

Rola metaloproteaz macierzowych i ich inhibitorów w progresji raka jajnika – implikacje diagnostyczne i terapeutyczne

Matrix metalloproteinases and their inhibitors in ovarian cancer progression – diagnostic and therapeutic implications

Stettner Rafał, Bogusiewicz Michał, Rechberger Tomasz

II Katedra i Klinika Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Streszczenie

Metaloproteazy macierzowe (matrix metalloproteinases – MMPs) są enzymami protelitycznymi degradującymi białka macierzy zewnątrzkomórkowej.

Wraz ze swymi specyficznymi inhibitorami – tkankowymi inhibitorami metaloproteaz (tissue inhibitors of metalloproteinases – TIMPs), biorą udział w rozprzestrzenianiu się nowotworów złośliwych. Przeprowadzone w ostatnich latach badania wykazały, że metaloproteazy i ich inhibitory odgrywają istotną rolę w progresji raka jajnika uczestnicząc zarówno w miejscowym wzrastaniu guza jak i szerzeniu się nowotworu drogą płynu otrzewnowego.

Ocena stężenia niektórych metaloproteaz i ich inhibitorów w surowicy krwi okazała się być przydatna w diagnostyce różnicowej pomiędzy złośliwymi a granicznymi i łagodnymi guzami jajnika.

W szeregu badań wykazano, że ekspresja metaloproteaz w guzach pierwotnych, a także w zmianach przerzutowych, ma znaczenie prognostyczne. Ponadto przedoperacyjna ocena stężenia TIMP-1 w surowicy krwi pozwala na wyselekcjonowanie przypadków raka jajnika o agresywnym fenotypie i niekorzystnym rokowaniu.

Pomimo dużych oczekiwań, zastosowanie syntetycznych inhibitorów metaloproteaz nie przyniosło korzyści w leczeniu raka jajnika.

Słowa kluczowe: **metaloproteazy macierzowe / tkankowe inhibitory metaloproteaz / rak jajnika /**

Adres do korespondencji:

Tomasz Rechberger
II Katedra i Klinika Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
20-054 Lublin, ul. Jaczewskiego 8
tel. 081 7244268, fax. 0817244849
e-mail: rechbergt@yahoo.com

Otrzymano: 15.10.2008
Zaakceptowano do druku: 15.12.2008

Abstract

Matrix metalloproteinases are proteolytic enzymes which degrade extracellular matrix proteins. Along with their specific inhibitors - tissue inhibitors of metalloproteinases - they play an important role in the spreading of malignant tumours.

The research conducted in recent years has shown that metalloproteinases and their inhibitors contribute substantially to the ovarian cancer progression, participating both in in situ tumours growth, and the spreading of neoplasm via peritoneal fluid. The assessment of serum concentration of some metalloproteinases and their inhibitors appeared to be useful in differential diagnosis between malignant, borderline and benign ovarian tumours. In numerous research, it was revealed that the expression of metalloproteinases in primary tumours and in metastatic changes has a prognostic value. Moreover, the pre-operational assessment of concentration of TIMP-1 in blood serum allows to select the cases of an ovarian cancer with an aggressive phenotype and unfavourable prognosis. Despite great expectations, the usage of synthetic inhibitors of metalloproteinases did not bring significant changes and improvement to ovarian cancer treatment.

Key words: **metalloproteinases / tissue inhibitors of metalloproteinase / ovarian cancer /**

Wstęp

Rak jajnika zajmuje drugie miejsce co do częstości występowania wśród nowotworów narządu płciowego u kobiet. Rocznie rejestruje się w Polsce około 2700 nowych zachorowań, co przekłada się na zapadalność rzędu 14,4 na 100000 kobiet [1]. Ponieważ w większości przypadków nowotwór ten rozpoznawany jest w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego, wyniki leczenia są niezadowalające. W związku z tym, rak jajnika jest jedną z głównych przyczyn zgonów kobiet z powodu nowotworów układu płciowego. Poszukując nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych, które mogłyby zwiększyć możliwości wczesnego rozpoznania oraz poprawić efekty leczenia, zwrócono uwagę na metaloproteazy macierzowe (MMPs – *matrix metalloproteinases*) – enzymy, które odgrywają istotną rolę w progresji nowotworów złośliwych.

Budowa i klasyfikacja metaloproteaz

Metaloproteazy macierzowe, zwane również kolagenazami lub matryksynami są to metalozależne enzymy proteolityczne, należące do endopeptydaz, które charakteryzuje obecność jonu cynku (Zn^{2+}) w miejscu aktywnym oraz zdolność do trawienia białek macierzy zewnątrzkomórkowej [2, 3, 4].

MMPs syntetyzowane są w komórkach w formie preproenzymu i uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jako proenzymy. Niektóre (metaloproteazy typu błonowego) pozostają w łączności z zewnętrzną powierzchnią błony komórkowej. Metaloproteazy podlegają interakcjom z nieswoistymi inhibitorami enzymów proteolitycznych, jak alfa2-makroglobulina oraz inhibitorami specyficznymi – tkankowymi inhibitorami metaloproteaz (TIMPs – *tissue inhibitors of metalloproeinas*) [2, 3, 4].

Dotychczas poznano 28 metaloproteaz, z których 22 występują u ludzi. (Tabela I).

Cząsteczki metaloproteaz zbudowane są z kilku domen (fragmentów białka):

- 1) peptydu sygnałowego, który bierze udział w transporcie cząsteczki enzymu przez siateczkę śródplazmatyczną;
- 2) propeptydu, którego odcięcie prowadzi do aktywacji enzymu – pełni rolę swoistego inhibitora wewnętrznego;

- 3) domeny katalitycznej, w której znajduje się centrum aktywne zawierające jon cynku – z domeną tą związanym jest kilka jonów wapnia, które pełnią funkcję stabilizującą enzym, a także uczestniczą w jego aktywacji;
- 4) domeny karboksyterminalnej, która łączy się z domeną katalityczną przy pomocy krótkiego regionu zawiąsowego – uczestniczy ona w rozpoznawaniu substratów lub wiązaniu enzymów z ich inhibitorami (TIMPs);
- 5) regionu zawiąsowego – jego rola polega na rozpoznawaniu substratów i w ten sposób determinowaniu orientacji domeny karboksyterminalnej.

Najprostsza strukturalnie cząsteczka matrylizyny (MMP-7) zawiera propeptyd, domenę katalityczną oraz region zawiąsowy. W pozostałych metaloproteazach występują dodatkowe domeny, które warunkują powinowactwo do substratów oraz funkcję biologiczną poszczególnych enzymów.

Na podstawie różnic w budowie, a także specyficzności substratowej wyróżnia się 6 grup metaloproteaz [5, 6]:

1. kolagenazy – degradujące kolagen typu I, II, III, VI,
2. żelatynazy – degradujące żelatynę i kolagen typu IV,
3. stromelizyny – o dużym spektrum działania np. fibronektyna, kolagen,
4. matrylizyny – mające zdolność do degradowania fibronektyny, fibrynogenu oraz kolagenu typu IV,
5. metaloproteazy typu błonowego- mające zdolność aktywacji innych metaloproteinaz. Posiadają one domenę przezbłonową, którą kotwiczą w błonie komórkowej,
6. metaloproteazy niesklasyfikowane w żadnej z wyżej wymienionych grup (MMP-12, 19, 20, 23, 27, 28).

Aktywacja metaloproteaz

Metaloproteazy ulegają aktywacji w mechanizmie nazwanym „włącznikiem cysteinowym” (*cysteine swich*). Polega on na odcięciu propeptydu i odsłonięciu miejsca aktywnego poprzez zerwanie wiązania między grupą tiolową cysteiny, a atomem cynku. W ten sposób dochodzi do aktywacji pro-MMPs przy udziale aktywnych form MMPs oraz proteaz serynowych takich jak elastaza leukocytna, katepsyna 6, tryptyna, układ plazminogenu.

Swoisty mechanizm aktywacji występuje w przypadku MMP-2. Biorą w nim udział MT1-MMP oraz TIMP-2. Aktywna MT1-MMP stanowi receptor dla TIMP-2.

Do kompleksu MT1-MMP/TIMP-2 przyłącza się proMMP-2 i dopiero wówczas podlega ona aktywacji przez znajdującą się w pobliżu, inną MT1-MMP [7, 8].

Do aktywacji MMPs prowadzi również zmiana konformacji cząsteczki w pobliżu centrum aktywnego. Mają do tego zdolność związki reagujące z grupą tiolową, takie jak: utleniony glutation, reaktywne formy tlenu oraz w warunkach *in vitro* octan 4-aminofenylorteciowy, dodecylosiarczan sodu, kwas podchlorowy, siarczan potasu. Substancje te znajdują zastosowanie w metodach laboratoryjnych służących do wykrywania aktywności metaloproteaz.

Tkankowe inhibitory metaloproteaz

Tkankowe inhibitory metaloproteaz posiadają zdolność hamowania aktywności metaloproteaz w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Stanowi je grupa białek o masie cząsteczkowej od 20 do 30 kDa, posiadających względem siebie 30-40% homologię aminokwasową. Znane są 4 tkankowe inhibitory metaloproteaz macierzowych (TIMP-1, -2, -3, -4) [9, 10, 11, 12].

TIMPs łączą się w stosunku stechiometrycznym 1:1 z aktywnymi lub latentnymi formami enzymów, poprzez wiązania niekowalencyjne, blokując łączenie się z substratem lub aktywację metaloproteaz. Pomimo, że aktywność wszystkich proteaz z rodziny MMP podlega regulacji przez ich tkankowe inhibitory występuje zróżnicowane powinowactwo pomiędzy enzymami a inhibitorami. TIMP-1 wykazuje preferencję do MMP-1 i MMP-9, słabiej działając na MMP-2 i MT1-MMP [4, 13]. TIMP-2, który najsilniej blokuje MMP-2, posiada słabsze powinowactwo do MMP-3, MMP-9 i MT1-MMP [4]. TIMP-2 uczestniczy również w opisanym uprzednio procesie aktywacji pro-MMP-2. Badania Butlera i wsp. [14], w których do hodowli komórek włókniakomięsa HT-1080 dodawano TIMP-2 wykazały, że rola tego inhibitora uzależniona jest od jego stężenia. W mniejszych stężeniach TIMP-2 aktywuje enzym, podczas gdy w wyższych blokuje aktywność MMP-2. Biologiczna rola inhibitorów z grupy TIMP nie ogranicza się wyłącznie do regulowania aktywności metaloproteaz. Wykazują one działanie proproliferacyjne i antyapoptotyczne, regulują angiogenezę, organogenezę, a nawet steroidogenezę [15, 16, 17, 18, 19, 20].

Rola metaloproteaz i ich inhibitorów w progresji nowotworów złośliwych

Podczas inwazji nowotworu złośliwego komórki guza naciekają tkanki sąsiadujące, migrują do i z naczyń krwionośnych oraz tworzą zmiany przerzutowe. Kluczowe znaczenie dla rozwoju nowotworu ma ponadto powstawanie nowych, zaopatrujących go naczyń krwionośnych (angiogeneza). Procesy te, związane z nasilonym niszczeniem i przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej, zachodzą przy znaczącym udziale metaloproteaz [21, 22, 23, 24].

Komórki nowotworowe dzięki proteolitycznej degradacji błon postawnych i otaczającego zrębu uzyskują możliwość migracji przez zmodyfikowaną macierz zewnątrzkomórkową. Szczególnie istotną rolę w tym procesie odgrywa przełamanie

bariery jaką tworzy błona postawna [2, 3, 4, 5]. Struktura ta zbudowana jest przede wszystkim z kolagenu typu IV, a także z fibronektyny, lamininy, nidogenu i siarczanu heparanu [25]. Liotta i wsp. [26] jako pierwsi wykazali, że zdolność nowotworu złośliwego (czerniaka) do tworzenia przerzutów związana jest z aktywnością kolagenazy typu IV i nasiloną proteolizą błony podstawnej. Jej degradacja jest charakterystyczna wyłącznie dla nowotworów złośliwych i nie występuje w guzach łagodnych [27].

Ponieważ bez rozwoju dodatkowych naczyń krwionośnych nowotwór jest w stanie osiągnąć średnicę około 1-2mm, kluczową rolę w inwazji miejscowej, jak i powstawaniu przerzutów odgrywa proces angiogenezy. Stwierdzono, że komórki śródbłonna naczyń produkują MMP-2 oraz MMP-9, a ponadto poddane działaniu MMP-2 wytwarzają charakterystyczne dla angiogenezy zmiany morfologiczne w postaci układów tubularnych. Zdolność do blokowania tego efektu posiadają TIMP-1 oraz TIMP-2 [28]. Badania Fang i wsp. [29] przeprowadzone na szczurzych komórkach chrząstki mięsaka wykazały, że MMP-2 jest niezbędna w procesie angiogenezy indukowanej przez ten nowotwór. Wykazano również, że MMP-9 uwalnia aktywny czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) z rezerwuarów macierzy zewnątrzkomórkowej [30], natomiast TIMP-2 hamuje ekspresję tego czynnika [31]. Rola MMPs i ich tkankowych inhibitorów w procesie angiogenezy indukowanej przez nowotwór nie ogranicza się więc jedynie do przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej, ale polega również na regulowaniu proliferacji i różnicowania komórek śródbłonkowych oraz kontrolowaniu wydzielania i aktywacji czynników proangiogennych.

Rola metaloproteaz i ich inhibitorów w progresji raka jajnika

Wyniki szeregu badań dowodzą, że metaloproteazy i ich inhibitory zaangażowane są w miejscową inwazję raka jajnika, szerzenie się nowotworu drogą płynu otrzewnowego, jak również w proces powstawania przesięku do jamy otrzewnej. Wykazano, że ekspresja lub aktywność enzymatyczna MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-26, MT-MMP-1, a także TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4 są wyższe w skrawkach guzów złośliwych w porównaniu do guzów o granicznej złośliwości oraz łagodnych, przy czym w większości badań nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy nowotworami łagodnymi, a nowotworami o granicznej złośliwości [32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39].

Z danych tych wynika, że zwiększeniu syntezy metaloproteaz w procesie progresji raka jajnika towarzyszy zwiększenie syntezy ich inhibitorów. W przypadku TIMP-2 zjawisko to może odzwierciedlać udział inhibitora w aktywacji pro-MMP-2. Ponadto wykazano, że TIMP-2 hamuje apoptozę indukowaną przez cislarynę oraz pobudza ekspresję MMP-2 [40].

Rola biologiczna wzrostu stężenia tkankowego pozostałych inhibitorów z grupy TIMP jest trudna do określenia, zwłaszcza w przypadku TIMP-1, gdyż w przeciwieństwie do wyników przedstawionych w cytowanych powyżej badaniach, Sakata i wsp. [33] obserwowali obniżoną ekspresję TIMP-1 w guzach złośliwych.

Stettner R, et al.

Badania Cai i wsp. [41] wykazują, że MMPs odgrywają szczególnie istotną rolę we wczesnych etapach progresji raka jajnika. Oceniając ekspresję MMP-2 i MMP-9 w jajnikach usuniętych podczas prewencyjnej ooforektomii, autorzy ci częściej stwierdzali obecność enzymów we wczesnych ogniskach raka niż w rozwiniętych guzach, a ekspresja białka MMP-2 i MMP-9 ściśle kojarzyła się z dezintegracją błony podstawnej. Interesujący jest też fakt, że w przypadku miejscowego szerzenia się zmiany, ekspresja MMP-1, MMP-2, MMP-9, a także TIMP-2 zachodzi głównie w komórkach podścieliska, co wskazuje na indukowanie przez nowotwór wzmoczonej aktywności fibroblastów w prawidłowych tkankach otaczających guz [42, 43]. Zjawisko to obserwowano również w warunkach *in vitro* - komórki raka jajnika hodowane wspólnie z fibroblastami pobudzają te drugie do wydzielania MMP-2 [44].

Metaloproteazy uczestniczą w szerzeniu się raka jajnika drogą płynu otrzewnowego. Wykazano, że zdolność przylegania rakowych komórek linii OVCA do otrzewnej myszy, uzależniona jest od degradacji fibronektyny i witronektyny przez MMP-2 [45]. Komórki rakowe w płynie otrzewnowym wykazują wysoką ekspresję MMP-2 i MMP-9 [46], a aktywność formy aktywnej MMP-2 jest wyższa w płynie otrzewnowym u pacjentek z rakiem jajnika, w porównaniu do pacjentek z guzami łagodnymi, a także wyższa w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego raka, w porównaniu do stopnia I i II [47].

Z obserwacji Davidsona i wsp. [42] wynika, że o ile w zmianach pierwotnych źródłem MMPs i ich inhibitorów są głównie komórki podścieliska, to nabieranie zdolności guza do tworzenia przerzutów związane jest ze wzmocnieniem wydzielania MMP-2 oraz zahamowaniem syntezy TIMP-2 przez komórki nowotworowe. Obserwację tę potwierdzają badania Schmalfelda i wsp. [48] wykazujące wyższą aktywność MMP-2, a także MMP-9 w przerzutach raka do sieci większej w porównaniu do ognisk pierwotnych. Oprócz MMP-2 i MMP-9 istotną rolę w szerzeniu się raka jajnika poprzez płyn otrzewnowy mogą odgrywać także metaloproteazy typu błonowego [49].

Doświadczenia przeprowadzone na myszach, którym wszczepiono raka jajnika oraz w hodowlach komórek raka jajnika wykazały, że MMP-9 oraz, choć w mniejszym stopniu, MMP-2 uwalniają aktywny VEGF, który z kolei pobudza powstawanie wysięku otrzewnowego [47]. Wydaje się, że mechanizm ten może mieć istotne znaczenie w przebiegu raka jajnika u kobiet, gdyż wykazano, że MMP-2 i VEGF w płynie otrzewnowym pobudzają jego produkcję, a także zwiększają inwazyjność komórek rakowych oraz indukują angiogenezę [50]. Doświadczenia przeprowadzone w trójwymiarowych hodowlach linii komórkowych raka jajnika wykazały, że MMP-2 i MT1-MMP odgrywają kluczową rolę w rozwoju struktur przypominających sieć naczyń krwionośnych, co wskazywałoby na możliwość udziału tych enzymów w procesie rozwoju unaczynienia guza w warunkach *in vivo* [51].

Możliwości wykorzystania metaloproteaz i ich inhibitorów w diagnostyce raka jajnika

Zwiększenie syntezy niektórych metaloproteaz i ich inhibitorów w przebiegu progresji raka jajnika stwarza możliwości wykorzystania oznaczania stężeń tych białek w płynach ustrojowych w celach diagnostycznych.

Määtta i wsp. [52] wykazali przydatność oznaczania TIMP-1 oraz MMP-2 w surowicy krwi w celu identyfikacji złośliwych guzów jajnika. Stężenia TIMP-1, niskie w guzach łagodnych wzrastały w przypadku guzów o granicznej złośliwości oraz raków. Przy pomocy wyznaczenia stosunków stężeń TIMP-1 do MMP-2 oraz TIMP-1 do kompleksu MMP-2/TIMP-2 możliwa była diagnostyka różnicowa pomiędzy guzami złośliwymi, a guzami o granicznej złośliwości oraz guzami złośliwymi a łagodnymi. Obserwowano również wyższe stężenia MMP-7, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2, ale nie MMP-2, w surowicy krwi kobiet chorych na raka jajnika w porównaniu do zdrowych ochotniczek oraz pacjentek z niezłośliwymi schorzeniami ginekologicznymi [30, 53]. W przeciwieństwie do cytowanych powyżej badań, Garzetti i wsp. [54] wykazali, że również stężenie MMP-2 we krwi pacjentek może zostać wykorzystane jako marker surowiczego raka jajnika. Łączne oznaczenie stężeń MMP-2 i Ca-125 zwiększyło czułość metody do 100%, przy 70% swoistości.

Nie wykazano jednakże przydatności oznaczania aktywności MMP-2 i MMP-9 w moczu w celu wykrywania raka jajnika i innych złośliwych nowotworów narządu płciowego u kobiet [55]. Sakata i wsp. [46] sugerują natomiast, że immunohistochemiczna ocena ekspresji MMP-2 i MMP-9 może być przydatna w odróżnieniu komórek rakowych od komórek mezotelialnych wyizolowanych z płynu otrzewnowego.

Podjęto również próby wykorzystania oceny zmienności polimorficznej genów metaloproteaz w celu wyselekcjonowania grupy pacjentek o podwyższonym ryzyku zachorowania na raka jajnika. Kanamori i wsp. [56] w populacji japońskiej wykazali powiązanie pomiędzy polimorfizmem w regionie promotorowym genu MMP-1 a zapadalnością na raka jajnika oraz, co istotne, zależność pomiędzy wariantami polimorficznymi genu a ekspresją enzymu w guzie. Jednakże, w badaniach obejmujących populacje kobiet zamieszkujących Koreę oraz Stany Zjednoczone nie potwierdzono związku pomiędzy polimorfizmem w regionie promotorowym genu MMP-1 a występowaniem raka jajnika [57, 59].

Badania przeprowadzone w populacji Polek sugerują brak związku pomiędzy zachorowaniem na raka jajnika a polimorfizmem 5A/6A genu MMP-3 [58]. Podobnie nie obserwowano zależności pomiędzy zapadalnością na ten nowotwór a polimorfizmem w regionach promotorowych MMP-1, MMP-3 i MMP-9 w populacji Chinek. Jednakże w przypadku MMP-7 występowanie genotypu z allelem -181G wiązało się ze średnio ponad trzy i pół krotnie częstszym zachorowaniem na raka jajnika [60].

Rola metaloproteaz macierzowych i ich inhibitorów w progresji raka jajnika...

Tabela I. Metaloproteazy (*metalloproteinases*).

MMP	Nazwa	Główne substraty
1	Kolagenaza tzw. śródmiaższowa	kolagen I, II, III, VII, VIII, X, żelatyna, agrekan, L-selektyna, IL-1B, proteoglikany, entaksyna, owostatyna, MMP-2, MMP-9
2	Żelatynaza A (72 kDa żelatynaza)	kolagen I, IV, V, VII, X, XI, XIV, żelatynaza, elastyna, fibronektyna, agrekan, osteonektyna, laminina-1, -5, MMP-1, MMP-9, MMP-13
3	Stomelizyna-1	kolagen III, IV, V, IX, żelatyna, laminina, agrekan, perlekan, dekoryna, elastyna, kazeina, osteonektyna, owostatyna, entaktyna, plazminogen, IL 1 B, MMP-2/TIMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13
7	Matrylizyna PUMP	kolagen IV, X, żelatyna, agrekan, dekoryna, fibronektyna, laminina, entaktyna, elastyna, kazeina, transferyna, plazminogen, B-4- integryna, MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-9/TIMP-1
8	Kolagenaza neutrofilowa	kolagen I, II, III, V, VII, VIII, XI, żelatyna, agrekan, fibronektyna
9	Żelatynaza B (92 kDa żelatynaza)	kolagen IV, V, VII, X, XIV, żelatyna, entaktyna, agrekan, elastyna, fibronektyna, osteonektyna plazminogen, IL-B
10	Stomelizyna-2	kolagen III, IV, V, żelatyna, elastyna, kazeina, agrekan, MMP-1, MMP-8
11	Stomelizyna-3	kolagen IV, fibronektyna, laminina, agrekan, kazeina, żelatyna
12	Metaloelastaza makrofagowa	kolagen IV, elastyna, żelatyna, fibronektyna, witronektyna, laminina
13	Kolagenaza-3	kolagen I, II, III, żelatyna, plazminogen, agrekan, perlekan, fibronektyna, fibryna, osteonektyna MMP-9
14	Metaloproteaza-1 typu błonowego MT1-MMP	kolagen I, II, III, żelatyna, kazeina, fibronektyna, laminina, witronektyna, entaktyna, proteoglikany, MMP-2, MMP-13
15	Metaloproteaza-2 typu błonowego MT2-MMP	fibronektyna, entaktyna, laminina, agrekan, perlekan, MMP-2
16	Metaloproteaza-3 typu błonowego MT3-MMP	kolagen III, żelatyna, kazeina, fibronektyna, MMP-2
17	Metaloproteaza-4 typu błonowego MT4-MMP	nieznany
18	Kolagenaza 4	kolagen I
19	RASI	kolagen I
20	Enamielizyna	amelogenina, agrekan
21	XMMP	nieznany
22	CMMP	nieznany
23	Brak nazwy	nieznany
24	Metaloproteaza-5 typu błonowego MT5- MMP	fibronektyna
25	Metaloproteaza-6 typu błonowego MT6-MMP, leukolizyna	pro-żelatynaza A
26	Matrylizyna-2, endometaza	kolagen IV, fibronektyna, żelatyna, inhibitor alfa1 – proteinazy
27		nieznany
28	Epilizyna	nieznany

Stettner R, et al.

Metaloproteazy i ich inhibitory jako czynniki rokownicze

W szeregu badań wykazano przydatność MMPs i TIMPs w prognozowaniu przeżycia u chorych leczonych z powodu raka jajnika. W zależności od zastosowanej metody analitycznej zwiększona ekspresja metaloproteaz i ich inhibitorów miała pozytywne lub negatywne znaczenie prognostyczne. W zaawansowanym raku jajnika (stopień kliniczny III i IV) ekspresja mRNA TIMP-2 i MMP-9 w zmianie pierwotnej oraz TIMP-2, MMP-2 i MT1-MMP w zmianach przerzutowych oceniona przy pomocy hybrydyzacji *in situ*, szła w parze z gorszą przeżywalnością pacjentek [61]. Wysoka ekspresja białka MMP-2, MMP-7 i MMP-9 (tej ostatniej w komórkach podścieliska) oceniana metodą immunohistochemiczną, okazała się być korzystnym markerem prognostycznym w zakresie dziesięcioletniego przeżycia oraz okresu od podjęcia leczenia do wystąpienia nawrotu. Należy przy tym nadmienić, że ekspresja tych metaloproteaz pozostawała w ścisłym związku ze zróżnicowaniem histologicznym nowotworu, będąc najniższą w guzach G-3 [31, 62, 63].

W innym badaniu wysoka ekspresja białka MMP-2 w zmianach przerzutowych, oznaczana również przy pomocy immunohistochemii, miała bardzo niekorzystne znaczenie rokownicze [64]. Udokumentowano również związek pomiędzy wysoką aktywnością MMP-9 w ekstraktach uzyskanych z wycinków raka jajnika, a gorszym rokowaniem [65, 66].

Natomiast ocena ekspresji białka MMP-2 techniką Western blot udowodniła że, zawartość pro-MMP-2 w guzie ściśle koreluje z inwazyjnością nowotworu, występowaniem przerzutów, a także gorszym rokowaniem [67].

Ciekawych obserwacji dokonali Six i wsp. [68], którzy wykazali, że obecność polimorfizmu w regionie promotorowym genu MMP-1 jest niekorzystnym markerem rokowniczym, niezależnie od stopnia klinicznego i zróżnicowania histopatologicznego nowotworu, zajęcia węzłów chłonnych oraz wieku pacjentek w chwili diagnozy.

Mniej uwagi poświęcono znaczeniu prognostycznemu tkankowych inhibitorów metaloproteaz, choć jak wynika z badań opublikowanych przez Rauvala i wsp. [69] wysokie przedoperacyjne stężenie TIMP-1 w surowicy krwi pacjentek z rakiem jajnika świadczy o zaawansowanym stadium i agresywnym fenotypie nowotworu, pozwala przewidzieć złą odpowiedź na chemioterapię, a co za tym idzie, związane jest ze znacznie gorszym rokowaniem.

Zastosowanie syntetycznych inhibitorów metaloproteaz w leczeniu raka jajnika

Wykrycie roli metaloproteaz w progresji nowotworów złośliwych spowodowało zainteresowanie możliwością wykorzystania ich syntetycznych inhibitorów jako elementów chemioterapii. Podjęto również badania dotyczące zastosowania tych związków w leczeniu raka jajnika. Obserwowano, że w warunkach *in vitro* inhibitor metaloproteaz BB3103 blokuje indukowaną przez TGF-beta inwazyjność komórek SKOV3 [70]. U myszy, którym do jamy otrzewnowej przeszczepiono raka jajnika inny z inhibitorów- batimastat (BB-94), hamuje rozprzestrzenianie się nowotworu i znacząco wspomaga działanie cisplatin [71].

Przeprowadzone badania I fazy z zastosowaniem różnych inhibitorów metaloproteaz wykazały dobrą ich tolerancję, w przypadku batimastatu również w terapii dootrzewnowej [72, 73, 74], jednakże nie udokumentowano aby zastosowanie tych leków poprawiało wyniki leczenia chorych na raka jajnika [75].

Piśmiennictwo

1. Krajowy Rejestr Chorób Nowotworowych, 2000.
2. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2, 163-174.
3. Wojtowicz-Praga S, Dickson R, Hawkins M. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs*. 1997, 15, 61-75.
4. Borkakoti N. Structural studies of matrix metalloproteinases. *J Mol Med*. 2000, 78, 261-268.
5. Leppert D, Lindberg RLP, Kappos L, [et al.]. Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Res Rev*. 2001, 36, 249-257.
6. Hartung H, Kieser B. The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. *J Neuroimmunol*. 2000, 107, 140-147.
7. Butler G, Butler M, Atkinson S, [et al.]. The TIMP 2 membrane type 1 metalloproteinase „receptor” regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem*. 1998, 273, 871-880.
8. Kinoshita T, Sato H, Okada A, [et al.]. TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *J Biol Chem*. 1998, 273, 16098-16103.
9. Westermarck J, Kahari V. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*. 1999, 13, 781-792.
10. Coussens L, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol*. 1996, 3, 895-904.
11. Woessner J Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*. 1991, 5, 2145-2154.
12. Nagase H, Woessner J Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999, 274, 21491-21494.
13. Ludwig T. Local proteolytic activity in tumor cell invasion and metastasis. *Bioessays*. 2005, 27, 1181-1191.
14. Butler G, Will H, Atkinson S, [et al.]. Membrane -type -2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Eur J Biochem*. 1997, 244, 653-657.
15. Zhao W, Li H, Yamashita K. [et al.]. Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases -1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J Cell Sci*. 1998, 111, 1147-1153.
16. Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, [et al.]. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci*. 1994, 107, 2373-2379.
17. Boujrad N, Ogwuegbu S, Garnier M, [et al.]. Identification of a stimulator for of steroid hormone synthesis isolated from testis. *Science*. 1995, 268, 1609-1612.
18. Murphy A, Unsworth E, Stetler-Stevenson W. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF- induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol*. 1993, 157, 351-358.
19. Li G, Fridman R, Kim H. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res*. 1999, 59, 6267-6275.
20. Valente P, Fassina G, Melchiori A, [et al.]. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer*. 1998, 75, 246-253.
21. Westermarck J, Kahari V. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*. 1999, 13, 781-792.
22. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer*. 2000, 36, 1621-1630.
23. Coussens L, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol*. 1996, 3, 895-904.
24. Koblinski J, Ahram M, Sloane B. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta*. 2000, 291, 113-135.
25. Yurchenco P, Schittny J. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J*. 1990, 4, 1577-1590.
26. Liotta L, Tryggvason, Garbisa S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*. 1980, 284, 67-68.

Rola metaloproteaz macierzowych i ich inhibitorów w progresji raka jajnika...

27. Barsky S, Siegal G, Jannotta F: Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest.* 1983, 49, 140-147.
28. Schnaper H, Grant D, Stetler-Stevenson W. Type IV collagenase(s) and TIMPs modulate endothelial cells morphogenesis in vitro. *J Cell Physiol.* 1993, 156, 235-246.
29. Fang J, Shing Y, Wiederschain D, [et al.]. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97, 3884-3889.
30. Ascar A, Onan A, Coskun U, [et al.]. Clinical significance of serum MMP-2 and MMP-7 in patients with ovarian cancer. *Med Oncol.* 2008, 25, 279-283.
31. Sillanpää S, Anttila M, Suhonen K, [et al.]. Prognostic significance of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase 2 in epithelial ovarian cancer. *Tumor Biol.* 2007, 28, 280-289.
32. Maatta M, Santala M, Soini Y, [et al.]. Matrix metalloproteinases 2 and 9 and their tissue inhibitors in low malignant potential ovarian tumors. *Tumour Biol.* 2004, 25, 188-192.
33. Sakata K, Shigemasa K, Nagai N. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. *Int J Oncol.* 2000, 17, 673-681.
34. Huang L, Garrett A, Bell D, [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, 369-376.
35. Schmalfeldt B, Prechtel D, Härtling K, [et al.]. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2001, 7, 2396-2404.
36. Ripley D, Tunuguntla R, Susi L, [et al.]. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinase-3 and -4 in normal ovary and ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2006, 16, 1794-1800.
37. Mueller J, Brebeck B, Schmalfeldt B, [et al.]. Stromelysin-3 expression in invasive ovarian carcinomas and tumours of low malignant potential. *Virchows Arch.* 2000, 437, 618-624.
38. Shigemasa K, Tanimoto H, Sakata K, [et al.]. Induction of matrix metalloproteinase-7 is common in mucinous ovarian tumors including early stage disease. *Med Oncol.* 2000, 17, 52-58.
39. Wang F, So J, Reierstad S. Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int J Cancer.* 2005, 114, 19-31.
40. Kim T, Rho S, Choi Y, [et al.]. High expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in serous ovarian carcinomas and the role of this expression in ovarian tumorigenesis. *Hum Pathol.* 2006, 37, 906-913.
41. Cai K, Yang W, Capo-Chichi C, [et al.]. Prominent expression of metalloproteinases in early stages of ovarian tumorigenesis. *Mol Carcinog.* 2007, 46, 130-143.
42. Davidson B, Reich R, Berner A. Ovarian carcinoma cells in serous effusions show altered MMP-2 and TIMP-2 mRNA levels. *Eur J Cancer.* 2001, 37, 2040-2049.
43. Behrens P, Rothe M, Florin A, [et al.]. Invasive properties of serum human epithelial ovarian tumors are related to Ets-1, MMP-1 and MMP-2 expression. *Int J Mol Med.* 2001, 8, 149-154.
44. Boyd R, Balkwill F. MMP-2 release and activation in ovarian carcinoma: the role of fibroblasts. *Br J Cancer.* 1999, 80, 315-321.
45. Kenny H, Kaur S, Coussens L, [et al.]. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J Clin Invest.* 2008, 118, 1367-1379.
46. Sakata K, Shigemasa K, Uebaba Y, [et al.]. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 by cells isolated from the peritoneal fluid of women with ovarian carcinoma. *Acta Cytol.* 2002, 46, 697-703.
47. Belotti D, Paganoni P, Manenti L, [et al.]. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Res.* 2003, 63, 5224-5229.
48. Schmalfeldt B, Prechtel D, Härtling K, [et al.]. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2001, 7, 2396-2404.
49. Davidson B, Goldberg I, Berner A, [et al.]. Expression of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases messenger RNA in ovarian carcinoma cells in serous effusions. *Am J Clin Pathol.* 2001, 115, 517-524.
50. Yabushita H, Shimazu M, Noguchi M. Vascular endothelial growth factor activating matrix metalloproteinase in ascetic fluid during peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2003, 10, 89-95.
51. Sood A, Fletcher M, Coffin J, [et al.]. Functional role of matrix metalloproteinases in ovarian tumor cell plasticity. *Am J Obstet Gynecol.* 2004, 190, 899-909.
52. Maatta M, Talvensaar-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T, [et al.]. Matrix metalloproteinase -2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) and their tissue inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in differential diagnosis between low malignant potential (LMP) and malignant ovarian tumours. *Anticancer Res.* 2007, 27, 2753-2758.
53. Manenti L, Paganoni P, Floriani I, [et al.]. Expression levels of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in the plasma of patients with ovarian carcinoma. *Eur J Cancer.* 2003, 39, 1948-1956.
54. Garzetti G, Ciavattini A, Lucarini G, [et al.]. Increased serum 72 KDa metalloproteinase in serous ovarian tumors: comparison with CA 125. *Anticancer Res.* 1996, 16, 2123-2127.
55. Bazzett L, Magnus M, Taylor D, [et al.]. Urinary matrix metalloproteinases as a potential screening test for gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol.* 2003, 90, 435-442.
56. Kanamori Y, Matsushima M, Minaguchi T, [et al.]. Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region. *Cancer Res.* 1999, 59, 4225-4227.
57. Ju W, Kim JW, Park N, [et al.]. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism and epithelial ovarian cancer: does ethnicity matter? *J Obstet Gynaecol Res.* 2007, 33, 155-160.
58. Szylo K, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, [et al.]. The promoter polymorphism of the matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) gene in women with ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2002, 21, 357-361.
59. Wenham R, Calingaert B, Ali S, [et al.]. Matrix metalloproteinase-1 gene promoter polymorphism and risk of ovarian cancer. *J Soc Gynecol Investig.* 2003, 10, 381-387.
60. Li Y, Jin X, Kang S, Wang Y, [et al.]. Polymorphisms in the promoter regions of the matrix metalloproteinases-1, -3, -7, and -9 and the risk of epithelial ovarian cancer in China. *Gynecol Oncol.* 2006, 101, 92-96.
61. Davidson B, Goldberg I, Gotlieb W, [et al.]. The prognostic value of metalloproteinases and angiogenic factors in ovarian carcinoma. *Mol Cell Endocrinol.* 2002, 187, 39-45.
62. Sillanpää S, Anttila M, Voutilainen K, [et al.]. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-7 in epithelial ovarian cancer and its relation to beta-catenin expression. *Int J Cancer.* 2006, 119, 1792-1799.
63. Sillanpää S, Anttila M, Voutilainen K, [et al.]. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2007, 104, 296-303.
64. Perigny M, Bairati I, Harvey I, [et al.]. Role of immunohistochemical overexpression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-11 in the prognosis of death by ovarian cancer. *Am J Clin Pathol.* 2008, 129, 226-231.
65. Demeter A, Sziller I, Csapo Z, [et al.]. Molecular prognostic markers in recurrent and non-recurrent epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2005, 25, 2885-2889.
66. 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, 291-298.
67. Wu X, Li H, Kang L, [et al.]. Activated matrix metalloproteinase-2 -a potential marker of prognosis for epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2002, 84, 126-134.
68. Six L, Grimm C, Leodolter S, [et al.]. A polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 gene promoter is associated with the prognosis of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2006, 100, 506-510.
69. Rauvala M, Puistola U, Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases and their tissue inhibitors in ovarian tumors; TIMP-1 is a predictive as well as a prognostic factor. *Gynecol Oncol.* 2005, 99, 656-663.
70. Lin S, Lee M, Ke F, [et al.]. TGF beta1 stimulates the secretion of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and the invasive behavior in human ovarian cancer cells, which is suppressed by MMP inhibitor BB3103. *Clin Exp Metastasis.* 2000, 18, 493-499.
71. Giavazzi R, Garofalo A, Ferri C, [et al.]. Batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, potentiates the antitumor activity of cisplatin in ovarian carcinoma xenografts. *Clin Cancer Res.* 1998, 4, 985-992.
72. Heath E, O'Reilly S, Humphrey R, [et al.]. Phase I trial of the matrix metalloproteinase inhibitor BAY12-9566 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001, 48, 269-274.
73. Erlichman C, Adjei A, Alberts S, [et al.]. Phase I study of the matrix metalloproteinase inhibitor, BAY 12-9566. *Ann Oncol.* 2001, 12, 389-395.
74. Macaulay V, O'Byrne K, Saunders M. Phase I study of intrapleural batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in the treatment of malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res.* 1999, 5, 513-520.
75. Costa S, von Minckwitz G, Wernicke K, [et al.]. New aspects by the therapy of ovarian cancer- What changes after the ASCO-Meeting 2001. *Zentralbl Gynakol.* 2002, 124, 96-103.