

Aktywność metaloproteaz macierzowych -2 i -9 (MMP-2 i MMP-9) oraz zawartość ich tkankowych inhibitorów w raku błony śluzowej macicy – doniesienie wstępne

Activity of matrix metalloproteinases -2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) and content of their tissue inhibitors in endometrial cancer – a preliminary study

Bogusiewicz Michał¹, Stryjecka-Zimmer Marta², Rechberger Tomasz¹

¹ II Katedra i Klinika Ginekologii Akademii Medycznej w Lublinie

² Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Akademii Medycznej w Lublinie

Streszczenie

Cel pracy: Metaloproteazy macierzowe -2 i -9 (MMP-2 i MMP-9) są enzymami, które degradują kolagen typu IV oraz inne składniki błony podstawnej. Ich aktywność blokowana jest przez tkankowe inhibitory metaloproteaz (TIMPs). Celem pracy była ocena aktywności MMP-2 i MMP-9 oraz zawartości TIMP-1 i TIMP-2 w rakach trzonu i w prawidłowej błonie śluzowej macicy.

Materiały i metody: Próbkę do badań obejmującą 28 wycinków gruczołakoraka błony śluzowej i 15 wycinków prawidłowego endometrium pobrano z preparatów pooperacyjnych. Tkanki poddano dwuetapowej ekstrakcji. Aktywność metaloproteaz w ekstraktach oceniono przy pomocy półilościowej zymografii. Do oznaczenia zawartości TIMP-1 i TIMP-2 wykorzystano metodę immunoenzymatyczną.

Wyniki: Stwierdzono znacznie wyższą aktywność i poziom aktywacji MMP-9 w rakach trzonu macicy w porównaniu do prawidłowego endometrium. Aktywność i poziom aktywacji MMP-2 jak również zawartość TIMP-1 i TIMP-2 nie różniły się pomiędzy badanymi grupami. Nie ustalono jednoznacznych zależności pomiędzy aktywnością badanych enzymów oraz zawartością ich inhibitorów a cechami klinicznymi i histopatologicznymi odzwierciedlającymi agresywność raka trzonu macicy.

Wnioski: Wyniki badań wskazują, że MMP-9 odgrywa istotną rolę w progresji raka trzonu macicy u kobiet.

Słowa kluczowe: **nowotwory błony śluzowej macicy – immunologia / metaloproteiny macierzy – immunologia / inhibitory tkankowe metaloproteinaz – immunologia / metaloproteinaza-2 i -9 macierzy – krew / inhibitor tkankowy metaloproteiny -1, -2 – krew /**

Adres do korespondencji:

Michał Bogusiewicz
II Katedra i Klinika Ginekologii Akademii Medycznej w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin
mbogusiewicz@yahoo.com

Otrzymano: 8.10.2006

Zaakceptowano do druku: 2.04.2007

Bogusiewicz M, et al.

Abstract

Objectives: Matrix metalloproteinases-2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) are enzymes degrading collagen type IV and other components of the basement membrane.

Their activity is suppressed by tissue inhibitors of metalloproteinases – TIMP-1 and TIMP-2. Substantial evidence indicates that MMP-2 and MMP-9 play an important role in the spread of malignant tumours. The aim of the study was to evaluate the activity of MMP-2 and MMP-9 and contents of their inhibitors: TIMP-1 and TIMP-2 in endometrial cancer and normal endometrium.

Material and methods: Material for the study comprised 28 samples of endometrial cancers and 15 samples of normal endometrium. A two-step method for extraction of MMPs was applied. The activity of MMP-2 and MMP-9 was measured with semi-quantitative zymography. TIMP-1 and TIMP-2 contents were measured with ELISA method.

Results: Mean activity and activation ratio of MMP-9 was significantly higher in endometrial cancers compared with normal myometrium, whereas mean activity and activation ratio of MMP-2 did not differ significantly between investigated groups. Mean content of TIMP-1 and TIMP-2 did not differ between cancer and control tissues. No unequivocal association between activity of investigated MMPs or contents of their inhibitors and clinicopathological features of endometrial cancers was observed.

Conclusions: Results of the study suggest that MMP-9 may play an important role in the progression of endometrial cancer, whereas MMP-2 does not seem to be involved in this process. Action of MMP-9 may be further enhanced by relative deficiency of TIMP-1.

Key words: **endometrial neoplasms chemistry and enzymology / endometrial neoplasms – pathology / immunochemistry / matrix metalloproteinase-9 / matrix metalloproteinase-2 / matrix metalloproteinases /**

Wstęp

Proteolityczna degradacja białek tworzących błonę podstawną jest jedną z charakterystycznych cech nowotworów złośliwych, nie spotykaną w guzach łagodnych [1]. Wśród enzymów zaangażowanych w ten proces szczególnie istotną rolę przypisuje się metaloproteazom macierzowym (ang. *matrix metalloproteinases* – MMPs). Metaloproteaza macierzowa-2 i -9 (MMP-2 i MMP-9), określane również jako żelatynaza A i żelatynaza B, posiadające zdolność degradowania białek strukturalnych błon podstawnych tj. kolagenu typu IV i V, fibronektyny, lamininy, entaktyny i rdzeni białkowych proteoglikanów, wydają się odgrywać kluczową rolę w procesie progresji nowotworu złośliwego [2, 3].

Tkankowe inhibitory metaloproteaz stanowią grupę białek o masie cząsteczkowej pomiędzy 20-30kDa. Posiadają one zdolność hamowania aktywności metaloproteaz w przestrzeni zewnątrzkomórkowej [2-4]. Najsilniejszym inhibitorem MMP-2 jest TIMP-2, który wraz z metaloproteazą-1 typu błonowego (ang. *membrane type-1 matrix metalloproteinase*, MT1-MMP) uczestniczy również w aktywacji MMP-2, podczas gdy MMP-9 hamowana jest głównie przez TIMP-1 [2-4]. Proteoliza wywołwana przez MMP-2 i MMP-9 powoduje nie tylko zmiany strukturalne macierzy zewnątrzkomórkowej, ale prowadzi również do uwalniania biologicznie aktywnych peptydów bądź modyfikacji aktywności czynników wzrostu i cytokin [3, 4]. Żelatynazy uczestniczą ponadto w rozwoju naczyń krwionośnych guzów nowotworowych (angiogenezie) [3].

Inhibitory z grupy TIMP poza hamowaniem aktywności MMPs wpływają także na regulację podziałów komórkowych i proliferację komórek oraz angiogenezę i apoptozę [4].

Podobnie jak w przypadku innych nowotworów złośliwych istnieją dowody wskazujące na udział żelatynaz oraz ich tkankowych inhibitorów w progresji raka błony śluzowej macicy. Wykazano, że ekspresja żelatynaz w komórkach raka oraz komórkach podścieliska, a także ich aktywność w mediach uzyskanych z hodowli komórkowych, w homogenatach

tkankowych, czy w popłuczynach z jamy macicy są wyższe w przypadku nowotworu w porównaniu do prawidłowej błony śluzowej macicy [5-8]. Uważa się, że MMP-2 i MMP-9 mogą warunkować większą agresywność raka błony śluzowej macicy oraz uczestniczyć w rozwoju unaczynienia nowotworu [5, 6], jednakże wyniki badań analizujących zależności pomiędzy żelatynazami a klinicznymi i histopatologicznymi cechami raka trzonu macicy, jak również oceniających przydatność wykorzystania tych enzymów jako czynników prognostycznych, wykazują dużą rozbieżność [6, 7, 9, 10, 11].

Cel pracy

Celem niniejszego badania była ocena aktywności MMP-2 i MMP-9 oraz zawartości TIMP-1 i TIMP-2 w wycinkach raka błony śluzowej macicy oraz prawidłowego *endometrium*, a także analiza zależności pomiędzy aktywnością żelatynaz i zawartością TIMP-1 i TIMP-2 a klinicznymi i histopatologicznymi cechami odzwierciedlającymi agresywność raka.

Materiał i metody

Materiał do badań, który obejmował 28 przypadków raka trzonu macicy oraz 15 wycinków prawidłowego *endometrium*, pobrano z preparatów pooperacyjnych uzyskanych w II Klinice Ginekologii Akademii Medycznej w Lublinie. Wycinki zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temp. -75°C. Typ histologiczny wszystkich raków określono jako *adenocarcinoma endometriale*. W 11 (39,3%) gruczolakorakach stwierdzono wysoki stopień zróżnicowania – G1, 13 (46,4%) przypadków określono jako G2, a w 4 (14,3%) stwierdzono elementy o niskim zróżnicowaniu – G3. Dwanaście raków (42,9%) naciekało błonę mięśniową macicy powyżej połowy, a 14 (50%) poniżej połowy jej grubości. W 2 przypadkach naciek (7,1%) ograniczony był do błony śluzowej. Zaawansowanie kliniczne gruczolakoraków *endometrium* objętych badaniem, ustalone według klasyfikacji FIGO, przedstawiało się następująco: stopień Ia – 2 (7,1%), stopień Ib – 11 (39,3%),

stopień Ic – 9 (32,1%), (w sumie w stopniu I – 22 przypadki tj. 78,6%), stopień IIa – 4 (14,3%), stopień IIIa – 2 (7,1%). Pośród 15 wycinków prawidłowej błony śluzowej macicy 8 pobrano w fazie wzrostowej a 7 w fazie wydzielniczej.

Do ekstrakcji metaloproteaz i ich inhibitorów wykorzystano dwuetapową metodę opracowaną przez Woessnera [12], która jest również efektywna w uzyskiwaniu tkankowych inhibitorów metaloproteaz [13]. Próbkę po przemyciu roztworem soli fizjologicznej osuszano przy pomocy bibuły, ważono, a następnie homogenizowano w 20 objętościach buforu 0,25% Tritonu X-100 (pH 7,4) zawierającego 10mM CaCl₂. Homogenizację wykonywano przy pomocy homogenizatora Wheaton Overhead Stirer (Milville, N. J.), przy liczbie obrotów 2500/min., przez 2min., w łaźni lodowej. Homogenaty wirovano przy 6000xg, w temperaturze 4°C, przez 30min. Uzyskany supernatant stanowiący ekstrakt tritonowy zachowywano do dalszych badań. Osad zawieszano, a następnie ekstrahowano w 20 objętościach buforu 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 100mM CaCl₂, 150mM NaCl w temperaturze 60°C, przez 6min., przy stałym mechanicznym wstrząsaniu. Po odwirowaniu w 20000xg w temperaturze 4°C, przez 30min., uzyskiwano supernatant, który jako ekstrakt cieplny wykorzystano do dalszych badań. Ekstrakty poddawano jednodobowej dializie wobec buforu 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 10mM CaCl₂, 200mM NaCl, 0,02% NaN₃, 0,05 % Brij-35 w temperaturze 4°C. Stężenie białka w ekstraktach oznaczano metodą Lowry w modyfikacji Cadmana i wsp [14]. Zgodnie z danymi przedstawionymi przez Woessnera [12] ekstrakcja cieplna pozwala na wydzielenie puli metaloproteaz związanych *in vivo* z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, podczas gdy w wyniku ekstrakcji tritonowej uzyskuje się w głównej mierze enzymy zlokalizowane w komórkach i wydzielone do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, które nie są związane z białkami macierzy.

Identyfikację i ocenę aktywności MMP-2 i MMP-9 przeprowadzono przy pomocy zymografii, którą wykonano według metody opisanej przez Hibbs i wsp. [15], zmodyfikowanej na podstawie pracy Kleiner i Stetler-Stevenson [16]. Metoda opiera się na zdolności MMP-2 i MMP-9 do degradacji żelatyny inkorporowanej w żełe poliakryloamidowe. Elektroforezę metodą Laemmli [17] przeprowadzano w temperaturze 4°C, przy użyciu aparatu MiniProtean II (BioRad, Richmond, C. A.), na 10% żelach poliakryloamidowych o grubości 0,75mm, zawierających 10% dodecylsulfian sodu (SDS). Jako substrat dla MMP-2 i MMP-9 użyto żelatyny Type A Porcine Skin Gelatin, 300 Bloom, (Sigma, G 2500), którą włączano w żełe w stężeniu 0,8mg/ml. Następnie żełe płukano w 2,5% roztworze Tritonu X-100 dwukrotnie po 15min. oraz dwukrotnie po 5min. w buforze 50mM Tris-HCl (pH 7,6), 10mM CaCl₂, 5mM ZnCl₂, 1% Triton X-100, 0,02% NaN₃. Po wypłukaniu żełe inkubowano w buforze 50mM Tris-HCl (pH 7,6), 10mM CaCl₂, 5mM ZnCl₂, 1% Triton X-100, 0,02% NaN₃ w obecności 1mM octanu aminofenylortęciowego (ang. *aminophenylmercuric acetate* – APMA; Sigma, A-9563) w temp 37°C przez 18 godzin. Następnie żełe barwiono 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma, B-0149) w roztworze 40% metanolu i 7% kwasu octowego przez 3 godziny i odbarwiano w 7% kwasie octowym przez 1 godzinę.

Po zabarwieniu i odbarwieniu żeli aktywność enzymów

widoczna jest w postaci bezbarwnych prążków. Identyfikacji MMP-2 i MMP-9 dokonano na podstawie ich specyficzności substratowej względem żelatyny, porównania migracji uzyskanych prążków z migracją oczyszczonych metaloproteaz oraz z migracją standardów masowych. Jako standardów użyto 72kD Gelatinase (Roche Diagnostics, nr kat. 1782916) i 92kD Gelatinase (Roche Diagnostics, nr kat. 1758896). Kontrolnie wykonywano zymografie, w których żełe inkubowano w obecności specyficznego inhibitora metaloproteaz 1,10-fenantroliny (1,10-phenantroline, Sigma, P 9375) w stężeniu końcowym 2mM lub inhibitora proteaz serynowych fluorku fenylometylosulfonowego (ang. *phenylmethylsulfonyl fluoride* – PMSF, Sigma, P 7626) w stężeniu 1mM. Inkubacja żeli z 1,10-fenantroliną powodowała całkowitą inhibicję aktywności enzymów, podczas gdy PMSF nie wpływał na ich aktywność.

Analizę ilościową przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego ONE-Dscan wersja 3.1 (Scanalytisc, Inc., Fairfax, V.A.). Aktywność obliczano poprzez porównanie wartości iloczynu zintegrowanej gęstości optycznej i szerokości prążka badanego oraz prążków wskaźnikowej MMP-2 o znanej aktywności. Wykonując zymografię dla różnych aktywności wskaźnikowej MMP-2 stwierdzono proporcjonalny wzrost zintegrowanej gęstości optycznej w stosunku do aktywności enzymu. Aktywność przedstawiono w jednostkach arbitralnych. Jednostkę arbitralną (j.a.) zdefiniowano jako aktywność żelatynolityczną równą aktywności 10mU wskaźnikowej MMP-2. Aktywność przeliczano na gram białka.

Pomiaru stężenia inhibitorów w ekstraktach dokonano metodą ELISA przy pomocy zestawów firmy Amersham Pharmacia Biotech: Biotrak, *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) human*, ELISA system (RPN 2611) oraz Biotrak, *Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) human*, ELISA system (RPN 2618) według zaleceń producenta w mieszaninie ekstraktów tritonowych i cieplnych o równej ilości białka.

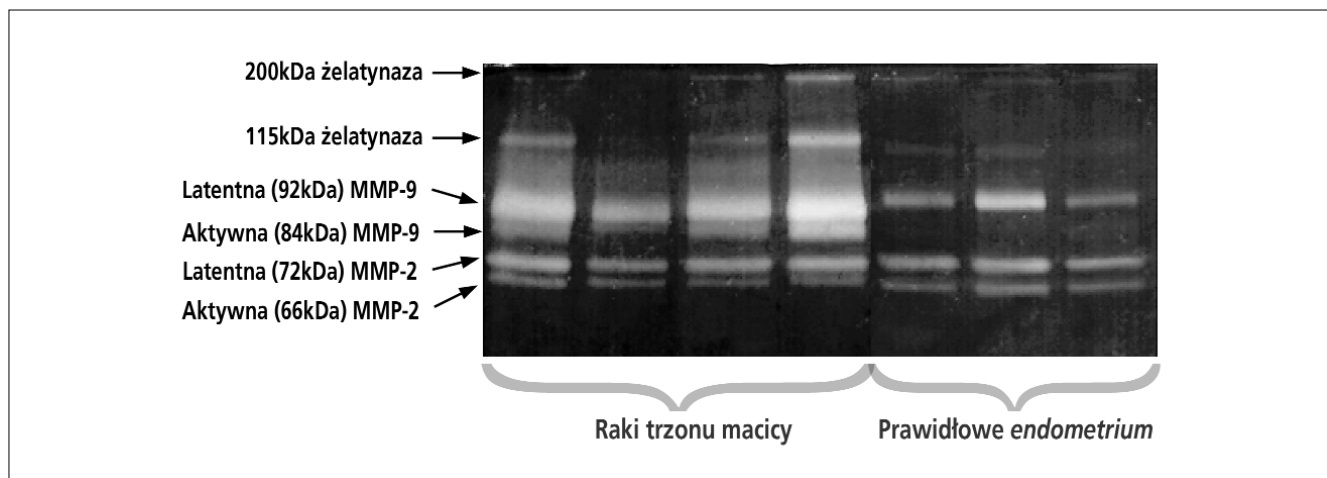
Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu komputerowego Statistica.Statsoft wersja 5.0. Rozkład w grupach sprawdzano testami Shapiro-Wilka, Kołomogorowa-Smirowa i Lillieforsa. W przypadku rozkładu normalnego wykorzystano testy parametryczne t-Studenta dla prób niezależnych i t-Studenta dla prób zależnych oraz korelację Pearsona. W przypadku rozkładu nienormalnego stosowano testy nieparametryczne: Manna-Whitneya i Wilcoxon oraz korelację Spearmana. P<0,05 przyjęto za statystycznie istotne. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią ± błąd standardowy średniej.

Wyniki

Zymografia wykazała obecność aktywnej MMP-2 (66kDa MMP-2), latentnej MMP-2 (72kDa MMP-2), aktywnej MMP-9 (84kDa MMP-9) i latentnej MMP-9 (92kDa MMP-9) oraz żelatynaz o masach cząsteczkowych 115kDa i 200kDa (Rycina 1).

Zarówno w rakach *endometrium* jak i w tkankach kontrolnych stwierdzono aktywną i latentną MMP-2 oraz latentną formę MMP-9, podczas gdy obecność aktywnej MMP-9 była charakterystyczna dla próbek raka i stwierdzono ją jedynie w nielicznych przypadkach prawidłowej błony śluzowej. (Rycina 1).

Bogusiewicz M, et al.



Rycina 1. Ocena aktywności żelatynaz w gruczolakorakach trzonu macicy i *endometrium* prawidłowym przy pomocy zymografii. Stwierdzono obecność aktywnej MMP-2 (66kDa MMP-2), latentnej MMP-2 (72kDa MMP-2), aktywnej MMP-9 (84kDa MMP-9) i latentnej MMP-9 (92kDa MMP-9) oraz żelatynaz o masach cząsteczkowych 115kDa i 200kDa.

W wycinkach gruczolakoraka trzonu macicy aktywność MMP-9 znacząco przeważała nad MMP-2, podczas gdy w próbkach *endometrium* średnia aktywność MMP-9 była nieistotnie statystycznie niższa od aktywności MMP-2. Aktywność MMP-2 nie różniła się istotnie pomiędzy próbkami gruczolakoraka a tkankami kontrolnymi, natomiast aktywność MMP-9 w gruczolakorakach była znamienne statystycznie wyższa w porównaniu do próbek *endometrium* (Rycina 2).

Podobnie poziom aktywacji enzymów wyrażony przez stosunek formy aktywnej do latentnej danej metaloproteazy w przypadku MMP-2 nie różnił się pomiędzy badanymi grupami ($0,44 \pm 0,06$ w rakach wobec $0,43 \pm 0,07$ w *endometrium*), a w przypadku MMP-9 był znacząco wyższy w gruczolakorakach ($0,18 \pm 0,005$) w porównaniu do prawidłowego *endometrium* ($0,012 \pm 0,001$), $p < 0,001$.

Aktywność żelatynaz o masach cząsteczkowych 115kDa i 200kDa była istotnie statystycznie wyższa w próbkach raka

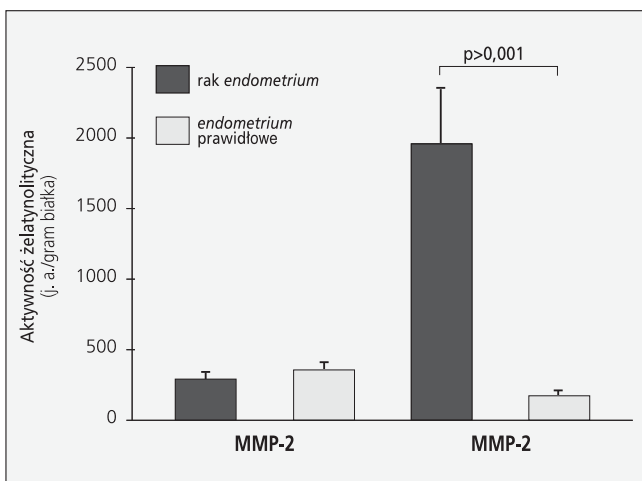
w porównaniu do tkanek kontrolnych i rosła wraz z aktywnością MMP-9.

Wyższą aktywność enzymów uzyskiwano w ekstraktach cieplnych. Dla MMP-2 odsetek aktywności w ekstraktach cieplnych wynosił 69,0% w gruczolakorakach oraz 79,4% w tkankach kontrolnych, natomiast dla MMP-9 odpowiednio 68,3% i 77,0%.

Zawartość TIMP-1 jak również TIMP-2 nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy badanymi grupami (Tabela I).

Tabela I. Zawartość tkankowych inhibitorów metaloproteaz TIMP-1 i TIMP-2 w gruczolakorakach trzonu macicy i *endometrium* prawidłowym. Różnice nie są istotne statystycznie. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm błąd standardowy średniej.

	Raki trzonu macicy	Prawidłowa błona śluzowa macicy
TIMP-1 μg/gram białka	15,5 \pm 2,0	11,1 \pm 2,2
TIMP-2 μg/gram białka	26,3 \pm 1,9	33,6 \pm 5,9



Rycina 2. Aktywność MMP-2 i MMP-9 w gruczolakorakach trzonu macicy i *endometrium* prawidłowym. Istotnie statystycznie wyższa aktywność MMP-9 w gruczolakorakach w porównaniu do tkanek kontrolnych ($p < 0,001$).

Wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm błąd standardowy średniej.

Zarówno w próbkach raka jak i prawidłowego *endometrium* nie stwierdzono zależności pomiędzy zawartością TIMP-1 a aktywnością lub poziomem aktywacji MMP-9 oraz zawartością TIMP-2 a aktywnością lub poziomem aktywacji MMP-2.

Aktywność metaloproteaz i zawartość ich inhibitorów analizowano w aspekcie parametrów histopatologicznych i klinicznych gruczolakoraków *endometrium* takich jak: stopień zróżnicowania histologicznego, głębokość naciekania *myometrium* oraz stopień zaawansowania klinicznego wg FIGO. Ponieważ w zebranych materiałach wśród trzech z czterech raków w stopniu G3 w utkaniu nowotworu występowały obszary zarówno średnio jak i nisko zróżnicowane, przypadki o stopniu zróżnicowania G2 i G3 połączono w jedną grupę.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic aktywności MMP-2 oraz MMP-9 pomiędzy rakami w stopniu G1 a nowotworami ujętymi w grupę G2-G3, chociaż w przypadku MMP-9 aktywność enzymu była ponad dwukrotnie wyższa w rakach średnio i nisko w porównaniu do wysoko zróżnicowanych. Poziom aktywacji MMP-2 nie różnił się pomiędzy grupami, natomiast poziom aktywacji MMP-9 był nieistotnie statystycznie wyższy w grupie G2-G3, w porównaniu do G1 ($0,36 \pm 0,24$ wobec $0,14 \pm 0,08$).

Zawartość TIMP-1 wynosiła $16,9 \pm 2,8 \mu\text{g}/\text{gram}$ białka w grupie G1 oraz $14,8 \pm 2,9 \mu\text{g}/\text{gram}$ w grupie G2-G3, a TIMP-2 odpowiednio $25,9 \pm 2,4 \mu\text{g}/\text{gram}$ białka i $26,5 \pm 2,7 \mu\text{g}/\text{gram}$ białka. Powyższe różnice nie były istotne statystycznie.

Nie stwierdzono zależności pomiędzy aktywnością MMP-2 a głębokością naciekania mięśnia macicy. Średnia aktywność MMP-9 nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy grupami raków, w których głębokość naciekania mięśnia macicy nie przekraczała i przekraczała połowę jej grubości, była natomiast znacznie niższa w gruczolakorakach ograniczonych do błony śluzowej macicy w porównaniu do raków naciekających mięsień macicy. Jednakże, ponieważ tylko w dwu przypadkach gruczolakoraka trzonu macicy nacieki ograniczony był wyłącznie do błony śluzowej niemożliwe było zastosowanie analizy statystycznej. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy stopniem aktywacji MMP-2 i MMP-9, jak również zawartością TIMP-1 i TIMP-2 a głębokością naciekania mięśnia macicy. Nie wykazano zależności pomiędzy aktywnością badanych metaloproteaz, jak również zawartością ich tkankowych inhibitorów a stopniem klinicznego zaawansowania nowotworów.

Aktywność badanych enzymów, a także poziom ich aktywacji oraz zawartość TIMP-1 i TIMP-2 nie różniły się istotnie pomiędzy próbkami błony śluzowej macicy w fazie wzrostowej i wydzielniczej, co uzasadnia połączenie tych tkanek w jedną grupę kontrolną.

Dyskusja

W niniejszej pracy do ekstrakcji metaloproteaz i ich inhibitorów wykorzystana została metoda opracowana przez Woessnera [12], którą charakteryzuje wysoka efektywność pozwalająca na uzyskanie 95% metaloproteaz zawartych w badanym materiale. Kluczowe znaczenie ma etap polegający na ekstrakcji osadu w temperaturze 60°C , w środowisku zawierającym nadmiar jonów wapnia. W tych warunkach następuje kurczenie się włókien kolagenowych ułatwiające dysocjację metaloproteaz od elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Dodatkowo nadmiar jonów wapnia w środowisku (stężenie 100mM w buforze) jest czynnikiem stabilizującym cząsteczki enzymów. Aktywność żelatynaz oceniono przy pomocy zymografii. Metoda ta oparta na elektroforezie z użyciem żeli zawierających substrat dla MMP-2 i MMP-9 pozwala na określenie aktywności zarówno latentnych jak i aktywnych form obu enzymów. Jak wykazały badania Kleinera i Stetler-Stevensona [16] metodę zymografii charakteryzuje wysoka czułość, co daje możliwość wykrycia aktywności nawet pikogramowych ilości żelatynaz.

W rakach trzonu macicy w porównaniu do prawidłowego *endometrium* stwierdziliśmy znacznie wyższą aktywność i po-

ziom aktywacji MMP-9, podczas gdy wartości MMP-2 nie różniły się istotnie pomiędzy tkankami badanymi a kontrolnymi. Uzyskane wyniki wskazują, że MMP-9 odgrywa istotną rolę w inwazji gruczolakoraka endometrialnego trzonu macicy natomiast nie potwierdzają udziału MMP-2 w tym procesie. Badania Ueno i wsp. [8], którzy stwierdzili wyższą zawartość MMP-9, ale nie MMP-2, w rakach trzonu macicy w porównaniu do kontrolnego *endometrium* wykorzystując metodę immunoenzymatyczną w pełni potwierdzają tę obserwację, z zastrzeżeniem, że wykorzystane przez tych autorów przeciwciała wykrywały jedynie latentne formy enzymów.

Większość opublikowanych dotychczas wyników badań sugeruje jednak, że w proces progresji raka trzonu macicy zaangażowane mogą być obie żelatynazy. Takemura i wsp. [18] oraz Tamakoshi i wsp. [19, 20] obserwowali wyższą aktywność MMP-9 w mediach uzyskanych z hodowli komórek raków *endometrium* w porównaniu do prawidłowego *endometrium*, ale jednocześnie, przeciwnie do uzyskanych przez nas wyników, bardziej nasiloną aktywację MMP-2 w rakach w porównaniu do prawidłowej błony śluzowej. Määttä i wsp. [21] obserwowali aktywne formy obu żelatynaz w próbkach raków *endometrium*, ale nie prawidłowej błony śluzowej macicy. Wydaje się jednak, że hodowle komórkowe [18-20], jak również prosta homogenizacja tkanek zastosowana przez Määttä i wsp. [21], w przypadku badań dotyczących metaloproteaz, enzymów, które w przeważającej części związane są z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, nie odzwierciedlają stanu istniejącego *in vivo*. Należy tu nadmienić, że ok. 70-80% aktywności żelatynaz stwierdziliśmy w ekstraktach cieplnych, która jak już wspomniano zawiera pulę enzymów *in vivo* związaną z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. W badaniach z zastosowaniem hybrydyzacji *in situ* Iurlaro i wsp. [6] odnotowali wyższą ekspresję zarówno MMP-2 mRNA jak i MMP-9 mRNA w rakach w porównaniu do *endometrium* prawidłowego. Poziom ekspresji genów dla żelatynaz nie przesądza jednak o ich aktywności.

Reasumując, w świetle naszych badań nie można MMP-2 przypisać równie istotnej jak MMP-9 roli w procesie progresji raka trzonu macicy. Warto przy tym zauważyć, że MMP-2 i MMP-9 pomimo zbliżonej struktury i specyficzności substratowej różnią się istotnie w zakresie sekwencji promotorycznych genów, a co za tym idzie, podlegają innym mechanizmom kontroli ekspresji. MMP-9 należy do grupy tzw. „indukowanych” metaloproteaz, których geny posiadają sekwencje regulatorowe takie jak ramka TATA oraz sekwencje dla AP-1 (ang. *activating protein-1*), PEA3 (ang. *polyoma enhancer activator 3*) i NF- κ B (ang. *nuclear factor- κ B*) [3, 4]. Synteza MMP-9 indukowana jest w przebiegu fizjologicznych i patologicznych procesów przebiegających z nasiloną degradacją macierzy zewnątrzkomórkowej [4]. W przeciwieństwie do MMP-2 promotor genu dla MMP-2 wykazuje cechy charakterystyczne dla genów podlegających ekspresji konstytucyjnej (ang. *housekeeping genes*) [3, 4].

Wyniki badań oceniających zależności pomiędzy żelatynazami a cechami klinicznymi i histopatologicznymi warunkującymi agresywność raka *endometrium* przyniosły rozbieżne rezultaty. O ile Aglund i wsp. [9] oraz Di Nezza i wsp. [10] przy pomocy immunohistochemii stwierdzili wzrastającą ekspresję MMP-2 i MMP-9 wraz z odróżnicowaniem raków *endome-*

trium, to w badaniu Misugi i wsp. [11] przeprowadzonym z zastosowaniem tej samej metody obserwowano spadek ekspresji MMP-9 wraz z mniejszym zróżnicowaniem nowotworu oraz brak związku pomiędzy MMP-2 a stopniem zróżnicowania. W pracy Iurlaro i wsp. [6] ekspresja mRNA dla MMP-2 i MMP-9 oceniana przy pomocy hybrydyzacji *in situ* rosła wraz ze stopniem zróżnicowania nowotworów. Lopata i wsp. [7] nie wykazali jednak zależności pomiędzy aktywnością żelatynaz w popłuczynach z jamy macicy a stopniem zróżnicowania raka *endometrium*. W przeprowadzonym przez nas badaniu obserwowaliśmy wyższą średnią aktywność MMP-9 oraz poziom aktywacji enzymu w grupie gruczolakoraków o stopniu zróżnicowania G2-G3 w porównaniu do G1, jednakże różnice nie były istotne statystycznie. Nie stwierdziliśmy różnic w aktywności MMP-2. Wyniki te, pomimo, że nie są rozstrzygające, sugerują możliwość związku pomiędzy MMP-9 a stopniem zróżnicowania raka trzonu macicy.

Wyniki kilku badań wskazują na istotną rolę MMP-9 w przebiegu naciekania mięśnia macicy przez raka *endometrium* [6, 10, 22]. Odnotowaliśmy znacznie niższą aktywność i jedynie śladową aktywację MMP-9 oraz niższy poziom aktywacji MMP-9 w rakach ograniczonych do błony śluzowej w porównaniu do naciekających mięsień macicy. Choć w badanym materiale obecne były jedynie dwa przypadki raka bez stwierdzonej inwazji *myometrium*, co nie pozwala na wyciągnięcie definitywnych wniosków, można przypuszczać, że uzyskanie przez nowotwór właściwości inwazyjnych względem błony mięśniowej może wiązać się ze zwiększeniem syntezy oraz aktywacji żelatynaz. Nie stwierdziliśmy zależności pomiędzy aktywnością badanych metaloproteaz a stopniem klinicznego zaawansowania raka *endometrium*, co jest zgodne z obserwacjami innych autorów [7, 11]. Jedynie Anglund i wsp. [9] wykazali relacje pomiędzy ekspresją białka MMP-9 a klinicznym zaawansowaniem tego nowotworu.

Ueno i wsp. [8] odnotowali większą zawartość TIMP-1 w rakach *endometrium* oraz brak różnic w zawartość TIMP-2 pomiędzy rakami a tkankami kontrolnymi. Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają te obserwacje w zakresie TIMP-2. W przypadku TIMP-1 stwierdziliśmy, co prawda, wyższą o około 50% średnią zawartość tego białka w rakach w porównaniu do *endometrium* prawidłowego, ale różnica ta nie była znamienna statystycznie. Wydaje się, że wzrostowi aktywności MMP-9 w rakach *endometrium* towarzyszy względny niedobór TIMP-1, na co pośrednio wskazuje obserwowana przez nas wysoka aktywność żelatynaz o masach cząsteczkowych 115kDa i 200kDa, gdyż doświadczenia przeprowadzone przez Goldberg i wsp. [23] wykazały, że enzymy te mogą być homodimerami MMP-9 lub heterodimerami MMP-9 i MMP-1, których formowanie blokowane jest przez TIMP-1. W badaniu Määttä i wsp. [21] wyższą ekspresję mRNA dla TIMP-1 i TIMP-2 w gruczolakorakach w porównaniu do prawidłowego *endometrium* wykazano jedynie w komórkach podścieliska guza. Jednocześnie odnotowano wzrost ekspresji inhibitorów wraz ze stopniem zróżnicowania nowotworu. Badania immunohistochemiczne wykazały obecność TIMP-1 i TIMP-2 zarówno w komórkach raka jak i podścieliska, a zawartość inhibitorów malała wraz ze stopniem zróżnicowania histologicznego [8, 11]. W niniejszym badaniu nie stwierdzono zależności pomiędzy żadnym z analizowanych czynników progno-

stycznych a zawartością TIMP-1 i TIMP-2.

Jako tkankę kontrolną w przeprowadzonym przez nas badaniu wykorzystaliśmy wycinki prawidłowego *endometrium*. Prace Salamonsena [24, 25] i Maribaix [27] wskazują na udział metaloproteaz przede wszystkim w procesie złuszczenia błony śluzowej macicy podczas krwawienia miesiączkowego, czemu towarzyszy znaczne zwiększenie ich aktywności. Uwagę jednak zwraca fakt, że w obecnym badaniu niemal we wszystkich wycinkach prawidłowej błony śluzowej stwierdzona została forma aktywna MMP-2 oraz w 20% przypadków forma aktywna MMP-9, co dowodzi, że enzymy te uczestniczą w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej *endometrium* również podczas fazy proliferacyjnej i sekrecyjnej. Różnice w zawartości TIMP-1 i TIMP-2 pomiędzy *endometrium* wzrastającym a wydzielniczym nie były istotne statystycznie. Rozpatrując również wyniki uzyskane przez Zhang i Salamonsena [24, 27] wydaje się, że synteza tych białek w błonie śluzowej macicy w fazach wzrostowej i wydzielniczej jest stała.

Zwiększająca się wciąż ilość danych dotyczących roli metaloproteaz i ich inhibitorów w procesie nowotworzenia pozwala sądzić, iż wiedza ta może znaleźć zastosowanie kliniczne. Pomimo, że możliwości wykorzystania omawianych białek w diagnostyce i prognozowaniu przeżycia pacjentek chorych na raka *endometrium* nie są jednoznacznie ustalone, wykazano przydatność MMP-9 jako niezależnego czynnika rokowniczego [5, 9, 11]. Nie przeprowadzono dotychczas badań klinicznych z zastosowaniem inhibitorów metaloproteaz w leczeniu raka trzonu macicy, ale udokumentowano, że mogą one zmniejszać inwazyjność komórek tego nowotworu w warunkach *in vitro*, co wskazuje na możliwość ich terapeutycznego wykorzystania [11].

Wnioski

1. Wyniki naszych badań wskazują, że MMP-9 uczestniczy w progresji gruczolakoraka trzonu macicy, podczas gdy MMP-2 wydaje się nie odgrywać istotnej roli w tym procesie.
2. Wzrostowi aktywności MMP-9 w rakach *endometrium* towarzyszy względny niedobór TIMP-1.

Piśmiennictwo

1. Barsky S, Siegall G, Jannotta F, [et al.]. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest.* 1983, 49, 140-147.
2. Coussens L, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol.* 1996, 3, 895-904.
3. Westermarck J, Kahari V. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumour invasion. *FASEB J.* 1999, 13, 781-792.
4. Nagase H, Woessner J. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999, 274, 21491-21494.
5. Inoue Y, Abe K, Obata K, [et al.]. Immunohistochemical studies on matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and type-IV collagen in endometrial cancer. *J Obstet Gynaecol Res.* 1997, 23, 139-145.
6. Iurlaro M, Loverro G, Vacca A, [et al.]. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Eur J Clin Invest.* 1999, 29, 793-801.
7. Lopata A, Agresta F, Quinn M, [et al.]. Detection of endometrial cancer by determination of matrix metalloproteinases in the uterine cavity. *Gynecol Oncol.* 2003, 90, 318-324.
8. Ueno H, Yamashita K, Azumano I, [et al.]. Enhanced production and activation of matrix metalloproteinases-7 (matrilysin) in human endometrial carcinomas. *Int J Cancer.* 1999, 84, 470-477.

Aktywność metaloproteaz macierzowych -2 i -9 (MMP-2 i MMP-9) ...

9. Aglund K, Rauvala M, Puistola U, [et al.]. Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer – MMP-9 correlates to the grade and the stage. *Gynecol Oncol.* 2004, 94, 699-704.
10. Di Nezza L, Misajon A, Zhang J, [et al.]. Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. *Cancer.* 2002, 94, 1466-1475.
11. Misugi F, Sumi T, Okamoto E, [et al.]. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase in uterine endometrial carcinoma and a correlation between expression of matrix metalloproteinase-7 and prognosis. *Int J Mol Med.* 2005, 16, 541-546.
12. Woessner J. Quantification of matrix metalloproteinases in tissue samples. *Methods Enzymol.* 1995, 248, 510-528.
13. Zhu C, Woessner J. A tissue inhibitor of metalloproteinases and alpha-macroglobulins in the ovulating rat ovary: possible regulators of collagen matrix breakdown. *Biol Reprod.* 1991, 45, 334-342.
14. Cadman E, Bostwick I, Eichberg J. Determination of protein by a modified Lowry procedure in the presence of commonly used detergents. *Anal Biochem.* 1979, 96, 21-23.
15. Hibbs M, Hasty K, Seyer J, [et al.]. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem.* 1985, 260, 2493-2500.
16. Kleiner D, Stetler-Stevenson W. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem.* 1994, 218, 325-329.
17. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, 227, 680-685.
18. Takemura M, Azuma C, Kimura T, [et al.]. Malignant cell-specific gelatinase activity in human endometrial carcinoma. *Cancer.* 1992, 70, 147-151.
19. Tamakoshi K, Kikkawa F, Nawa A, [et al.]. Characterization of extracellular matrix-degrading proteinase and its inhibitor in gynecologic cancer tissue with clinically different metastatic form. *Cancer.* 1995, 76, 2565-2571.
20. Tamakoshi K, Kikkawa F, Nawa A, [et al.]. Different pattern of zymography between human gynecologic normal and malignant tissue. *Am J Obstet Gynecol.* 1994, 171, 478-484.
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. Enhanced expression by endometrial adenocarcinomas is associated with low differentiation. *Am J Clin Pathol.* 2000, 114, 402-411.
22. Yabushita H, Narumiya H, Hiratake K, [et al.]. The association of transforming growth factor-beta 1 with myometrial invasion of endometrial carcinomas through effects on matrix metalloproteinase. *J Obstet Gynaecol Res.* 2000, 26, 163-170.
23. Goldberg G, Strongin A, Collier I, [et al.]. Interaction of 92-kDa type IV collagenases with the tissue inhibitor of metalloproteinase prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem.* 1992, 267, 4583-4591.
24. Salamonsen L, Butt A, Hammond F, [et al.]. Production of endometrial matrix metalloproteinases, but not their inhibitors, is modulated by progesterone withdrawal in an in vitro model for menstruation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997, 82, 1409-1415.
25. Salamonsen L, Woolley D. Matrix metalloproteinases in normal menstruation. *Hum Reprod.* 1996, 11, suppl 2, 124-33.
26. Marbaix E, Donnez J, Courtoy P, [et al.]. Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc Natl Acad Sci.* 1992, 89, 11789-11793.
27. Zhang J, Salamonsen L. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1, -2, and -3 in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod.* 1997, 3, 735-741.