypii.

Wyniki: Ekspresja MMP-1, MMP-9 oraz TIMP-1 była wyższa u pacjentek z rakiem endometrium w porównaniu z przypadkami rozrostu. Różnice między grupami były znamienne statystycznie. W większości przypadków raka endometrium aktywność TIMP-1 była mała.

Dyskusja: Wyniki autorów wskazują na istotny wpływ interakcji pomiędzy MMPs oraz TIMPs na potencjał inwazyjny raka endometrium.

Słowa kluczowe: endometrium, rak endometrium, rozrost endometrium, macierzowe metaloproteinazy, tkankowe inhibitory metaloproteinaz

Summary

Excessive extracellular proteolysis attributable to abnormally high matrix metalloproteinases (MMPs) activities, is observed in many invasive neoplasms.

Objective: The aim of our study was to compare the expression of matrix metalloproteinases MMP-1, MMP-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 in the glandular compartment of endometrial cancer cells and in hyperplastic endometrial cells without atypia.

Material and methods: Out of the total of 500 specimens from the uterine cavity, obtained from women who have undergone D&C in the First Institute of Obstetrics and Gynecology Medical University of Lodz, we have selected twenty four: twelve cases of endometrial carcinoma and twelve – of hyperplasia without atypia.

Results: MMP-1, MMP-9 oraz TIMP-1 expression was higher in endometrial carcinoma group in comparison to endometrial hyperplasia group. The differences were statistically significant. In most of the cases of endometrial carcinoma TIMP-1 activity was small.

Adres do korespondencji:
dr med. **Edyta Wlaźlak**, Klinika Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej, I Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Szpital im. M. Madurowicza, ul. Wileńska 37, 94-029 Łódź, tel. + 48 42 686 04 71, e-mail: edytawlazlak@gmail.com

Discussion: Our results suggest that interaction between MMPs and TIMPs may play important role in invasive processes of endometrial carcinoma.

Key words: endometrium, endometrial cancer, hyperplastic endometrium, matrix metalloproteinases, MMPs, tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs

Rak endometrium jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet w krajach najbardziej rozwiniętych gospodarczo. Należy on do najczęściej występujących nowotworów złośliwych w Polsce. Zapadalność na ten nowotwór w naszym kraju wykazuje tendencje wzrostowe. Rak endometrium rozwija się najczęściej u kobiet w okresie pomenopauzalnym. Poniżej 40. roku życia występuje rzadko [1, 2]. Grupy kobiet obarczone zwiększonym ryzykiem wystąpienia raka endometrium są znane. Do chwili obecnej nie udało się opracować metod skryningowych, pozwalających na wczesne wykrywanie tego nowotworu. Nadal podstawowe znaczenie ma wystąpienie nieprawidłowego krwawienia z dróg płciowych, które prowadzi do wyłyżeczkowania jamy macicy [1–5].

Metaloproteinazy (*matrix metalloproteinases* – MMPs) należą do rodziny enzymów proteolitycznych macierzy. Wykazują zdolność degradacji przynajmniej jednego ze składników macierzy. Macierz zewnątrzkomórkowa (*extracellular matrix* – ECM) stanowi gęstą sieć różnorodnych białek i polisacharydów, wypełniających przestrzeń zewnątrzkomórkową w tkankach. Spełnia ona w organizmie funkcje zarówno strukturalne, jak i regulacyjne. Aktywność MMPs w zdrowych komórkach jest precyzyjnie regulowana na poziomie transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym. Tkankowe inhibitory metaloproteinazy (TIMPs) odgrywają ważną rolę w regulacji aktywności macierzowych metaloproteinaz.

Metaloproteinazy, w zależności od ich indywidualnych właściwości *in vitro* w stosunku do swoistości wobec substratów można podzielić na:

1. Kolagenazy (MMP-1, MMP-8), które swoiście rozczepiają kolagen głównie typu I, II, III.
2. Żelatynazy (MMP-2, MMP-9) – o degradującym działaniu wobec kolagenu typu IV w błonach podstawnych kolagenu typów V i VII oraz żelatyn.
3. Stromielizyny – mogące powodować rozkład składników ECM: fibronektyny, lamininy i proteoglikany oraz kolagenu typu IV w błonach podstawnych.
4. Metaloproteinazy błonowe (*membrane type* – MMPs-MT-MMPs), które aktywują niektóre prometaloproteinazy (proMMPs), MT1-MMP i MT2-MMP, mogą również degradować niektóre składniki EMC [6–14].

W warunkach fizjologicznych metaloproteinazy regulują procesy rozwoju płodu, warunkują homeostazę organizmu, odgrywają bardzo ważną rolę w procesach gojenia, przebudowie tkanek i angiogenezie. Nadmierna aktywacja proteolizy zewnątrzkomórkowej, związana z zaburzeniami regulacji aktywności MMPs, obserwowana jest w wielu chorobach nowotworowych, w procesach miażdżycowych, owrzodzeniach, w zapaleniu stawów [7, 8, 10, 15–18]. Jedną z cech komórek nowotworów złośliwych, pozwalającą na inwazję, jest wytwarzanie enzymów proteolitycznych. Umożliwiają one pokonywanie barier fizycznych, jakie znajduje na swojej drodze komórka nowotworowa. Jedną z takich barier jest macierz zewnątrzkomórkowa. Degradacja składników ECM zachodzi dzięki aktywności wielu enzymów proteolitycznych, wśród których ważną grupę stanowią metaloproteinazy. Tworzą one jeden system proteolityczny wraz z ich inhibitorami – TIMPs. Ich działanie jest ściśle związane z regulacją ekspresji kodujących je genów. Metaloproteinazy nasilają inwazję nowotworu przez ich zaangażowanie w degradację zewnątrzkomórkowej macierzy oraz w proces wzrostu komórek, a także napływ czynników wzrostu i cytokin [7, 9, 10, 12, 17].

Cel pracy

Porównanie ekspresji metaloproteinaz MMP-1 i MMP-9 oraz tkankowego inhibitora metaloproteinazy TIMP-1 w komórkach raka endometrium oraz łagodnego rozrostu błony śluzowej jamy macicy.

Materiał i metody

Z 500 próbek pobranych z jamy macicy kobiet hospitalizowanych w I Katedrze Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi do obecnej analizy wybrano 24: 12 przypadków raka endometrium oraz 12 łagodnego rozrostu endometrium.

Przy użyciu technik immunohistochemicznych oceniano ekspresję MMP-1, MMP-9 i TIMP-1. Zastosowano przeciwciała monoklonalne przeciwko MMP-1, MMP-9 i TIMP-1 pozyskane od myszy, wyprodukowane przez Novocastra, zgodnie z protokołem. W badaniach wykorzystano mikroskop MICROPHOT-FXA firmy NIKON oraz Multi Scan Base V 8.08 firmy Computer Scanning System Ltd. Próbki oceniano używając powiększenia 400 razy. Intensywność ekspresji białek MMP-1, MMP-2 i TIMP-1 była liczona półilościowo zgodnie ze skalą:

0 – brak ekspresji
1– mała ekspresja
2 – średnia ekspresja
3 – duża ekspresja.

Analiza statystyczna

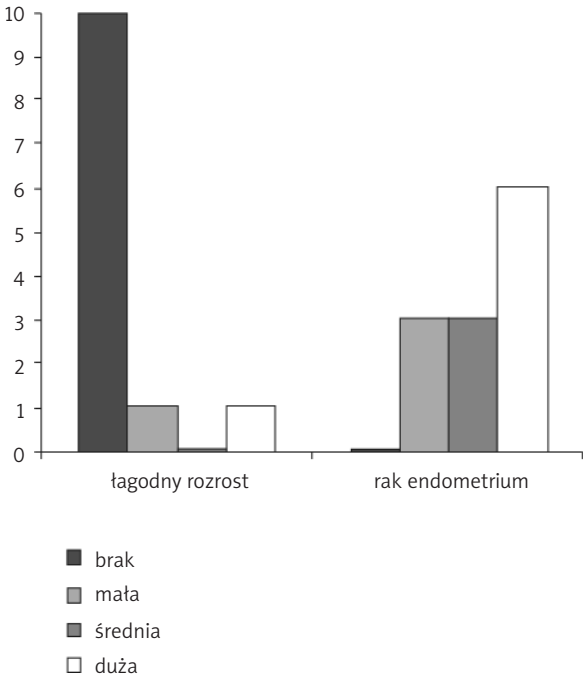
Analizę statystyczną zebranych danych przeprowadzono przy użyciu programu SYSTAT (wersja 5.03 SYSTAT Inc., Evaston, Illinois, USA licencja nr DA021594). Użyto testu Kruskala-Wallisa oraz testu Manna-Whitney'a. Korelacja między grupami była badana przy użyciu testu Persona. Pod uwagę brano wyniki, dla których znamienność statystyczna wynosiła p<0,05.

Wyniki

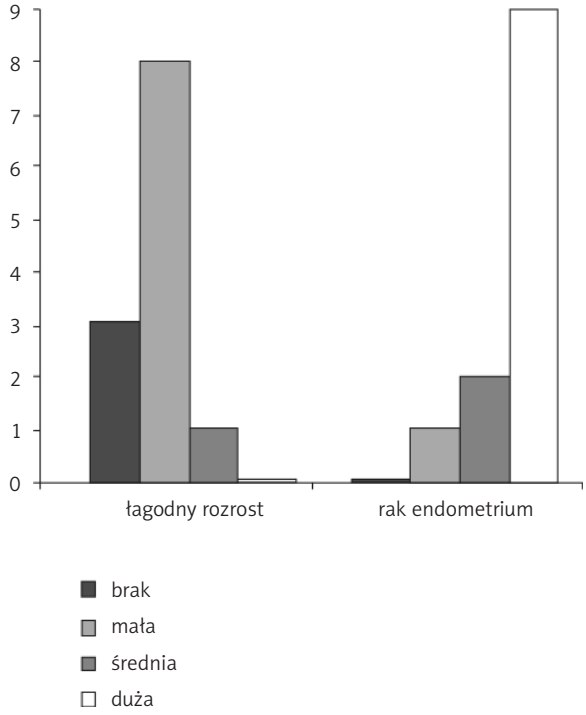
U wszystkich pacjentek z rakiem endometrium wykryto ekspresję białka MMP-1. U 75% kobiet w tej grupie stwierdzono dużą bądź średnią ekspresję. W większości przypadków rozrostu endometrium nie stwierdzono ekspresji MMP-1 (ryc. 1.). Różnice między grupami były znamienne statystycznie (p<0,005).

We wszystkich przypadkach raka endometrium wykryto ekspresję MMP-9. U 75% kobiet w tej grupie stwierdzono dużą ekspresję białka MMP-9. U pacjentek z łagodnym przerostem endometrium wykazano w większości przypadków małą ekspresję MMP-9 (ryc. 2.). Różnice między grupami były znamienne statystycznie (p<0,005).

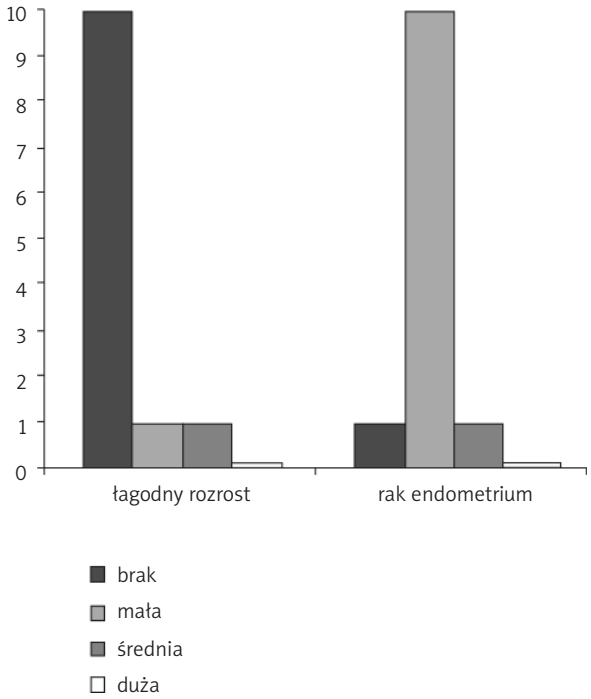
U większości pacjentek z rakiem endometrium wykazano małą ekspresję TIMP-1. W większości przypadków rozrostu endometrium nie w stwierdzono ekspresji białka TIMP-1. Różnice między grupami były znamienne statystycznie (p<0,005).



Ryc. 1. Rozkład intensywności ekspresji białka MMP-1 u pacjentek z rozrostem błony śluzowej jamy macicy i rakiem endometrium



Ryc. 2. Rozkład intensywności ekspresji białka MMP-9 u pacjentek z łagodnym rozrostem endometrium i rakiem endometrium



Ryc. 3. Intensywność ekspresji białka TIMP-1 u pacjentek z łagodnym rozrostem endometrium i rakiem endometrium

Dyskusja

Inwazja wielu komórek nowotworowych jest ułatwiona przez degradację zewnątrzkomórkowej macierzy przez białka z rodziny MMPs. Ekspresja MMP-1 została wykazana na przykład w nowotworach głowy i szyi. Ekspresja MMP-9 koreluje z ekspresją MMP-1 [(19].

Wyniki badań prowadzonych na komórkach nowotworowych *in vitro* i *in vivo* sugerują, że potencjał inwazyjny nowotworu może być zależny od interakcji MMP-TIMP, gdzie przewaga aktywności wybranych MMP zwiększa ów potencjał, a nadmiar białek TIMP zmniejsza lub znosi inwazyjność. Jednym z mechanizmów regulacji aktywności MMP jest hamowanie aktywności przez białka TIMP. Dotychczas znane są 4 geny kodujące białka, określane jako TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4. Cząsteczki TIMP-1 i TIMP-2 tworzą niekowalencyjne kompleksy z białkami MMP w stosunku molowym 1:1. Chociaż zarówno TIMP-1, jak i TIMP-2 hamują aktywność wszystkich MMP. Okazuje się, że TIMP-2 ma większe powinowactwo do MMP-2 i MMP-9 niż TIMP-1, natomiast TIMP-1 ma 2 razy większe powinowactwo do MMP-1 niż TIMP-2. W wielu chorobach nowotworowych obserwuje się zmianę poziomu ekspresji następujących metaloproteinaz: MMP-1, MMP-2, MMP-3 oraz MMP-9, której konsekwencją jest zmiana poziomu kodowanego białka. Podwyższony poziom tych białek jest skorelowany z krótszym okresem bez nawrotu choroby i krótszym czasem przeżycia u chorych na różne nowotwory. TIMP-1 i TIMP-2 wiążą się z proMMP-9 i proMMP-2, przez co blokują inwazję potencjalnych komórek nowotworowych *in vitro* i przerzutów *in vivo*. Poszerzenie wiedzy o roli białek MMP i TIMP w procesach inwazji nowotworów może przyczynić się do rozwoju terapii opartych na działaniu przeciwinwazyjnym [7–10, 17, 19, 20].

W kilku pracach odnotowano wpływ MMPs na rozwój gruczołowego raka endometrium [20, 21]. W badanych przez nas próbkach raka endometrium w większości przypadków wykazano dużą bądź średnią ekspresję MMP-1 i MMP-9, w przeciwieństwie do pacjentek, u których rozpoznano rozrost endometrium, gdzie najczęściej obserwowano małą ekspresję MMP-1 i MMP-9, bądź jej brak. W kilku pracach [9, 10, 20, 21] wykazano, że ekspresja MMP-9 koreluje z histopatologicznym stopniem złośliwości nowotworu oraz jego zdolnością do tworzenia przerzutów odległych. W naszych analizach wykazano, że ekspresja TIMP-1 u kobiet z rakiem endometrium jest mała. U większości pacjentek z rozrostem endometrium bez cech atypii ekspresji TIMP-1 nie stwierdzono. Nasze wyniki wskazują na istotną rolę interakcji MMPs oraz TIMPs na potencjał inwazyjny raka endometrium.

Zrealizowano w ramach grantu KBN nr 507-11-266 oraz pracy własnej nr 502-11-202.

Piśmiennictwo

1. Hacker NF. Uterine cancer. In: Berek JS, Hacker NF. Practical Gynecologic Oncology. Wiliams and Wilkins, 1994, 285-326.
2. Spaczyński M. Epidemiologia nowotworów narządów płciowych. W: Spaczyński M. Onkologia ginekologiczna. Urban i Partner 1997, 9-16.
3. Gambacciani M, Monteteleone P, Ciaponi M. Clinical usefulness of endometrial screening by ultrasound in asymptomatic postmenopausal women. Maturitas 2004; 48: 421-4.
4. Gerber B. Krause A. Muller H. Ultrasonographic detection of asymptomatic endometrial cancer in postmenopausal patients offers no prognostic advantage over symptomatic disease discovered by uterine bleeding. Eur J Cancer 2001; 37: 64-71.
5. Valentin L. High-quality gynecological ultrasound can be highly beneficial, but poor-quality gynecological ultrasound can do harm. Ultrasound Obstet Gynecol 1999; 13: 1-7.
6. Curry TE, Osteen KG. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. Biol Reprod 2001; 64: 1285-96.
7. Clark IM, Swingler TE, Young DA. Acetylation in the regulation of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression. Front Biosci 2007; 12: 528-35.
8. Verstappen J, von den Hoff JW. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs): Their biological functions and involvement in Oral Disease. J Dent Res 2006; 85: 1074-84.
9. Balduyck M, Zerimech F, Gouyer V. Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro. Clin Exp Metastasis 2000; 18: 171-8.
10. Baruch RR, Melinscak H, Lo J. Altered matrix metalloproteinase expression associated with oncogene-mediated cellular transformation and metastasis formation. Cell Biol Int 2001; 25: 411-20.
11. Borden P, Heller R. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. Crit Rev Eukaryotic Gene Expr 1997; 7: 159-178.
12. Dano K, Romer J, Nielsen BS. Cancer invasion and tissue remodeling – cooperation of protease systems and cell types. APMIS 1999; 107: 120-7.
13. Henriet P, Blavier L, DeClerck YA. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) and proliferation. APMIS 1999; 107: 111-9.
14. Muller D, Li DQ, Tseng SC. Regulation of collagenase, stromelysin and gelatinase B in human conjunctival and conjunctivochalasis fibroblasts by interleukin 1-beta and tumor necrosis factor alpha. Invest. Ophthalmol Vis Sci 2000; 41: 2922-9.
15. Kunz J. Matrix Metalloproteinases and Atherogenesis in Dependence of Age. Gerontology 2006; 17: 63-73.
16. Lesauskaite V, Epistolato MC, Castagnini M, et al. Expression of matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors, and osteopontin in the wall of thoracic and abdominal aortas with dilatative pathology. Hum Pathol 2006; 37: 1076-84.
17. Staack A, Badendieck S, Schnorr D, et al. Combined detection of plasma MMP2, MMP9 and TIMP1 improves the non-invasive detection of transitional cell carcinoma of the bladder. BMC Urol 2006; 10: 6-19.
18. Ulug U., Godlman S., Ben-Shlomo I. Et al. Matrix metalloproteinase MMP--2 and MMP-9 and their inhibitor, TIMP-!, in human term decidua and fetal membranes: the effect of prostaglandin F2alpha and indomethacin. Mol Hum Reprod 2001; 7: 1187-93.
19. Birkedal-Hansen B, Pavelic ZP, Gluckman JL. MMP and TIMP gene expression in head and neck squamous cell carcinomas and adjacent tissues. Oral Dis 2000; 6: 376-82.
20. Graesslin O, Cortez A, Fauvet R, et al. Metalloproteinaze-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinaze-1 and -2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: a clinical-pathological correlation study. Ann Oncol 2006; 17: 637-45.
21. Maatta M., Soini Y., Liakka A, et al. Localization of MT1-MMP, TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 messenger RNA in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. Am J Clin Pathol 2000; 114: 402-11.