

Metaloproteinazy (MMP) stanowią grupę zależnych od cynku endopeptydaz, których podstawową funkcją jest przebudowa składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Enzymy te syntetyzowane są w komórkach i uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w formie nieaktywnej (proMMP). Aktywacja enzymu następuje przez proteolityczne cięcie w rejonie propeptydu. Aktywność metaloproteaz jest precyzyjnie regulowana na poziomie transkrypcji, translacji oraz poprzez endogenne inhibitory, takie jak α 2-makroglobulina i tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP).

W warunkach fizjologicznych metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej uczestniczą w procesach, takich jak embriogeneza, angiogeneza, gojenie ran, biorą udział także w agregacji płytek, regulują metabolizm jonów. Zmiany aktywności metaloproteinaz zaobserwowano w wielu stanach patologicznych, takich jak procesy zapalne, choroby degeneracyjne oraz w nowotworach. Metaloproteinazy odgrywają istotną rolę w progresji nowotworu, poprzez pobudzenie wzrostu komórek raka, migrację, inwazję, tworzenie przerzutów i nowych naczyń krwionośnych. Wydzielanie i aktywność MMP jest zwiększone prawie we wszystkich typach nowotworów u ludzi i koreluje ze stopniem zaawansowania, większą inwazyjnością, zdolnością do dawania przerzutów, a także z krótszym okresem przeżycia.

Pośród różnych MMP szczególnie MMP-2 (żelatynaza A) i MMP-9 (żelatynaza B) odgrywają ważną rolę w procesie inwazji nowotworów, ponieważ mają zdolność do degradacji kolagenu typu IV, głównego składnika błony podstawnej.

Słowa kluczowe: metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej, MMP, rak piersi.

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej – charakterystyka biochemiczna i kliniczna wartość oznaczania u chorych na raka piersi

Matrix metalloproteinases – biochemical characteristics and clinical value determination in breast cancer patients

Izabela Śliwowska, Zygmunt Kopczyński

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Katedra Onkologii,
Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, Poznań

Wstęp

Rak gruczołu piersiowego jest obecnie najczęściej występującym nowotworem u kobiet, zwłaszcza w krajach Unii Europejskiej i w Stanach Zjednoczonych, gdzie rocznie na raka piersi zapada 6–7 proc. kobiet. W krajach tych obserwuje się spadek liczby zgonów z powodu raka piersi, mimo że współczynniki zachorowania nie uległy zmianie [1].

W Polsce rak piersi zajmuje również pierwsze miejsce zarówno pod względem zachorowalności, jak i umieralności wśród kobiet [2].

Wyzwaniem dla ochrony zdrowia staje się usprawnienie wczesnej diagnostyki choroby nowotworowej i wdrożenie skuteczniejszego leczenia. Obok zabiegu operacyjnego stosuje się leczenie uzupełniające, najczęściej chemio-, hormono- lub radioterapię. W związku z ograniczoną efektywnością leczenia uzupełniającego, duże nadzieje wiąże się z nowymi lekami, które ograniczą rozwój przerzutów raka piersi.

Rak piersi ma duże skłonności do rozsiewu drogą naczyń krwionośnych. Ogniska przerzutów odległych raka piersi najczęściej spotyka się w kościach, płucach, wątrobie i mózgu [3]. Warunkiem niezbędnym do zapoczątkowania procesu tworzenia przerzutu jest nabycie przez komórkę nowotworową fenotypu inwazyjnego. Determinuje on zdolność komórek nowotworowych do przemieszczania się, naciekania otaczających tkanek i tworzenia przerzutów w miejscach odległych od ogniska pierwotnego. W procesie progresji komórki nowotworowe muszą pokonać bariery w postaci błony podstawnej (*basement membrane* – BM), macierzy zewnątrzkomórkowej (*extracellular matrix* – ECM) i ściany naczyń krwionośnych [4]. W procesie inwazji komórek nowotworowych szczególną rolę spełniają składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak glikoproteiny, wpływające na adhezję komórek, kolageny i elastyna, tworzące włókniste rusztowanie macierzy zewnątrzkomórkowej oraz proteoglikany, ułatwiające migrację komórek. Aby komórki mogły przejść przez gęstą sieć elementów strukturalnych macierzy zewnątrzkomórkowej, niezbędna jest proteoliza poszczególnych składników ECM. Klasycznym przykładem proteolizy podłoża jest przemieszczanie się komórek przez błonę podstawną, która jest jedną z form macierzy zewnątrzkomórkowej i jednocześnie ważną barierą dla migrujących komórek [4]. Istotne ubytki w błonie podstawnej są związane z inwazją komórek rakowych i są cechą charakterystyczną wszystkich typów nowotworów, podczas gdy nieinwazyjne guzy mają nienaruszoną BM [5]. W migracji komórek prawidłowych oraz w procesie powstawania przerzutów nowotworowych ważną rolę pełnią enzymy z grupy metaloproteinaz (*matrix metalloproteinases* – MMPs) [4, 6–9].

The matrix metalloproteinases (MMPs) constitute a group of zinc-dependent endopeptidases, whose primary function is remodelling of components in the extracellular matrix. These enzymes are synthesized in cells, and secreted to the extracellular space as an inactive form (proMMP). Activation of the enzyme is followed by the cleavage in the propeptide region. The activity of metalloproteinases is strictly regulated at the transcriptional, translation levels and by endogenous inhibitors, including α 2-macroglobulin and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs).

Under physiological conditions matrix metalloproteinases are involved in processes i. e. embryogenesis, angiogenesis, wound healing and in platelet aggregation, regulation of ion metabolism. There is evidence that matrix metalloproteinases activity changes in many pathological conditions, including inflammatory, degenerative disorders and in cancer.

Metalloproteinases play an important role in tumor progression by increasing cancer-cell growth, migration, invasion, metastasis and angiogenesis. The expression and activity of MMPs are increased in almost every type of human cancer, and this correlates with tumor stage, increased invasion and potential metastasis, and shortened survival.

Among the different MMPs, especially MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) play an important role in cancer invasion because of their ability to degrade type IV collagen, a major component of basement membranes.

Key words: matrix metalloproteinases, MMP, breast cancer.

Metalloproteinazy odgrywają istotną rolę zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych w organizmie człowieka [4, 10, 11]. Enzymy te uczestniczą w migracji komórek w czasie wzrostu, w budowie tkanki podporowej wszystkich narządów wewnętrznych, stymulują wzrost neurytów [12]. Biorą udział w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych, są niezbędne do prawidłowego rozwoju szkieletu oraz odnowy tkanki łącznej. Warunkują cykliczne zmiany w endometrium oraz zmiany zachodzące w czasie ciąży, podczas porodu i połogu [13, 14]. Metalloproteinazy umożliwiają migrację komórek odpowiedzi zapalnej do uszkodzonych tkanek, uwalniają cytokiny i ich receptory z błon komórkowych, dzięki czemu dochodzi do gojenia ran i tworzenia blizn [4, 5, 14, 15]. Regulują także czynność płytek krwi, metabolizm jonu chlorkowego w komórkach nabłonkowych dróg oddechowych [10, 16]. Metalloproteinazy i ich inhibitory uczestniczą w powstawaniu zawału mięśnia sercowego oraz tętniaków aorty [17, 18]. Inne jednostki chorobowe, w których stwierdzono nieprawidłowe aktywności metalloproteinaz to m.in. choroby autoimmunologiczne, choroba Alzheimera, stwardnienie rozsiane, stwardnienie zanikowe boczne, szpiczak mnogiej, czerniak złośliwy i marskość wątroby [12, 19].

Metalloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej

Charakterystyka biochemiczna

Metalloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej, nazywane również kolagenazami lub matryksynami, stanowią grupę metalozależnych enzymów proteolitycznych, należących do endopeptydaz. Enzymy te:

- są zdolne do degradacji co najmniej jednego składnika macierzy,
- zawierają atom cynku (Zn^{2+}), który pełni rolę katalityczną i strukturalną w cząsteczce enzymu,
- syntetyzowane są w komórkach w formie preproenzymu i uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jako proenzymy,
- inaktywowane są przez tkankowe inhibitory metalloproteinaz (*tissue inhibitors of metalloproteinases* – TIMP) [4, 20, 21].

Dotychczas zidentyfikowano, opisano i przypisano odpowiedni numer klasyfikacyjny 28 metalloproteinazom, z których 22 MMPs występują u ludzi. Substratami dla metalloproteinaz są białka macierzy zewnątrzkomórkowej, np. fibronektyna, witronektyna, laminina, różne typy kolagenu, entacyna, tenascyna, agrecan [4, 9, 22].

Metalloproteinazy są aktywne w obojętnym lub lekko zasadowym pH w obecności jonów wapnia oraz wykazują duży stopień podobieństwa strukturalno-czynnościowego, są zdolne do degradacji i przebudowy białek przestrzeni pozakomórkowej i błony podstawnej, tj. kolagenu, lamininy, fibronektyny, elastyny i proteoglikanów [9, 22]. Jako jedyne trawią kolagen typu IV, stanowiący szkielet błony podstawnej naczyń. Poprzez uszkodzoną błonę podstawną macierzy mogą przedostawać się komórki śródbłonna oraz komórki nowotworowe, które są źródłem ognisk przerzutowych [4, 5, 9].

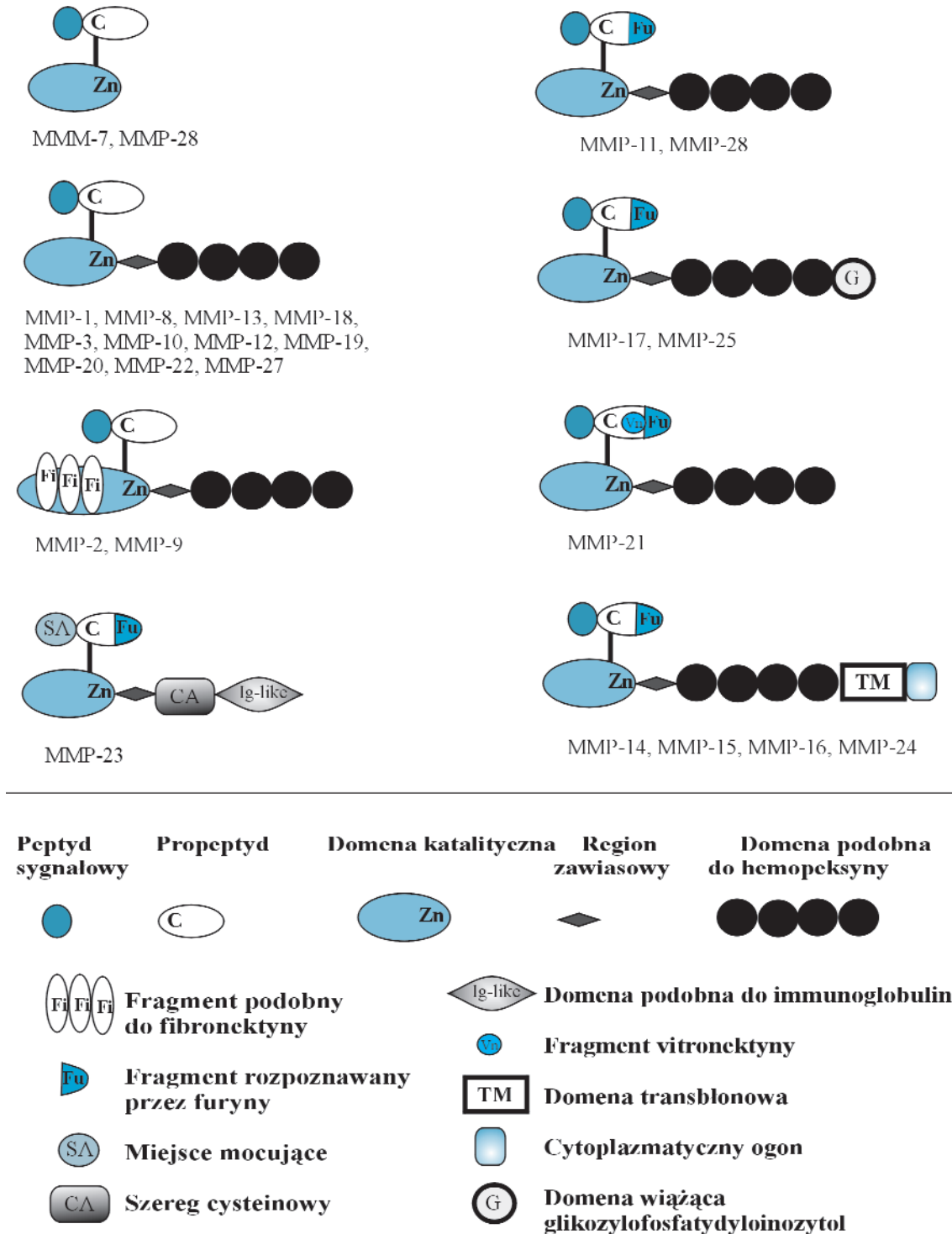
Metalloproteazy są syntetyzowane przez fibroblasty i inne typy komórek tkanki łącznej, leukocyty, monocyty i makrofagi, granulocyty obojętnochłonne, komórki śródbłonna i komórki nowotworowe [4, 23, 24]. Wykazano, że MMP-7 wydzielana jest przez komórki raka żołądka, piersi, płuc [25], MMP-8 przez komórki raka płaskonabłonkowego (*squamous cell carcinoma* – SCC) [26], a MMP-2, MMP-9 i MMP-14 mogą być produkowane przez komórki nabłonkowe różnych nowotworów [27]. Niektórzy badacze uważają, że metalloproteinazy w tkankach nowotworowych wytwarzane są w dużych ilościach przez pobudzone komórki zrębu otaczającego nowotwór [27].

Wydzielanie metalloproteinaz przez komórki inicjują m.in. śródbłonkowy czynnik wzrostu (*vascular-endothelial growth factor* – VEGF), czynnik martwicy nowotworu alfa (*tumor necrosis factor- α* – TNF- α), interleukina-1, prostatynglandyny D_2 , E_2 , $F_2\alpha$ oraz fagocytoza, natomiast hamują ich wydzielanie hormony steroidowe i transformujący czynnik wzrostu beta (*transforming growth factor- β* – TGF- β) [23, 24]. Komórki nowotworowe i niektóre komórki prawidłowe

we produkują specyficzny czynnik stymulujący syntezę metaloproteinaz przez fibroblasty (*extracellular matrix metalloproteinase inducer* – EMMPRIN) [9, 28]. Cząsteczka EMMPRIN jest zlokalizowana na powierzchni komórki nowotworowej i stymuluje znajdujące się w pobliżu fibroblasty do produkcji kolagenazy, żelatynazy A i stromielizyny 1 [9]. EMMPRIN zwiększa także produkcję aktywatorów prozelatynazy A, MT-1-MMP oraz MT-2-MMP w miejscu, gdzie komórka nowotworowa kon-

taktuje się z fibroblastem, EMMPRIN stymuluje okołokomórkową proteolizę ECM poprzez aktywację prozelatynazy A na powierzchni komórki. Zwiększoną ilość EMMPRIN stwierdzono na powierzchni komórek nowotworowych w pęcherzu moczowym, piersiach, płucach i przewodzie pokarmowym [9].

W budowie chemicznej metaloproteinaz można wyróżnić charakterystyczne domeny, wspólne dla całej rodziny oraz domeny decydujące o odmiennych właściwościach poszczegól-



Ryc. 1. Schemat budowy metaloproteinaz w formie latentnej [4, 32]
Fig. 1. Structure of metalloproteinases as latent zymogene [4, 32]

gólnych enzymów. Budowa oraz swoistość substratowa były podstawą wcześniej stosowanego podziału metaloproteinaz na kilka grup, tj. kolagenazy, żelatynazy, stromielizyny, matrylizyny [4, 6, 21, 24, 29]. Wszystkie metaloproteinazy zawierają peptyd sygnałowy, propeptyd oraz domenę katalityczną (ryc. 1). Sekwencja sygnałowa, która znajduje się na końcu łańcucha z grupą aminową, decyduje o sekrecji proenzymu z siateczki śródplazmatycznej do macierzy zewnątrzkomórkowej i ulega proteolizie na błonie komórkowej. Propeptyd liczy ok. 80 aminokwasów i zbudowany jest z sekwencji PRCG(V/N)PD. Znajdująca się wewnątrz tej sekwencji cysteina wiąże atom cynku i utrzymuje enzym w stanie nieaktywnym. Kolejna domena, zwana domeną katalityczną, składa się z ok. 170 aminokwasów. W obrębie tej domeny znajduje się miejsce aktywne, zawierające sekwencję aminokwasów (HEXXHXXGXXH), w której obecne 3 cząsteczki histydyny (H) wiążą atom cynku (ryc. 1) [4, 9, 24].

Metaloproteinazy o najkrótszym łańcuchu polipeptydowym (MMP-7, MMP-28) składają się tylko z peptydu sygnałowego, domeny katalitycznej i propeptydu. Pozostałe metaloproteinazy zawierają dodatkowo domenę zakończoną grupą karboksylową przypominającą budowę hemopeksyny (globulinę wiążącą hem i jego pochodne). Domena ta liczy ok. 210 aminokwasów i decyduje o wiązaniu białek macierzy zewnątrzkomórkowej, uczestniczy w procesie aktywacji i inhibicji enzymu [4, 30]. Pomiędzy domeną C-kończową i domeną katalityczną znajduje się różnej długości fragment polipeptydowy, zwany regionem zawiasowym, który pełni funkcję łącznika i decyduje o specyficzności substratowej enzymów (ryc. 1) [4, 9, 22].

Żelatynazy (MMP-2, MMP-9) w obrębie domeny katalitycznej zawierają fragment podobny do fibronektyny, czyli trzy powtórzone sekwencje aminokwasów wiążące enzym z kolagenem i elastyną. Żelatynaza B posiada także domenę kolagenu typu V [4, 22].

Natomiast stromielizyna – 3 (MMP-11), MMP-23, MMP-28 i metaloproteinazy typu błonowego zawierają dodatkowo sekwencję rozpoznawaną przez furynę, enzymy konwertujące, co prowadzi do aktywacji enzymu jeszcze przed jego sekrecją [4, 22]. W cząsteczce metaloproteinaz błonowych występuje również domena transbłonowa (ryc. 1) [4, 21–23, 31, 32].

Aktywacja metaloproteinaz

Aktywność metaloproteinaz w warunkach fizjologicznych kontrolowana jest na kilku poziomach, m.in. na poziomie transkrypcji genów, translacji i aktywacji proenzymów oraz poprzez inhibitory tkankowe [4, 19, 29, 33]. W badaniach *in vitro* wykazano stymulację transkrypcji genów wielu metaloproteinaz przez czynniki wzrostu, cytokiny, estry forbolu oraz onkogeny, które indukują ekspresję protoonkogenów *fas* i *jun*. Produkty tych genów tworzą czynniki transkrypcyjne AP-1, które łączą się ze specyficzną sekwencją DNA w rejonie promotorowym genu i stymulują proces transkrypcji genu metaloproteinazy [19, 29, 33].

Kolejnym poziomem kontroli aktywności metaloproteinaz jest aktywacja proenzymu pod wpływem enzymów proteolitycznych, plazminy, jonów metali, oksydantów, deter-

gentów [4, 23]. Aktywność proteolityczna metaloproteinaz zależy także od specyficzności substratowej, pH środowiska oraz obecności endogennych inhibitorów z rodziny tkankowych inhibitorów metaloproteinaz – TIMP oraz inhibitorów proteaz serynowych [4, 6, 9].

Metaloproteinazy są syntetyzowane w postaci pre-proenzymu. Odcięcie domeny sygnałowej powoduje uwolnienie MMP w formie zymogenu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Dzięki domenie propeptydowej metaloproteinazy utrzymywane są w formie nieaktywnej (proenzym, forma latentna) i w takiej formie znajdują się we wszystkich tkankach organizmu. W proenzymie cynk w centrum aktywnym zablokowany jest wiązaniem koordynacyjnym przez cysteinę N-końcowej części łańcucha białkowego [4, 9]. Aktywacja metaloproteinaz zwana *cystein-switch*, polega na odcięciu propeptydu i odsłonięciu miejsca aktywnego poprzez rozerwanie wiązania między grupą tiolową cysteiny i atomem cynku. Proces ten powoduje zmiany konformacyjne cząsteczki metaloproteinaz, grupa SH cysteiny zostaje zastąpiona cząsteczką wody. Następnie dochodzi do usunięcia propeptydu i wyniku autokatalizy lub proteolizy przy udziale innych enzymów i odsłonięcia centrum aktywnego z atomem Zn (ryc. 2.). W ten sposób powstaje enzym o mniejszej masie cząsteczkowej (o ok. 10 kDa) od formy latentnej [9, 21, 23].

Aktywacja MMPs może także zachodzić przy udziale aktywnych form metaloproteinaz oraz pod wpływem proteinaz serynowych obecnych w środowisku pozakomórkowym, np. proteinazy systemu aktywacji plazminogenu do plazminy, elastazy leukocytarnej, kalikreiny, katepsyny G oraz trypsyny wydzielanej przez komórki nowotworowe (ryc. 2.) [5, 9, 23].

Proces aktywacji proMMP poprzez zmiany konformacyjne poprzedzające odłączenie peptydu regulatorowego może zachodzić w wyniku działania różnych związków nieorganicznych (cyjanku, jodku potasowego, siarczanu dodecyłu sodu), związków organicznych zawierających rtęć (octan 4-aminofenylortęciowy – APMA), mocznika oraz pod wpływem stresu oksydacyjnego (ryc. 2.) [23, 34].

Wykazano, że MMP-2 i MMP-13 mogą ulegać aktywacji pod wpływem metaloproteinaz błonowych (*membrane type metalloproteinases* – MT-MMP) [9, 35–38]. Jednak ten sposób aktywacji możliwy jest tylko w przypadku niskiego stężenia tkankowego inhibitora metaloproteinaz. Wysokie stężenie TIMP-2 blokuje wszystkie cząsteczki metaloproteinaz błonowych i hamuje aktywację proenzymów. Degradacja tkanek w chorobach przebiegających ze zwiększoną aktywnością metaloproteinaz często jest wynikiem zachwiania równowagi pomiędzy aktywnością MMP i tkankowych inhibitorów metaloproteinaz [4, 9, 37].

Obniżenie aktywności MMP można uzyskać poprzez zablokowanie genów odpowiedzialnych za wytwarzanie odpowiednich metaloproteinaz lub genów odpowiedzialnych za wytwarzanie TIMPs [39]. Dotychczas poznano 4 geny kodujące białka zwane tkankowymi inhibitorami metaloproteinaz (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 oraz TIMP-4) [4, 6, 40].

Tkankowe inhibitory metaloproteinaz zbudowane są z dwóch domen. Domena N-końcowa identyczna u wszyst-

kich inhibitorów, wiąże się z centrum aktywnym metaloproteinaz blokując ich aktywność. Natomiast domena C-końcowa wpływa na połączenie inhibitora z fragmentem podobnym do hemopeksyny metaloproteinaz [41].

Tkankowe inhibitory metaloproteinaz regulują degradację macierzy zewnątrzkomórkowej zarówno przez eliminację proteinaz, jak i hamowanie aktywacji MMP, tworząc wiązania niekowalencyjne z aktywnymi lub latentnymi formami metaloproteinaz w stosunku molowym 1:1 [4, 6, 22, 40]. Mechanizm hamowania aktywacji metaloproteinaz polega na zablokowaniu przez TIMP możliwości odłączenia N-końcowego fragmentu metaloproteiny [22, 23, 41].

Głównymi inhibitorami metaloproteinaz są: TIMP-1 – rozpuszczalna glikoproteina o masie cząsteczkowej 28 kDa, produkowana przez większość komórek oraz TIMP-2 – rozpuszczalne białko o masie 21 kDa, produkowane przez fibroblasty i komórki endotelialne. Wykazano, że cząsteczka TIMP-2 ma większe powinowactwo do MMP-2, a TIMP-1 do MMP-9 [22, 23].

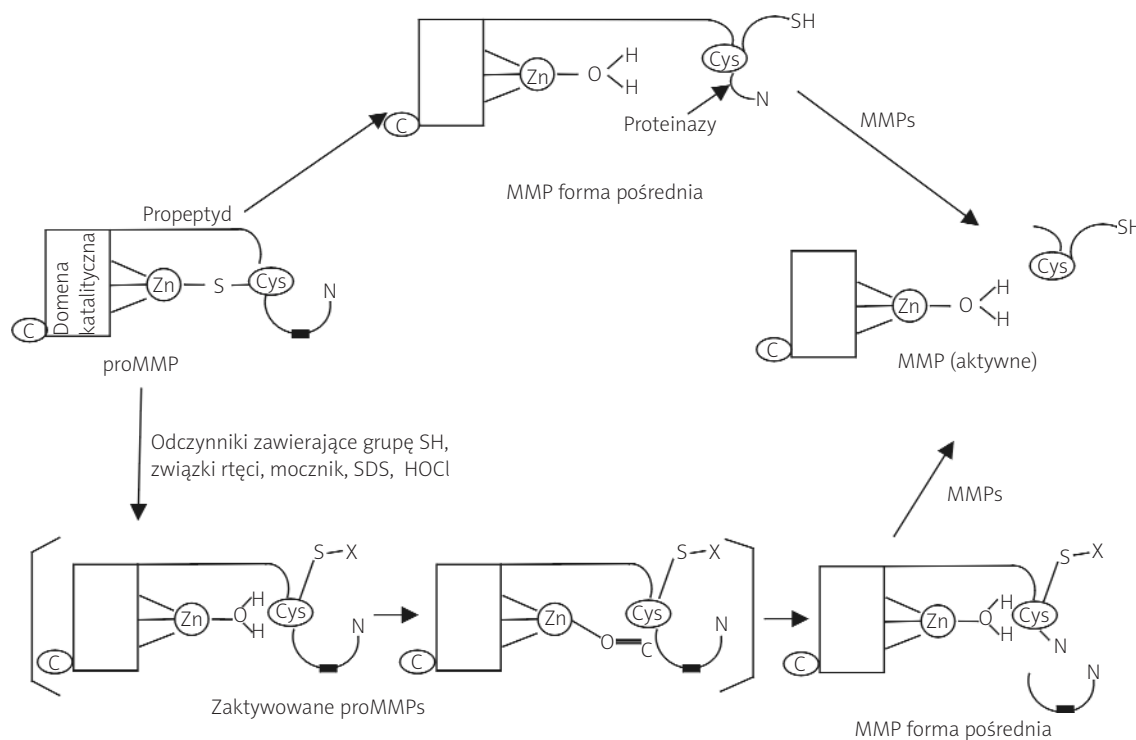
Tkankowe inhibitory metaloproteinaz odgrywają ważną rolę w ustaleniu równowagi pomiędzy procesem degradacji i syntezy macierzy zewnątrzkomórkowej. Podczas nadmiernego wydzielania MMP, np. przez komórki nowotworów złośliwych obserwuje się także zwiększone wydzielanie TIMP. Nadmierna synteza metaloproteinaz w porównaniu do inhibitorów tkankowych powoduje nasilenie procesów degradacyjnych i tym samym prowadzić może do migracji komórek nowotworowych. Wykazano, że inhibitory tkankowe metaloproteinaz oprócz hamowania MMPs, mogą także stymulować rozwój nowotworów, a podwyższony poziom TIMP-1

i TIMP-2 w tkance nowotworowej pogarsza rokowanie u chorych na raka pęcherza moczowego i raka żołądka [42, 43].

Niespecyficznym, naturalnym inhibitorem wszystkich MMP jest α 2-makroglobulina. Jednak duże rozmiary tej cząsteczki ograniczają zdolność jej penetracji pozanacyniowej i tym samym zmniejszają efekt hamowania metaloproteinaz [44].

Syntezę metaloproteinaz hamują także cytokiny przeciwzapalne – interferon gamma (IFN- γ), interleukina-4 (IL-4) oraz Dexamethason i Indometacyna. Związki te zmniejszają syntezę substancji pośredniczących w wytwarzaniu MMP, takich jak prostaglandyna E_2 (*prostaglandin* E_2 – PGE $_2$) i cykliczny adenylosinomonofosforan (*cyclic adenosine monophosphate* – cAMP) [4, 33].

Pozaustrojowymi inhibitorami metaloproteinaz są antybiotyki należące do grupy tetracyklin (doxycyklina, oksytetracyklina, minocyklina) podawane w niskich dawkach, a także chlorheksydyna [45, 46]. Z inhibitorów syntetycznych batimastat (BB-94) i marimastat (BB-2516), związki zbliżone budową do kolagenu, są w fazie prób klinicznych [47]. Związki hamujące aktywność MMPs to także: Trochate (Ro 32-3555), AG 3340, BAY 12-9566 oraz antybiotyki, głównie półsyntetyczne pochodne tetracyklin i antybiotyki antracyklinowe [23, 48, 49]. Dodatkowe badania na zwierzętach wykazały, że syntetyczne inhibitory stosowane we wczesnych stadiach zaawansowania choroby nowotworowej, łącznie z konwencjonalnymi metodami leczenia lub jako uzupełniające leczenie pooperacyjne zapobiegają powstawaniu mikroprzerzutów, prowadzących do rozsiewu i nawrotu choroby [4]. Duże nadzieje wiąże się ze związkiem BMS-27291 – niebiałkowym, doustnym inhibitorem metaloproteinaz o szerokim zakresie działania, który nie wykazuje toksycznego



Ryc. 2. Aktywacja metaloproteinaz [9, 23]

Fig. 2. Activation of metalloproteinases [9, 23]

oddziaływania na mięśnie szkieletowe [50]. Naturalnie występującym czynnikiem przeciwnowotworowym jest związek otrzymywany z chrząstek rekina Neovastat (AE-941), który hamuje aktywność MMP-2, MMP-9 i MMP-12 oraz hamuje wiązanie śródbłonkowego czynnika wzrostu do komórek śródbłonka i fosforylację tyrozyny [51].

Udział metaloproteinaz w procesie powstawania przerzutów nowotworowych

Większość pacjentów, u których stwierdzono nowotwór złośliwy, umiera z powodu przerzutów. Duże rozproszenie anatomiczne umiejscowienia przerzutów i ich różnorodny skład komórkowy uniemożliwia całkowite usunięcie chirurgiczne zmian oraz zmniejsza odpowiedź na ogólnoustrojowe czynniki przeciwnowotworowe. Z tego względu ważnym zadaniem ośrodków naukowych stało się ulepszenie metod pozwalających określić stopień agresywności komórek nowotworowych oraz identyfikujących mikroprzerzuty, niedające jeszcze objawów klinicznych.

W inwazji nowotworu i procesie powstawania przerzutów istotną rolę odgrywa migracja komórek nowotworowych. Warunkiem niezbędnym w migracji komórek jest degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej przez metaloproteinazy. Migracja komórek nowotworowych może być wzmocniona poprzez nadekspresję MMP, podczas gdy nadekspresja TIMP lub zastosowanie inhibitorów MMP powoduje zmniejszenie migracji [9]. Regulacja wydzielania i lokalizacja MMP zależy od typu migracji komórek nowotworowych. Istnieją 2 typy migracji komórek: przemieszczanie się pojedynczych komórek lub w grupie [9]. Pierwszy typ migracji obserwowany jest podczas inwazji nowotworów hematopoetycznych, takich jak białaczka lub chłoniak, a także w przypadku mięsaka. Natomiast migracja grupy komórek nowotworowych utrzymujących kontakt pomiędzy sobą obserwowana jest często w czasie inwazji komórek nowotworowych dobrze lub umiarkowanie zróżnicowanych, np. raka szyjki macicy, czerniaka złośliwego [9].

Proces powstawania przerzutów nowotworowych związany jest z proteolizą błony podstawnej naczyń oraz składników macierzy zewnątrzkomórkowej, regulacją wzrostu guza zarówno w miejscu pierwotnym, jak i w miejscu powstania przerzutu.

W rozwoju nowotworu i w powstawaniu odległych przerzutów niezwykle ważną rolę spełnia proces angiogenezy, czyli tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Wykazano, że nowotwór bez dodatkowych naczyń krwionośnych może osiągnąć średnicę ok. 1–2 mm, natomiast do dalszego wzrostu miejscowego i do rozsiewu potrzebuje składników odżywczych dostarczanych przez naczynia krwionośne. Angiogeneza jest ściśle regulowana przez układ stymulatorów i inhibitorów, a rozpoczyna się od uwolnienia proteaz rozkładających błonę podstawną oraz macierz zewnątrzkomórkową. Następnie dochodzi do migracji komórek śródbłonka do przestrzeni okołonaczyniowej oraz ich proliferacji. Namnażające się komórki śródbłonka tworzą nowe naczynia krwionośne. Najważniejszym czynnikiem regulującym angiogenezę jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu – VEGF [52].

W procesie angiogenezy metaloproteinazy uczestniczą w przebudowie ECM, kontrolują aktywność czynników bio-

jących udział we wzroście komórek śródbłonkowych, ich różnicowaniu i apoptozie, wpływają na wydzielanie lub aktywację czynników proangiogennych [32, 53].

Metaloproteinazy uczestniczą w procesie przechodzenia komórek nowotworowych przez bariery macierzy zewnątrzkomórkowej, a także w modulowaniu sygnałów oddziałujących na transformację komórek, czynniki wzrostu, angiogenezę i apoptozę. Początkowo uważano, że kolagenazy typu IV uczestniczą w inwazji nowotworu poprzez niszczenie błony podstawnej. Kolejne badania wykazały, że hamowanie migracji komórek nowotworowych przez inhibitory MMP i proteiny serynowe nie eliminuje zdolności komórek raka do migracji [7, 8].

Metaloproteinazy poprzez łączenie się z białkiem wiążącym insulinopodobny czynnik wzrostu (*insulin-like growth factor-binding protein* – IGF-BP), uwalniają sam czynnik (*insulin-like growth factor* – IGF), wpływają na wydzielanie transmembranowych czynników wzrostu. Z drugiej strony MMP mogą hamować wzrost komórek raka uwalniając czynnik TGF- β [4, 6]. Metaloproteinazy hamują także reakcję immunologiczną organizmu przeciwko komórkom nowotworowym poprzez niszczenie receptorów dla interleukiny-2 na limfocytach T [4].

Zdolność przerzutowania i inwazji tkanek zdrowych jest wyznacznikiem złośliwości nowotworu. Cechy markerów przerzutowania wykazują także metaloproteinazy, a wśród nich żelatynazy [4, 7, 8, 40].

Wartość oznaczania aktywności metaloproteinaz w diagnostyce laboratoryjnej raka piersi – doświadczenia własne

Oznaczanie aktywności żelatynaz ze względu na złożoność procedur analitycznych nie zostało wdrożone do rutynowej diagnostyki laboratoryjnej. Stężenie białek żelatynaz i/lub ich aktywność można oznaczać przy użyciu metod immunohistochemicznych, immunoenzymatycznych, hybrydyzacji *in situ*, reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz metod elektroforetycznych, takich jak zymografia żelatynaz i *Western blotting* [54, 55]. Każda z tych technik wykazuje pewne ograniczenia. Za pomocą przeciwciał używanych w badaniach immunohistochemicznych nie można odróżnić form aktywnych od proform i chociaż udaje się zlokalizować białka metaloproteinaz oraz ich inhibitory w tkance, nie można jednak określić ich aktywności enzymatycznej [55]. Bardziej kosztownymi metodami immunoenzymatycznymi, w zależności od rodzaju zastosowanych przeciwciał można odróżnić aktywne formy żelatynaz od nieaktywnych.

W wielu ośrodkach oceniano wartość diagnostyczną i/lub prognostyczną testów immunoenzymatycznych do oznaczania stężenia białka metaloproteinaz w surowicy, osoczu i innych płynach ustrojowych pacjentów chorych na nowotwory [56–58]. Wyniki tych prac wykazały, że metaloproteinazy są istotnymi czynnikami progresji nowotworów, ich poziom koreluje z agresywnością choroby, ryzykiem wznnowy miejscowej oraz ryzykiem zgonu [56–59]. Ostatnie prace Talvensaari-Mattila i wsp. wykazały, że przedoperacyjny poziom MMP-9 oznaczany metodą immunoenzymatyczną u chorych na pierwotnego raka piersi koreluje z wynikami klinicznymi. W grupie chorych na raka piersi poddanych

10-letniej obserwacji tylko u 43 proc. badanych z niskim poziomem MMP-9 nie stwierdzono wznowy, podczas gdy u osób z podwyższonym stężeniem MMP-9 wznowa nie wystąpiła aż u 76 proc. [60].

Leppa i wsp., natomiast, oznaczając MMP-2 metodą immunoenzymatyczną (*enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA) u chorych na raka piersi z przerzutami do węzłów chłonnych nie stwierdzili różnic statystycznie istotnych pomiędzy poziomem MMP-2 a wiekiem chorych, obecnością receptorów estrogenowych i wielkością guza. Obserwacje 5-letnie chorych na raka piersi wykazały, że niski poziom MMP-2 korelował z dłuższym okresem przeżycia całkowitego i przeżycia bez wznowy. Na podstawie uzyskanych wyników badacze stwierdzili, że kooperacyjny poziom MMP-2 jest niezależnym czynnikiem prognostycznym u chorych na raka piersi z przerzutami do węzłów chłonnych. Pomiar MMP-2 u tych chorych pozwolił wyłonić grupę pacjentów z gorszym rokowaniem, kwalifikujących się do terapii adjuwantowej [61].

W dostępnym piśmiennictwie niewiele jest danych dotyczących aktywności enzymów metaloproteinaz u chorych na nowotwory. Aktywność metaloproteinaz, np. żelatynazy A (MMP-2) i żelatynazy B (MMP-9) można oznaczyć metodą zymografii, czyli pionowej elektroforezy w żelu polikrylamidowym zawierającym żelatynę [62, 63]. Metodą zymografii można oznaczyć aktywność MMP-2 i MMP-9 zawartych w homogenatach komórek nowotworowych, w surowicy, osoczu krwi lub w innych płynach ustrojowych [55, 64, 65].

W przypadku homogenizacji tkanek nie ma możliwości zlokalizowania aktywnych metaloproteinaz w komórkach. Ponadto procedura przygotowywania próbek może aktywować enzym lub doprowadzać do kontaktu enzymu z inhibitorami zlokalizowanymi w nieuszkodzonych tkankach lub komórkach. Metoda zymografii *in situ*, opisana po raz pierwszy w 1995 r. przez Galisa i wsp., pozwala zachować struktury tkanek nieuszkodzone i umożliwia zlokalizowanie czystych aktywnych form MMP w komórkach [66]. Jednak komórki organizmu człowieka nie mają zdolności do magazynowania metaloproteinaz, dlatego ich aktywność we krwi jest podobna jak w tkankach, a nawet może być wyższa. Oznaczanie aktywności żelatynaz w surowicy lub osoczu krwi jest badaniem nieinwazyjnym i może być wykonywane wielokrotnie, a ich wyniki mogą być wykorzystane do monitorowania przebiegu choroby oraz do oceny skuteczności zastosowanego schematu leczenia [56, 67]. Za pomocą zymografii można wykazać w surowicy obecność formy latentnej żelatynazy A (pro-MMP-2) o masie cząsteczkowej 72 kDa oraz formy latentnej żelatynazy B (pro-MMP-9) o masie cząsteczkowej 92 kDa.

La Rocca i wsp. oceniając aktywność żelatynaz metodą zymografii w surowicy chorych na raka piersi wykazali korelację zwiększonej aktywności metaloproteinaz z nadekspresją c-erbB-2 oraz ocenili wartość diagnostyczną oznaczenia MMP-2 i MMP-9 u chorych na raka piersi [68]. Podobnie Ranuncolo i wsp., stosując metodę zymografii wykazali pozytywną korelację aktywności żelatynazy B (MMP-9 o masie 92 kDa) ze stanem klinicznym pacjentów chorych na raka piersi. Analiza przeżyć wykonana metodą

Kapłana-Meiera wykazała, że im wyższa była aktywność MMP-9 w momencie diagnozy raka piersi, tym krótszy okres całkowitych przeżyć pacjentów z zaawansowanym rakiem piersi. Autorzy sugerują użyteczność oznaczenia aktywności MMP-9 jako czynnika pomocnego w prognozowaniu efektów terapii u chorych na raka piersi [69].

W Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wykonano oznaczenia aktywności żelatynazy A i B metodą zymografii w surowicy kobiet chorych na raka piersi i kobiet z łagodnymi zmianami w piersiach [70, 71]. W badaniach tych wykazano wzrost aktywności żelatynaz u kobiet z łagodnymi zmianami w piersiach i chorych na raka piersi w porównaniu z grupą kobiet zdrowych. Im wyższy był stopień zaawansowania klinicznego choroby, tym wyższa była aktywność żelatynazy A i żelatynazy B w surowicy kobiet chorych na raka piersi [70, 71]. W badaniach własnych wykazano istotnie wyższe mediany aktywności żelatynazy A i B w surowicy chorych na raka piersi z zajęтыми węzłami chłonnymi w stosunku do grupy chorych bez przerzutów. Istotny statystycznie wzrost aktywności żelatynazy A i B korelował także z wielkością guza piersi [71]. Największe mediany aktywności żelatynazy A i żelatynazy B otrzymano w surowicy chorych z guzem o średnicy powyżej 5 cm. U chorych tych mediana aktywności żelatynaz była ponad 2-krotnie wyższa niż w grupie kobiet z guzem o najmniejszej średnicy tj. ≤ 2 cm [71].

Dalsze badania własne wykazały prawie 2-krotnie wyższą medianę aktywności żelatynazy A oraz prawie 2,5-krotnie wyższą aktywność żelatynazy B w surowicy kobiet chorych na pierwotnie nieoperacyjnego raka piersi, w porównaniu z wartościami uzyskanymi u chorych na pierwotnie operacyjnego raka piersi [70, 72]. Nie obserwowano natomiast istotnych różnic w aktywności żelatynazy A i żelatynazy B po zastosowaniu chemioterapii indukcyjnej [71].

Analiza statystyczna dowiodła, że czułość diagnostyczna oznaczenia aktywności żelatynazy A i żelatynazy B metodą zymografii wynosiła kolejno 56 i 51 proc., a swoistość diagnostyczna 75 proc. i 77 proc. Obliczona wartość predykcyjna dodatnia oznaczenia aktywności żelatynazy A i B metodą zymografii wyniosła 77 proc., natomiast wartość predykcyjna ujemna dla żelatynazy A była równa 53 proc. i dla żelatynazy B 51 proc. Powierzchnie pola pod krzywą ROC dla aktywności żelatynazy A i B oznaczonej metodą zymografii wynosiły odpowiednio 0,698 i 0,678 [71].

Zbyt niska czułość i swoistość diagnostyczna określona dla żelatynazy A i B wyraźnie ogranicza przydatność stosowania zymografii żelatynaz w diagnostyce pierwotnego raka piersi oraz w różnicowaniu raka od zmian łagodnych w piersiach. Natomiast oznaczanie aktywności żelatynazy A i żelatynazy B w surowicy jest badaniem pomocniczym w kwalifikacji chorych do zabiegu chirurgicznego a wzrost aktywności tych enzymów świadczy o zaawansowaniu procesu nowotworowego [71, 72].

Podsumowanie

Metoda zymografii oznaczenia aktywności żelatynazy A i B, mimo że jest metodą czasochłonną, to spełnia wymagania stawiane metodom analitycznym stosowanym

w rozpoznawaniu chorób nowotworowych. Charakteryzuje się dużą czułością analityczną i liniowością. Zaletą zymografii jest również to, że może być wykorzystana do oznaczania aktywności żelatynaz nie tylko w surowicy i osoczu krwi, ale także w homogenatach komórek nowotworowych.

Mimo iż rozwojowi raka piersi towarzyszy wzrost aktywności żelatynazy A i żelatynazy B w surowicy krwi, z uwagi na umiarkowaną czułość i swoistość diagnostyczną pomiar aktywności tych enzymów jest mało przydatny w diagnozowaniu raka piersi i w różnicowaniu raka piersi od zmian łagodnych.

Przedstawione w pracy wyniki badań własnych wykazały, że oznaczanie aktywności żelatynazy A i żelatynazy B w surowicy jest wskazane do oceny stanu klinicznego chorych na raka piersi. Dodatnia zależność aktywności żelatynazy A i żelatynazy B z czynnikami rokowniczymi, takimi jak stan zaawansowania klinicznego choroby, stan węzłów chłonnych pachowych i wielkość guza uściśla prognozowanie przebiegu choroby, wynikające z oceny klasycznych czynników rokowniczych.

Piśmiennictwo

- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *Globocan 2000. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, version 1.0.* ARC Cancer Base No. 5, Lyon, IARC Press 2001.
- Krajowy rejestr nowotworów. Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów. Centrum Onkologii Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2003.
- Pardela M. *Współczesne rozpoznawanie i leczenie guzów sutka u kobiet.* Śląska Akademia Medyczna, Katowice 1997.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 163-76.
- Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994; 7: 2062-72.
- Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2000; 2: 252-7.
- Johansson N, Ahonen M, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 5-15.
- McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 2000; 6: 149-56.
- Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 2002; 52: 255-64.
- Sawicki G, Radomski MW. Nowe aspekty biologii metaloproteinaz przestrzeni międzykomórkowej (MMPs). *Diag Lab* 1999; 35: 373-80.
- Emara M, Woźniak M. Role of metalloproteinases in cancer cell invasiveness. *Diag Lab* 1999; 35: 381-97.
- Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 502-11.
- Fishman DA, Bafetti LM, Stack MS. Membrane-type matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in primary human ovarian epithelial carcinoma cells. *Invasion Metastasis* 1996; 16: 150-9.
- Tu FF, Goldenberg RL, Tamura T, Drews M, Zucker SJ, Voss HF. Prenatal plasma matrix metalloproteinase-9 levels to predict spontaneous preterm birth. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 446-9.
- Zucker S, Hymowitz M, Conner C, et al. Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878: 212-27.
- Sawicki G, Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature* 1997; 386: 616-9.
- Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 214-24.
- Faxon DP, Coats W, Currier J. Remodeling of the coronary artery after vascular injury. *Prog Cardiovasc Dis* 1997; 40: 127-40.
- Leppert D, Lindberg RL, Kappos L, Leib SL. Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; 36: 249-57.
- Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs* 1997; 15: 61-75.
- Borkakoti N. Structural studies of matrix metalloproteinases. *J Mol Med* 2000; 78: 261-8.
- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 463-516.
- Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378: 151-60.
- Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-4.
- Wilson CL, Matrisian LM. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol* 1996; 28: 123-36.
- Moilanen M, Pirila E, Grenman R, Sorsa T, Salo T. Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol* 2002; 197: 72-81.
- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002; 295: 2387-92.
- Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, McCabe F, Millar H, Rafferty P, Bugelski P, Yan L. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 2005; 65: 3193-9.
- Singh S, Barrett J, Sakata K, Tozer RG, Singh G. ETS proteins and MMPs: partners in invasion and metastasis. *Curr Drug Targets* 2002; 3: 359-67.
- Roeb E, Schleinkofer K, Kernebeck T, Potsch S, Jansen B, Behrmann I, Matern S, Grotzinger J. The matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist. *J Biol Chem* 2002; 277: 50326-32.
- Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 639-52.
- Marc A, Lafleur m, Handsley M, Dylan R Edwards. Potential and established roles for the matrix metalloproteinases (MMPs) during angiogenesis. *Expert Rev Mol Med* 2003; 5: 1-39.
- Palosaari H. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their specific tissue inhibitors (TIMPs) in mature human odontoblasts and pulp tissue. The regulation of expressions of fibrillar collagens, MMPs and TIMPs by growth factors, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). University of Oulu, Oulu Finland 2003
- Okamoto T, Akaike T, Nagano T, Miyajima S, Suga M, Ando M, Ichimori K, Maeda H. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1997; 342: 261-74.
- Knäuper V, Will H, López-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996; 271: 17124-31.
- Shamamian P, Schwartz JD, Pocock BJ, Monea S, Whiting D, Marcus SG, Mignatti P. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J Cell Physiol* 2001; 189: 197-206.
- Zucker S, Drews M, Conner C, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell

- surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *J Biol Chem* 1998; 273: 1216-22.
38. Toth M, Chvyrkova I, Bernardo MM, Hernandez-Barrantes S, Fridman R. Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 386-95.
39. Imren S, Kohn DB, Shimada H, Blavier L, DeClerck YA. Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 retroviral-mediated gene transfer in vivo inhibits tumor growth and invasion. *Cancer Res* 1996; 56: 2891-95.
40. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999; 189: 300-8.
41. Blavier L, Henriot P, Imren S, Declerck YA. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878: 108-19.
42. Grignon DJ, Sakr W, Toth M, et al. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 1654-9.
43. Mimori K, Mori M, Shiraiishi T, et al. Clinical significance of tissue inhibitor of metalloproteinase expression in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1997; 76: 531-6.
44. Nagase H, Itoh Y, Binner S. Interaction of alpha 2-macroglobulin with matrix metalloproteinases and its use for identification of their active forms. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 732: 294-302.
45. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of activities of matrix metalloproteinases 2, 8 and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 437-9.
46. Skotnicki JS, Zask A, Nelson FC, Albright JD, Levin JJ. Design and synthetic considerations of matrix metalloproteinase inhibitors. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878: 61-72.
47. Wojtowicz-Praga S, Torri J, Johnson M, et al. Phase I trial of Marimastat, a novel matrix metalloproteinase inhibitor, administered orally to patients with advanced lung cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2150-6.
48. Selzer MG, Zhu B, Block NL, Lokeshwar BL. CMT-3, a chemically modified tetracycline, inhibits bony metastases and delays the development of paraplegia in a rat model of prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878: 678-82.
49. Shalinsky DR, Brekken J, Zou H, et al. Broad antitumor and antiangiogenic activities of AG3340, a potent and selective MMP inhibitor undergoing advanced oncology clinical trials. *Acad N Y Sci* 1999; 878: 236-70.
50. Naglich JG, Jure-Kunkel M, Gupta E, et al. Inhibition of angiogenesis and metastasis in two murine models by the matrix metalloproteinase inhibitor, BMS-275291. *Cancer Res* 2001; 61: 8480-5.
51. Gingras D, Boivin D, Deckers C, Gendron S, Barthomeuf C, Beliveau R. Neovastat – a novel antiangiogenic drug for cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2003; 14: 91-6.
52. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1011-27.
53. Djonov V, Cresto N, Aebersold DM, et al. Tumor cell specific expression of MMP-2 correlates with tumor vascularisation in breast cancer. *Int J Oncol* 2002; 21: 25-30.
54. Emara M, Woźniak M. Role of metalloproteinases in cancer cell invasiveness. *Diag Lab* 1999; 35: 381-97.
55. Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJ. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg* 1997; 84: 160-6.
56. Zucker S, Lysik RM, Zarrabi MH, Moll U. M (r) 92,000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 140-6.
57. Zucker S, Lysik RM, DiMassimo BI, Zarrabi HM, Moll UM, Grimson R, Tickle SP, Docherty AJ. Plasma assay of gelatinase B: tissue inhibitor of metalloproteinase complexes in cancer. *Cancer* 1995; 76: 700-8.
58. Garbisa S, Scagliotti G, Masiero L, et al. Correlation of serum metalloproteinase levels with lung cancer metastasis and response to therapy. *Cancer Res* 1992; 52: 4548-9.
59. Sheen-Chen SM, Chen HS, Eng HL, Sheen CC, Chen WJ. Serum levels of matrix metalloproteinase 2 in patients with breast cancer. *Cancer Lett* 2001; 173: 79-82.
60. Talvensaaari-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T. Preoperative serum MMP-9 immunoreactive protein is a prognostic indicator for relapse-free survival in breast carcinoma. *Cancer Lett* 2005; 217: 237-42.
61. Leppa S, Saarto T, Vehmanen L, Blomqvist C, Elomaa I. A high serum matrix metalloproteinase-2 level is associated with an adverse prognosis in node-positive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1057-63.
62. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994; 218: 325-9.
63. Leber TM, Balkwill FR. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem* 1997; 249: 24-8.
64. Davies B, Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, Balkwill FR. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 1993; 67: 1126-31.
65. Farias E, Ranuncolo S, Cresta C, et al. Plasma metalloproteinase activity is enhanced in the euglobulin fraction of breast and lung cancer patients. *Int J Cancer* 2000; 89: 389-94.
66. Galis ZS, Sukhova GK, Libby P. Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. *FASEB J* 1995; 9: 974-80.
67. Zucker S, Lysik RM, Zarrabi HM, Moll U, Tickle SP, Stetler-Stevenson W, Baker TS, Docherty AJ. Plasma assay of matrix metalloproteinases (MMPs) and MMP-inhibitor complexes in cancer. Potential use in predicting metastasis and monitoring treatment. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 732: 248-62.
68. La Rocca G, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, Taormina P, Minafra S. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *Br J Cancer* 2004; 90: 1414-21.
69. Ranuncolo SM, Armanasco E, Cresta C, Bal De Kier Joffe E, Puricelli L. Plasma MMP-9 (92 kDa-MMP) activity is useful in the follow-up and in the assessment of prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 106: 745-51.
70. Kopczyński Z, Śliwowska I, Grodecka-Gazdecka S. Oznaczanie aktywności żelatynazy A (MMP-2) i żelatynazy B (MMP-9) w surowicy kobiet chorych na raka gruczołu piersiowego. *Diag Lab* 2001; 37 supl. 2: 89.
71. Śliwowska I. Ocena przydatności oznaczania markerów nowotworowych TPA, TPS, CA 15-3 oraz żelatynazy A (MMP-2) i żelatynazy B (MMP-9) w diagnostyce laboratoryjnej raka sutka. Rozprawa doktorska, Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2004.
72. Kopczyński Z, Śliwowska I, Grodecka-Gazdecka S. Przydatność testów do oznaczania stężenia tkankowego polipeptydowego antygeny (TPA), swoistego tkankowego polipeptydowego antygeny (TPS), antygeny 15-3 (CA 15-3) i oznaczania aktywności żelatynazy A (pro-MMP-2, 72 kDa) i żelatynazy B (pro-MMP-9, 92 kDa) w różnicowaniu pierwotnego raka piersi od zmian łagodnych. *Diag Lab* 2004; 40: 379.

Adres do korespondencji

dr n. biol. **Izabela Śliwowska**
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
Katedra Onkologii
Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego
ul. Łąkowa 1/2
61-878 Poznań
tel. +48 61 854 90 39
e-mail: diagnostyka@oncology.am.poznan.pl

Pozytonowa tomografia emisyjna (PET) z użyciem F-18-fluorodeoksyglukozy (FDG) znajduje coraz szersze zastosowanie w rozpoznawaniu i leczeniu nowotworów. Połączenie badania FDG-PET z tomografią komputerową (CT) zwiększa możliwości diagnostyczne. Celem pracy była wstępna, retrospektywna ocena wartości klinicznej badania PET/CT w ustaleniu stopnia zaawansowania raka przełyku. U 12 mężczyzn w wieku od 36 do 78 lat (średnio 59,1) z rozpoznaniem raka przełyku wykonano badanie FDG-PET/CT całego ciała. Ogniska wzmożonej utylizacji glukozy (wychwyty FDG) w przełyku stwierdzono u wszystkich chorych. Ogniska zwiększonego wychwyty FDG poza przełykiem stwierdzono u 6 chorych, w tym u 2 chorych w płucach, a u 5 chorych w węzłach chłonnych śródpiersia, okolicy nadobojczykowej, szyi, nadbrzuszu i przestrzeni nadobojczykowej. U 3 chorych, u których przeprowadzono potencjalnie lecznicze zabiegi resekcyjne w 2 przypadkach ocena stopnia zaawansowania nowotworu w badaniu PET/CT była zgodna z oceną śródoperacyjną i histopatologiczną materiału pooperacyjnego, a w 1 przypadku fałszywie ujemna w rozpoznaniu przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. W 4 przypadkach badanie PET/CT niewystarczająco dokładnie określiło głębokość naciekania ściany przełyku i/lub obecność przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. U 5 chorych na podstawie badania PET/CT stwierdzono IV stopień zaawansowania klinicznego raka przełyku. U 3 chorych wynik badania PET/CT spowodował zmianę stopnia zaawansowania raka przełyku (*upstaging*). Badanie PET/CT ma dużą wartość w ocenie stopnia zaawansowania klinicznego raka przełyku. Zastosowanie badania PET/CT poprawia skuteczność rozpoznania przerzutów do odległych węzłów chłonnych i narządów wewnętrznych, a u części chorych zmienia stopień klinicznego zaawansowania nowotworu oraz decyzje terapeutyczne. W ocenie głębokości naciekania ściany przełyku i węzłów chłonnych śródpiersia prawdopodobnie metoda ma mniejszą wartość kliniczną. U chorych kwalifikowanych do leczenia operacyjnego ocena stopnia klinicznego zaawansowania raka przełyku za pomocą PET/CT może przynieść wymierne korzyści.

Słowa kluczowe: rak przełyku, pozytonowa tomografia emisyjna, tomografia komputerowa, połączenie obrazów.

Połączenie pozytonowej tomografii emisyjnej z tomografią komputerową (PET/CT) w ocenie stopnia zaawansowania raka przełyku – analiza 12 przypadków

Combined positron emission tomography and computed tomography (PET/CT) imaging in staging esophageal cancer – analysis of 12 cases

Zbigniew Kula¹, Tomasz Pietrzak², Katarzyna Kobus-Błachnio², Zdzisław Zuchora²

¹Poradnia Gastroenterologiczna z Pracownią Endoskopową, Centrum Onkologii im. prof. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy

²Zakład Medycyny Nuklearnej, Centrum Onkologii im. prof. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy

Wstęp

Rak przełyku jest jednym z najgorzej rokujących nowotworów złośliwych. Na świecie zajmuje 8. miejsce wg częstości występowania. W 2002 r. rozpoznano 462 tys. nowych przypadków (4,2 proc. wszystkich raków) i stwierdzono 386 tys. zgonów (5,7 proc.) [1]. W Polsce w 2002 r. rozpoznano 1 055 przypadków raka przełyku u mężczyzn (1,8 proc.) i 234 przypadków u kobiet (0,4 proc.). Wśród przyczyn zgonów z powodu nowotworów złośliwych w Polsce rak przełyku zajmuje u mężczyzn 10. miejsce (2,5 proc.), a u kobiet 27. (0,7 proc.) [2]. Późne występowanie objawów chorobowych raka przełyku jest główną przyczyną opóźnienia zgłaszania się chorych do lekarza, w okresie, gdy choroba jest zaawansowana i niemożliwe jest leczenie z zamiarem radykalnym. Przyjmuje się, że ok. 90 proc. chorych poddanych leczeniu operacyjnemu ma zajęte przez nowotwór węzły chłonne, a odsetek 5-letnich przeżyć wynosi zaledwie 16 proc. w Stanach Zjednoczonych i 10 proc. w Europie [3, 4].

U chorych z rozpoznaniem raka przełyku dalsze postępowanie lecznicze zależy od prawidłowej oceny stopnia zaawansowania nowotworu. Wprowadzenie diagnostyki opartej na tomografii komputerowej (CT – *computed tomography*), rezonansie magnetycznym (MRI – *magnetic resonance imaging*), ultrasonografii endoskopowej z biopsją aspiracyjną cienkoigłową (EUS/FNA – *endoscopic ultrasound with fine needle aspiration*) oraz pozytonowej tomografii emisyjnej (PET – *positron emission tomography*) w większości przypadkach umożliwia trafne rozpoznanie stopnia zaawansowania choroby nowotworowej. Badania te charakteryzują się jednak określoną czułością, specyficznością i trafnością diagnostyczną, stąd wykonywanie tych badań jednocześnie, a także próby wprowadzania nowych metod oceny stopnia zaawansowania raka przełyku.

Poszerzenie diagnostyki raka przełyku o połączenie PET z tomografią komputerową (PET/CT) w dużym stopniu może przyczynić się do poprawy dokładności oceny stopnia zaawansowania raka przełyku i wyboru optymalnego sposobu leczenia.

Celem pracy jest próba oceny przydatności badania PET/CT w ustaleniu stopnia zaawansowania raka przełyku.