

Mimikra waskulogenna i ekspresja metaloproteiny MMP-9 w guzach nowotworowych jajnika u kobiet

Vasculogenic mimicry and matrix metalloproteinase MMP-9 expression in women with ovarian tumors

Artur Czekierdowski, Sylwia Czekierdowska, Jarosław Daniłoś, Ewelina Rogala, Aldona Nowicka

I Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie,
kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Jan Kotarski

Przeгляд Menopauzalny 2012; 2: 108–114

Streszczenie

Wstęp: W szybko rosnących guzach złośliwych komórki nowotworowe mają zdolność tworzenia własnej sieci kanałów naczyniowych, niezależnie od procesów zależnych od proliferacji śródbłonka mikronaczyń. Wysoka ekspresja metaloproteinaz macierzy międzykomórkowej (MMP) jest charakterystyczna dla guzów nowotworowych o intensywnych procesach angiogenicznych.

Cel pracy: Zbadanie ekspresji metaloproteiny typu 9 (MMP-9) w nowotworach jajnika oraz analiza zależności pomiędzy MMP-9 a występowaniem zjawiska mimikry naczyniowej.

Materiał i metody: Badaniem objęto grupę 67 kobiet (41 po menopauzie), które były leczone operacyjnie z powodu guzów złośliwych ($n = 62$) i niezłośliwych jajnika ($n = 5$). Średnia wieku wynosiła $53,6 \pm 10,45$ roku (mediana 54 lat, zakres 23–86 lat). Analizowano stopień zaawansowania klinicznego guza (wg FIGO) i stopień zróżnicowania histologicznego (G1-G3). W barwieniu metodami immunohistochemii wykorzystano metodę zmodyfikowanej reakcji Shiffa w celu identyfikacji struktur PAS-dodatnich, wskazujących na obecność mimikry naczyniowej w guzie. Odczyny barwne z przeciwciałem anti-MMP-9 stwierdzono w 52 guzach (77,6%). Ekspresja MMP-9 różniła się istotnie w zależności od typu histologicznego nowotworu, przy czym zmiany łagodne charakteryzowały się brakiem lub tylko słabą ekspresją MMP-9 ($\chi^2 = 27,1$; $p = 0,04$). Wysoką ekspresję MMP-9 stwierdzono w 14 przypadkach (20%) pierwotnego raka jajnika. Zaawansowane nowotwory złośliwe (stopień III wg FIGO) charakteryzowały się częściej wysoką lub średnią ekspresją MMP-9 (26 z 45 przypadków) natomiast zmiany nisko zaawansowane (stopień I wg FIGO) wykazywały częściej słabą ekspresję MMP-9 lub jej brak (10 z 13 przypadków), różnice pomiędzy grupami były istotne statystycznie ($\chi^2 = 13,1$; $p = 0,04$). Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji MMP-9 w zależności od stopnia zróżnicowania histologicznego guza złośliwego ($\chi^2 = 6,4$; $p = 0,37$) ani od statusu menopauzalnego badanych kobiet. Obecność struktur pseudonaczyniowych PAS-pozytywnych stwierdzono w 30 przypadkach (44,7%) raków jajnika. Metaloproteinazę macierzy typu 9 znacznie częściej wykrywano w guzach ze stwierdzoną mimikrą naczyniową ($\chi^2 = 15,8$; $p = 0,001$). W nowotworach, w których występowały struktury PAS-pozytywne (30 przypadków) częściej ekspresja MMP-9 była wysoka (w 11 przypadkach) lub średnia (6 przypadków). Nowotwory bez struktur PAS-pozytywnych (37 przypadków) również charakteryzowały się słabą ekspresją MMP-9.

Wniosek: Badanie ekspresji MMP-9 i występowania zjawiska mimikry naczyniowej mogą być ważnym składnikiem oceny fenotypu angiogenicznego nowotworów złośliwych jajnika u kobiet. Poznanie roli kolejnych czynników regulujących heterogeniczność różnych sposobów unaczynienia raka jajnika może być z kolei wskazówką co do wykorzystania nowych sposobów terapii blokujących proces powstawania alternatywnego unaczynienia tych guzów.

Słowa kluczowe: guzy jajnika, mimikra waskulogenna, metaloproteinaza MMP-9.

Summary

Background: Fast growing malignant tumors may use pathways alternative to endothelial angiogenesis vascularization pathways including vasculogenic mimicry (VM). Matrix metalloproteinases (MMPs) are important components of molecular switch to VM, but their possible contribution to VM formation in ovarian malignant tumors is not known.

Adres do korespondencji:

Artur Czekierdowski, I Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii UM w Lublinie, ul. Staszica 16, 20-081 Lublin, tel./faks +48 81 52 206 08, e-mail: a.czekierdowski@umlub.pl

Aim of the study: Our goal was to examine the MMP-9 and VM expression in malignant and benign ovarian tumors.

Material and methods: The study group comprised 67 women of whom 41 were postmenopausal. Mean age was 53.6 ± 10.45 yrs (median 54 yrs, range: 23-86 yrs). Immunohistochemical MMP-9 expression with periodic acid-Schiff (PAS) staining for non-endothelial cell-lined blood vessels that were formed by tumor cells indicating vasculogenic mimicry were analyzed in all masses. There were 62 malignant tumors in the studied group. FIGO clinical stage and tumor histological grade (G1-G3) were compared with VM and MMP-9 expression assessed in serial histological preparations.

Results: MMP-9 expression was found in 52 tumors (77.6%) and its strength (weak-medium-strong) was significantly correlated with the tumor histological type. Significant differences were found between benign tumors that had no or only a weak MMP-9 expression and malignant masses in which a medium or strong MMP-9 expression was found more frequently (26/45 cases of FIGO st. III tumors, $\text{Chi}^2=13.1$; $p = 0.04$). A high MMP-9 expression was found in 20% of primary ovarian cancer cases. No significant differences were found when malignant tumor histological grade or menopausal status of studied women were compared with MMP-9 expression ($\text{Chi}^2 = 6.4$; $p = 0.37$). PAS-positive structures indicating presence of VM were found in 30 (44.7%) ovarian cancers. MMP-9 was more frequently found in tumors with VM ($\text{Chi}^2 = 15.8$; $p = 0.001$). In 30 masses with PAS-positive structures, MMP-9 expression was more frequently high (11 cases) or medium (6 cases). All 37 masses without VM detected with PAS-positive reaction had a weak MMP-9 expression.

Conclusions: Matrix metalloproteinase-9 appears to play an important role in the development of vasculogenic-like networks and matrix remodeling in a significant proportion of malignant ovarian tumors. Studies on the potential role of molecular factors controlling ovarian cancer vascularization pathways may be used in the future to develop new tumor angiogenesis blocking agents.

Key words: ovarian tumors, vasculogenic mimicry, metalloproteinase MMP-9.

Wzrost nowotworów złośliwych, mimo że nie jest generalnie kontrolowany przez fizjologicznie występujące mechanizmy regulujące podziały komórek, w znacznym stopniu zależy od dostarczania tlenu, substancji odżywczych i niektórych składników regulujących szlaki metaboliczne zdrowego organizmu. Formowanie nowej sieci mikronaczyń w trakcie angiogenezy wiąże się z migracją komórek śródbłonkowych, ich podziałem oraz formowaniem przez endotelocyty struktur tubularnych [1]. Od ponad dekady wiadomo jednak, że nowe naczynia guza złośliwego niekoniecznie muszą pochodzić z pączkujących mikronaczyń gospodarza i niekoniecznie muszą być wyścielone śródbłonkiem. Część nowotworów złośliwych może korzystać z już istniejących naczyń, może też indukować wzrost przez intususepcję, pozaembrionalną waskulogenezę, angiogenezę glomeruloidalną lub tzw. mimikrę waskulogenną [2]. Szerokie spektrum zmian molekularnych w guzie umożliwiających powstawanie sieci kanałów naczyniopodobnych i mikronaczyń jest określane mianem „fenotypu angiogenego”.

Proteoliza składników macierzy zewnątrzkomórkowej pozwala na zasiedlenie tkanki przez endotelocyty oraz powoduje aktywację i uwolnienie czynników angiogenych zdeponowanych w macierzy zewnątrzkomórkowej. [3] Metaloproteiny macierzy (MMP) należą do dużej rodziny enzymów proteolitycznych zależnych od cynku i wapnia. Umożliwiają one degradację większości komponentów macierzy, w tym błony podstawnej, która jest barierą pomiędzy różnymi obszarami tkankowymi [4]. Zaburzenie integralności błony podstawnej w inwazyjnych nowotworach umożliwia naciekanie sąsiednich tkanek oraz przerzuty komórek nowo-

tworowych w odległe miejsca [2, 5]. Wysoka ekspresja MMP jest charakterystyczna dla tkanek o intensywnych procesach angiogenych [3, 6–8]. Metaloproteiny macierzy mogą być produkowane przez komórki nowotworowe oraz otaczające komórki zrębu, takie jak fibroblasty, infiltrujące makrofagi oraz endotelocyty. Wykazano, że MMP syntetyzowane przez makrofagi naciekające nowotwory złośliwe odgrywają ważną rolę w angiogenezie i wzroście guzów jajnika [6, 7].

Wiele nowych badań wskazuje, że komórki nowotworowe mają zdolność tworzenia własnej sieci kanałów naczyniowych niezależnie od procesów angiogenych. Struktury te są podobne do embrionalnej sieci mikronaczyń występujących w łożysku [9]. Komórki formujące struktury mikrotubularne funkcjonalnie przypominają endotelocyty, dlatego samo zjawisko określono mianem mimikry naczyniowej (tzw. *vasculogenic mimicry*) [9, 10]. Do tej pory najwięcej obserwacji na temat tego zjawiska zgromadzono na podstawie badania czerniaków naczyniówki oka oraz skóry [9, 11, 12]. Nowe badania potwierdziły występowanie mimikry naczyniowej również w innych nowotworach złośliwych, w tym w raku prostaty [13], mięsach [14], raku sutka [15], wątroby [16], *astrocytoma* [17] oraz raku przewodu pokarmowego [18]. Badania Soda i wsp. wykazały, że również komórki nowotworowe jajnika SKOV3 w warunkach *in vitro* mogą tworzyć sieć kanałów niezależną od endotelocytów, w podobny sposób jak komórki nowotworowe czerniaka [20, 21]. Wyniki kolejnych badań wskazują, że niezbędnymi czynnikami powodującymi formowanie struktur pseudonaczyniowych są metaloproteiny macierzy międzykomórkowej, w tym w szczególności MMP-2 i MMP-9 [6, 9, 11]. Ich nasiloną aktywność obserwowano we wszystkich przy-

padkach nowotworów, w których stwierdzono występowanie mimikry naczyniowej. W przypadku nowotworów, w których nie stwierdzono tego zjawiska, ekspresja MMP była istotnie niższa [19, 21]. Rola metaloproteinazy macierzy i ich ewentualnego związku z mimikrą waskulogeną nie została jednak jeszcze zbadana w raku jajnika. Z tego względu celem pracy była ocena ekspresji metaloproteinazy macierzy typu 9 (MMP-9) oraz analiza zależności pomiędzy szeregiem wybranych parametrów klinicznych i histologicznych, obecnością MMP-9 w tkankach guza a występowaniem zjawiska mimikry naczyniowej w niezłośliwych i złośliwych nowotworach jajnika u kobiet.

Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 67 kobiet, które były leczone operacyjnie z powodu guzów jajnika w I Klinice Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie w latach 2006–2008. Odnotowano wiek oraz status menopauzalny badanych. Status menopauzalny zdefiniowano jako wiek, w którym upłynął minimum rok od ostatniego krwawienia, albo – u kobiet po usunięciu macicy – ukończone 50 lat życia. W nowotworach złośliwych analizowano typ histologiczny i stopień histologicznego zróżnicowania guza (G1-G3), stadium zaawansowania klinicznego wg FIGO. Materiał do badań histologicznych i immunohistochemicznych pobierano każdorazowo z centralnej części zmiany, z pominięciem obszarów martwiczych oraz obszarów naciekania sąsiednich narządów. Badania immunohistochemiczne wykonano w preparatach guza utrwalonych w buforowanej formalinie na seryjnych skrawkach parafinowych o grubości 5 μm . Kontrolę negatywną stanowiły próbki 2 zdrowych jajników usuniętych w czasie histerektomii z powodu mięśniaków macicy.

Barwienie immunohistochemiczne MMP-9 i reakcja PAS

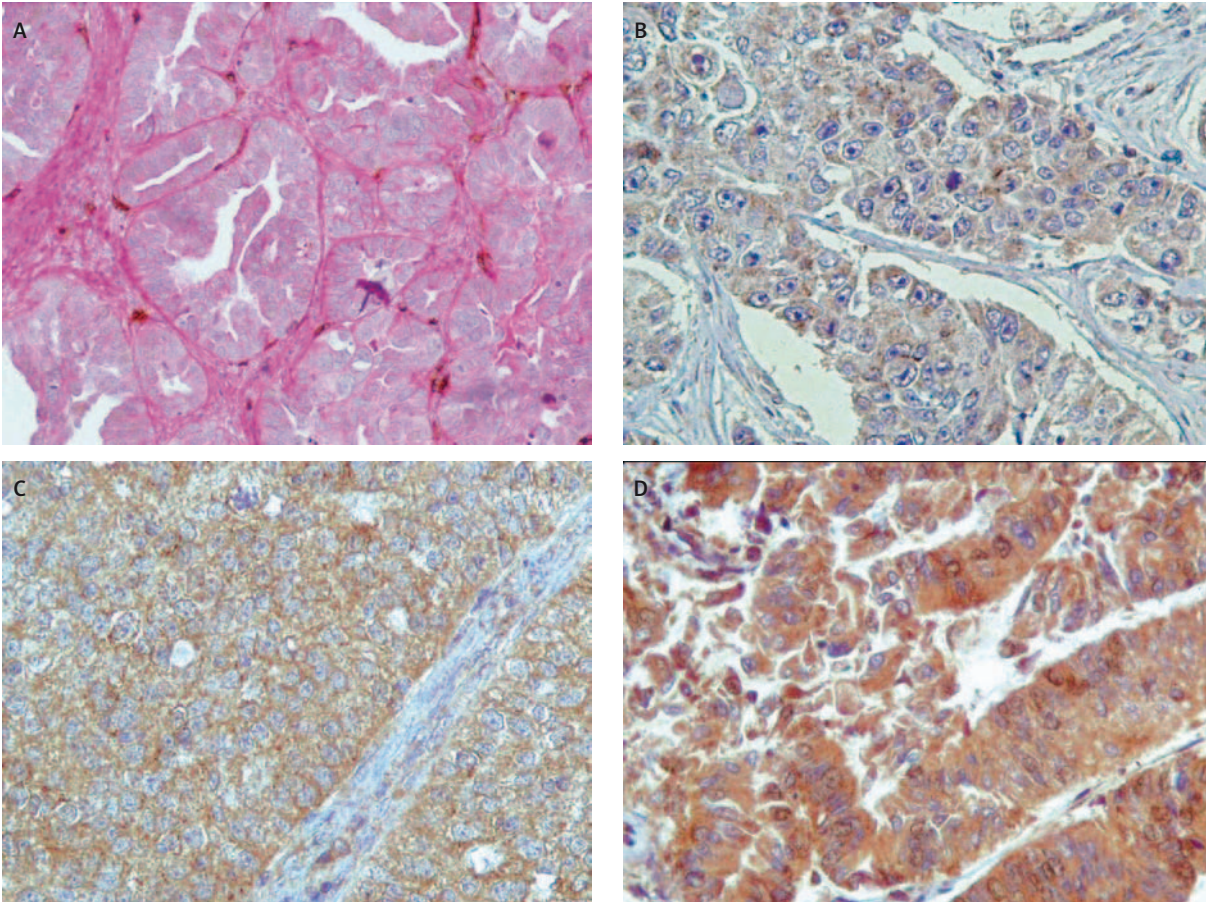
Po odparafinowaniu i uwodnieniu materiału tkankowego w szeregu alkoholowym zastosowano procedurę odstonięcia determinanty antygenowej, wykorzystując inkubację preparatów w buforze cytrynianowym (0,01 M; pH 6,0) w łaźni wodnej przez 30 min w temperaturze 95–97°C. Aktywność endogennej peroksydazy blokowano 3-procentowym roztworem nadtlenu wodoru przez 5 min w temperaturze pokojowej. Preparaty płukano każdorazowo 3 \times 5 min w buforze TBS, a następnie inkubowano z przeciwciałem pierwotnym skierowanym przeciwko antygenowi MMP-9 (Dako, Cytomation) 1 : 50 przez 60 min; w temperaturze pokojowej. Następnie zastosowano system wizualizacyjny zawierający przeciwciało wtórne z kompleksem streptawidyna/biotyna skoniugowana z peroksydazą (EnVision Plus™ kit; DAKO, Cytomation).

W kolejnej serii preparatów guzów, po odparafinowaniu i uwodnieniu materiału tkankowego w szeregu alkoholowym i wyptukaniu w wodzie destylowanej, wykonano reakcję PAS przy użyciu zestawu ARTISAN™ Periodic Acid Schiff Stain Kit. Preparaty inkubowano 5 min z 0,5-procentowym kwasem nadjodowym. Po wyptukaniu w wodzie destylowanej preparaty inkubowano w odczynniku Schiffa przez 20 min. Następnie preparaty zostały dodatkowo wybarwione hematoksyliną Mayera. Kanały pseudonaczyniowe PAS-pozytywne zidentyfikowano jako struktury wybarwione na kolor różowy do purpurowego, występujące w obrębie komórek nowotworowych (ryc. 1A). Obecność erytrocytów w świetle pseudonaczyń nie była konieczna do ich identyfikacji. Ekspresję MMP-9 określono metodą półilościową, przy czym brak ekspresji zdefiniowano jako brak odczynów barwnych lub słabe odczyny barwne w mniej niż 25% komórek nowotworowych. Słabą ekspresją MMP-9 określono mierną lub średnią intensywność odczynów w 25–50% komórek nowotworowych. Średnią ekspresją MMP-9 została zdefiniowana jako średnia lub wysoka intensywność odczynów w 50–75% komórek nowotworowych. Wysoka ekspresja MMP-9 oznaczała wysoką intensywność odczynów w ponad 75% komórek (ryc. 1B–D).

Analizę statystyczną wyników badań wykonano przy użyciu programu Statistica v.6.0 (Statsoft, Polska). Wartości analizowanych parametrów mierzonych w skali nominalnej bądź porządkowej scharakteryzowano za pomocą licznosci i odsetka, mierzone w skali interwałowej za pomocą średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego, mediany i zakresu zmienności w zależności od postaci rozkładu. Do oceny istnienia różnic bądź zależności między analizowanymi parametrami niemierzalnymi użyto tabel wielozdzielczych i testu jednorodności lub niezależności χ^2 , w przypadku małych liczebności zastosowano poprawkę Yatesa. Przyjęto 5-procentowy błąd wnioskowania i związany z nim poziom istotności statystycznej $p < 0,05$ wskazujący na istnienie istotnych różnic bądź zależności.

Wyniki

Średnia wieku badanych kobiet wynosiła 53,6 \pm 10,45 roku (mediana 54 lata, zakres 23–86 lat). W grupie tej było 26 kobiet przed menopauzą (wiek 44,2 \pm 7,8 roku) i 41 po menopauzie (wiek 59,6 \pm 6,8 roku). W badaniu histologicznym stwierdzono 5 przypadków niezłośliwych zmian nowotworowych (6,8%), 6 raków typu granicznego (8,1%) oraz 42 raki inwazyjne jajnika (57,5%). Ponadto do badań włączono 8 nowotworów przerzutowych (10,9%), w tym 6 typu Krukenberga oraz 6 rzadkich pierwotnych guzów złośliwych jajnika (3 *folliculoma* i 3 *dysgerminoma*). Najczęściej występującym typem histopatologicznym raka jajnika był typ surowicy – stwierdzony w 17 przypadkach (40,4%), a najrzadszym typ jasnokomórkowy – w 2 przypadkach (4,7%). W badanej grupie kobiet z nowotworami złośliwymi jaj-



Ryc. 1A–D. Przykład identyfikacji struktur pseudonaczyniowych za pomocą barwienia PAS (A) oraz ekspresji MMP-9 w tkance guzów złośliwych jajnika (B–D). A – sieć kanałów pseudonaczyniowych w tkance nowotworowej (kolor purpurowy), które łączą mikronaczynia wybarwione za pomocą przeciwciała anti-CD34 (kolor brązowy). B – słaba ekspresja MMP-9 – słaba lub średnia intensywność odczynów w 25–50% komórek nowotworowych; C – średnia ekspresja MMP-9 – średnia lub wysoka intensywność odczynów w 50–75% komórek nowotworowych. D – wysoka ekspresja MMP-9 – wysoka intensywność odczynów w ponad 75% komórek

nika najczęściej stwierdzano niski stopień zróżnicowania histologicznego (G3) w 33 przypadkach (45,2%) oraz wysoki stopień zaawansowania klinicznego – stopień III wg FIGO w 45 przypadkach (61,6%).

W analizowanej grupie nowotworów jajnika stwierdzono odczyny barwne z przeciwciałem anti-MMP-9 w 52 przypadkach (77,6%). Ekspresja MMP-9 różniła się istotnie w zależności od rodzaju zmiany ($\chi^2 = 27,1$; $p = 0,04$). Zmiany łagodne charakteryzowały się słabą ekspresją MMP-9 bądź jej brakiem. Wysoką ekspresję MMP-9 stwierdzono w 14 przypadkach (20%). Wszystkie były rakami jajnika. Stopień zaawansowania klinicznego istotnie różnicował intensywność ekspresji MMP-9 ($\chi^2 = 13,1$; $p = 0,04$). Zaawansowane nowotwory złośliwe (stopień III wg FIGO) charakteryzowały się częściej wysoką lub średnią ekspresją MMP-9 (26 z 45 przypadków), natomiast zmiany mało zaawansowane (stopień I wg FIGO) wykazywały częściej słabą ekspresję MMP-9 lub jej brak (10 z 13 przypadków). Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji MMP-9 w zależno-

ści od zróżnicowania histologicznego guza złośliwego ($\chi^2 = 6,4$; $p = 0,37$). Status menopauzalny kobiet nie miał istotnego wpływu na ekspresję MMP-9 w zamianach nowotworowych ($\chi^2 = 0,2$; $p = 0,9$).

W badanej grupie 67 chorych na nowotwór jajnika stwierdzono występowanie struktur pseudonaczyniowych PAS-pozytywnych w 30 przypadkach (44,7%). W grupie tej 12 guzów stanowił typ *adenocarcinoma*. Oceniając ekspresję MMP-9 w odniesieniu do występowania mimikry naczyniowej, stwierdzono, że ekspresja tego białka w istotny sposób wiąże się w obecnością kanałów pseudonaczyniowych ($\chi^2 = 15,8$; $p = 0,001$). W nowotworach, w których występowały struktury PAS--pozytywne (30 przypadków), ekspresja MMP-9 częściej była wysoka (w 11 przypadkach) lub średnia (6 przypadków). Nowotwory charakteryzujące się brakiem struktur PAS-pozytywnych (37 przypadków) charakteryzowały się również słabą ekspresją MMP-9 (8 przypadków) lub jej brakiem (5 przypadków). Podsumowanie opisanych powyżej wyników badań przedstawiono w tabeli I.

Tab. I. Rozkład liczebności i częstość występowania zmian nowotworowych jajnika w zależności od nasilenia ekspresji MMP-9 uwzględniający obecność mimikry naczyniowej, rodzaj histologiczny oraz stopień zróżnicowania i zaawansowania klinicznego

Ekspresja MMP-9	Brak (0)	Niska (1)	Średnia (2)	Wysoka (3)	
	N = 17 (25%)	N = 19 (28%)	N = 17 (25%)	N = 14 (20%)	
Obecność mimikry naczyniowej					
PAS+ (N = 30)	2 (3%)	11 (16%)	6 (9%)	11 (16%)	$\chi^2 = 15,8; p = 0,001$
PAS- (N = 37)	15 (22%)	8 (12%)	11 (16%)	3 (4%)	
Typ histologiczny					
Zmiany łagodne (N = 5)	2 (3%)	2 (3%)	1 (1%)	0 (0%)	$\chi^2 = 27,1; p = 0,04$
Raki (N = 42)	10 (15%)	9 (13%)	9 (13%)	14 (20%)	
Guzy graniczne (N = 6)	3 (4%)	0 (0%)	3 (4%)	0 (0%)	
Guzy przerzutowe (N = 8)	0 (0%)	5 (7%)	3 (4%)	0 (0%)	
Pierwotne guzy złośliwe (N = 6)	2 (3%)	3 (4%)	1 (1%)	0 (0%)	
Stopień zróżnicowania histologicznego					
G1 (N = 7) (11%)	3 (5%)	1 (2%)	3 (5%)	0 (0%)	$\chi^2 = 6,4; p = 0,37$
G2 (N = 22) (35%)	7 (11%)	5 (8%)	5 (8%)	5 (8%)	
G3 (N = 33) (53%)	5 (8%)	11 (18%)	16 (26%)	9 (15%)	
Stopień zaawansowania klinicznego wg FIGO					
I (n = 13) (21%)	7 (11%)	3 (5%)	3 (5%)	0 (0%)	$\chi^2 = 13,1; p = 0,04$
II (n = 4) (6%)	2 (3%)	1 (2%)	0 (0%)	1 (2%)	
III (n = 45) (73%)	6 (10%)	13 (21%)	13 (21%)	13 (21%)	

Brak ekspresji MMP-9 oznacza brak odczynów barwnych lub słabe odczyny barwne w mniej niż 25% komórek nowotworowych

Słaba ekspresja MMP-9 oznacza słabą lub średnią intensywność odczynów w 25–50% komórek nowotworowych

Średnia ekspresja MMP-9 oznacza średnią lub wysoką intensywność odczynów w 50–75% komórek nowotworowych

Wysoka ekspresja MMP-9 oznacza wysoką intensywność odczynów w ponad 75% komórek

Dyskusja

Badaniami objęto grupę 67 kobiet z nowotworami jajnika, u których w preparatach pooperacyjnych oceniano immunohistochemicznie ekspresję metaloproteiny macierzy typu 9 (MMP-9) oraz obecność struktur pseudonaczyniowych będących dowodem występowania zjawiska mimikry naczyniowej za pomocą barwienia metodą modyfikowanej reakcji PAS. Wyniki badań wskazują na zwiększoną ekspresję MMP-9, która towarzyszy rozrostom nowotworowym jajnika i jest wyraźnie podwyższona w przypadku zaawansowanych raków jajnika o wysokim stopniu złośliwości. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia, w których zasugerowano, że komórki nowotworowe jajnika mają zdolność do produkcji szeregu metaloprotein macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym w szczególności MMP-9 i MMP-2, a ich zwiększona synteza jest skorelowana z inwazyjnością i potencjałem do tworzenia przerzutów nowotworu [5, 6, 22]. Metaloproteiny te powodują degradację większości komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym błony podstawnej, która stanowi barierę pomiędzy różnymi obszarami tkankowymi [2, 23, 24]. Zaburzenie integralności błony podstawnej w nowotworach złośliwych umożliwia ich naciekanie do sąsiednich tkanek oraz przemieszczanie się komórek nowotworowych w odległe miejsca.

Organizacja komórek nowotworowych jajnika w struktury pseudonaczyniowe potwierdzona przez wcześniejsze badania autorów niniejszej pracy oraz przez szereg dotychczasowych doniesień wskazuje na ich niezwykle plastyczność i multipotencjalność [3, 10, 25]. Komórki te łatwiej zmieniają swój fenotyp w kierunku fenotypu angiogenego, co powoduje produkcję wielu składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Doświadczenia przeprowadzone na genetycznie modyfikowanych myszach z brakiem ekspresji genu *MMP-9* dowiodły, że białko MMP-9 bierze udział w inicjowaniu procesów waskularyzacyjnych podczas fazy tzw. przełączenia angiogenego (*angiogenic switch*), która jest charakterystycznym etapem w aktywacji śródbłonnków w czasie zmiany fenotypu w kierunku proangiogenym [6, 7, 26]. Prawdopodobnie MMP-9 odgrywa tę samą rolę w przypadku komórek nowotworowych zaangażowanych w proces mimikry naczyniowej. Uzyskane przez autorów niniejszej pracy wyniki wskazują na związek pomiędzy wysoką ekspresją MMP-9 a obecnością kanałów pseudonaczyniowych w nowotworach złośliwych. Degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej przy udziale metaloprotein umożliwia nie tylko uwolnienie zdeponowanych w niej czynników proangiogenych, lecz także reorganizację i zmianę kształtu na wrzecionowaty oraz migrację komórek nowotworowych. Opisane zmiany morfologiczne umożliwiają z kolei formowanie

struktur mikrotubularnych ograniczonych bezkomórkową macierzą. W tych nowych strukturach mikrotubularnych może odbywać się transport erytrocytów i składników odżywczych. Co ciekawe, kanały powstające w procesie mimikry naczyniowej nie są wynikiem martwicy lub krwotoku w obszarach zmiany nowotworowej, ponieważ nie znaleziono ognisk nekrotycznych ani komórek zapalnych w ich sąsiedztwie.

Metaloproteinaza MMP-9 powoduje degradację kolagenu typu IV i lamininy, głównych składników błony podstawnej [23]. W szeregu badań potwierdzono wysoki poziom ekspresji mRNA oraz białek MMP-2 and MMP-9 w rakach jajnika w porównaniu z prawidłową tkanką oraz guzami niezłośliwymi i nowotworami o granicznym typie złośliwości [5, 7, 22]. Doświadczenia wykorzystujące metody hybrydyzacji *in situ* wykazały obecność MMP-9 mRNA nie tylko w obszarach nowotworowych guzów, lecz także w zrębie, co wskazuje, że także komórki zrębu mogą ułatwiać zmiany przerzutowe komórek raka jajnika. Kamat i wsp. porównali ekspresję MMP-2 i MMP-9 w tkance nowotworowej i w zrębie w guzach niezłośliwych i rakach jajnika [27]. W wymienionych badaniach stwierdzono, że wysoka ekspresja metaloproteinaz w komórkach zrębu jest istotnie skorelowana z agresywnymi postaciami nowotworów i jest niezależnym wskaźnikiem predykcyjnym przeżycia. Ozalp i wsp. [28] również stwierdzili, że niska ekspresja MMP-9 w obrębie zrębu nowotworów złośliwych jajnika może mieć istotne znaczenie dla dłuższego przeżycia w porównaniu z ekspresją określoną na poziomie średnim lub wysokim. Wyniki te wskazują na funkcjonalny udział metaloproteinaz macierzy produkowanych nie tylko przez nowotwór, ale również przez tkanki gospodarza w patogenezie raków jajnika [28].

Poznanie procesów regulujących alternatywne dla neoangiogenezy szlaki unaczynienia guza może przyczynić się do wprowadzenia nowoczesnych środków blokujących rozwój sieci mikronaczyń w połączeniu z innymi sposobami terapii przeciwnowotworowych u chorych na raka jajnika. Wykazano już, że zastosowanie takich inhibitorów MMP, jak Col-3 z grupy tetracyklin lub talidomidu może być teoretycznie pomocne w leczeniu chorych na raka jajnika [29]. Dalsze badania powinny umożliwić uzyskanie nowych danych, pozwalających określić indywidualną charakterystykę potencjału inwazyjnego i „fenotypu angiogenego” guza złośliwego jajnika. Autorzy niniejszej pracy sądzą, że może to w przyszłości przyczynić się do zastosowania celowanej terapii antynaczyniowej po określeniu „profilu angiogenego” usuniętego guza i zbadaniu molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za jego procesy waskularyzacyjne.

Wniosek

Badania ekspresji MMP-9 i występowania zjawiska mimikry naczyniowej mogą być ważnymi składnikami oceny fenotypu angiogenego nowotworów złośliwych jajnika u kobiet. Poznanie roli kolejnych czynników regu-

lujących heterogeniczność różnych sposobów unaczynienia raka jajnika może być z kolei wskazówką co do wykorzystania nowych sposobów terapii blokujących proces powstawania alternatywnego unaczynienia tych guzów.

Piśmiennictwo

1. Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994; 79: 185-8.
2. Döme B, Hendrix MJ, Paku S, et al. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 2007; 170: 1-15.
3. Tang HS, Feng YJ, Yao LQ. Angiogenesis, vasculogenesis, and vasculogenic mimicry in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19: 605-10.
4. Woessner JF Jr. The matrix metalloproteinase family. W: *Matrix metalloproteinases*. Parks WC, Mecham RP (red). Academic Press, San Diego (CA) 1998; 1-14.
5. Stack MS, Ellerbroek SM, Fishman DA. The role of proteolytic enzymes in the pathology of epithelial ovarian carcinoma. *Int J Oncol* 1998; 12: 569-76.
6. Bergers G, Brekken R, McMahon, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 737-44.
7. Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, et al. High levels of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, and TIMP-2 mRNA correlate with poor survival in ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 799-808.
8. Lengyel E, Schmalfeldt B, Konik E, et al. Expression of latent matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2001; 82: 291-8.
9. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739-52.
10. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156: 361-81.
11. Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, et al. Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 2001; 61: 6322.
12. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene* 2003; 22: 3070-5.
13. Sharma N, Seftor RE, Seftor EA, et al. Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: role in vasculogenic mimicry. *Prostate* 2002; 50: 189-201.
14. Hao X, Sun B, Zhang S, Zhao X. Microarray study of vasculogenic mimicry in bi-directional differentiation malignant tumor. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002; 82: 1298-302.
15. Shirakawa K, Kobayashi H, Sobajima J, et al. Inflammatory breast cancer: vasculogenic mimicry and its hemodynamics of an inflammatory breast cancer xenograft model. *Breast Cancer Res* 2003; 5: 136-9.
16. Sun B, Zhang S, Zhang D, et al. Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2006; 16: 693-8.
17. Yue WY, Chen ZP. Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 997-1002.
18. Sun B, Qie S, Zhang S, et al. Role and mechanism of vasculogenic mimicry in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 2008; 39: 444-51.
19. Sood AK, Seftor EA, Fletcher MS, et al. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol* 2001; 158: 1279-88.
20. Sood AK, Fletcher MS, Zahn CM, et al. The clinical significance of tumor cell-lined vasculature in ovarian carcinoma: implications for anti-vasculogenic therapy. *Cancer Biol Ther* 2002; 1: 661-4.
21. Sood AK, Fletcher MS, Coffin JE, et al. Functional role of matrix metalloproteinases in ovarian tumor cell plasticity. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 899-909.
22. Huang LW, Garrett AP, Bell DA, et al. Differential expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein and mRNA in epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 369-76.
23. Yurchenco PD, Schittny JC. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* 1990; 4: 1577-90.

24. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-36.
25. Czekierdowski A, Czekierdowska S, Daniłoś J. Ocena roli badania zjawiska „mimikry naczyniowej” i gęstości mikronaczyń w nowotworach złośliwych jajnika u kobiet. *Przeł Menopauz* 2011; 2: 95-101.
26. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, et al. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 1998; 58: 1048-51.
27. Kamat AA, Fletcher M, Gruman LM, et al. The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1707-14.
28. Ozalp S, Tanir HM, Yalcin OT, et al. Prognostic value of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase-B) expression in epithelial ovarian tumors. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24: 417-20.
29. Syed S, Takimoto C, Hidalgo M, et al. A phase I and pharmacokinetic study of Col-3 (Metastat), an oral tetracycline derivative with potent matrix metalloproteinase and antitumor properties. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6512-21.