

Ocena ekspresji i wartości prognostycznej metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej –1, –2 i –9 w raku krtani

Wioletta Pietruszewska¹, Józef Kobos², Tomasz Durko¹,
Anna Murlewska¹, Katarzyna Bojanowska-Poźniak¹

Wstęp. W procesie wzrostu i inwazji oraz powstawania przerzutów nowotworów złośliwych niezbędne jest trawienie składników macierzy pozakomórkowej (extracellular matrix – ECM). W jej degradacji kluczową rolę odgrywają metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej. Udowodniono, że ekspresja metaloproteinaz jest podwyższona w wielu nowotworach złośliwych a liczne badania sugerują wartość prognostyczną tych białek w monitorowaniu przebiegu raka prostaty, żołądka i sutka.

Cel pracy. Celem pracy było badanie ekspresji MMP1, MMP2 i MMP9 w raku krtani, ocena zależności tej ekspresji z cechami klinicznymi i patologicznymi nowotworu oraz określenie jej wartości prognostycznej u pacjentów z rakiem krtani.

Materiał i metoda. Badaniem objęto 104 chorych na raka krtani, leczonych chirurgicznie, u których okres obserwacji pooperacyjnej wynosił przynajmniej 5 lat. Wykonano barwienie immunohistochemiczne skrawków parafinowych preparatów raka krtani z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenom MMP1, MMP2 i MMP9 oraz awidynowo-biotynowo-peroksydazowego systemu detekcji ABC. Ekspresję badanych białek oceniano ilościowo, w każdym preparacie w 10 polach widzenia przy powiększeniu 200x.

Wyniki. Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej wykazywały rozlaną cytoplazmatyczną ekspresję w komórkach nowotworowych oraz pojedynczych komórkach podścieliska. Wszystkie oceniane metaloproteinazy wykazywały korelację ze stopniem histologicznego zróżnicowania raka krtani (MMP1: $p=0,012$; MMP2: $p=0,006$; MMP9: $p=0,001$). Obserwowano zależność między ekspresją MMP2 a przerzutami do węzłów chłonnych ($p=0,013$). Nowotwory wywodzące się z głośni częściej wykazywały ujemną ekspresję MMP2 w porównaniu z wychodzącymi z pozostałych okolic krtani. Zależności te były na granicy istotności statystycznej ($p=0,08$). Całkowity czas przeżycia chorych był krótszy w przypadkach z dodatnią ekspresją MMP2 ($p=0,042$). Zależność między MMP9 a krótszym całkowitym czasem przeżycia była na granicy istotności statystycznej ($p=0,07$). Nie obserwowano korelacji między całkowitym i wolnym od wznowy czasem przeżycia a ekspresją MMP1.

Wnioski. 1. Wykazano, że istnieje zależność między ekspresją metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej-2 a cechami klinicznymi i patologicznymi raka krtani. Ponadto stwierdzono, że ekspresja tego białka ma wartość rokowniczą u chorych z rakiem krtani, a analiza wieloczynnikowa wykazała, że jest to wskaźnik prognostyczny, niezależny od innych cech klinicznych i patologicznych nowotworu. 2. Mimo stwierdzenia istnienia zależności między ekspresją metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej-1 i -9 a cechami klinicznymi i patologicznymi raka krtani, nie wykazano znaczenia rokowniczego tych białek u chorych na raka krtani.

Expression and prognostic value of matrix metalloproteinases –1, –2 and –9 in laryngeal cancer

Introduction. Degradation of extracellular matrix (ECM) is important in tumor growth, invasion and metastasizing. Matrix metalloproteinases (MMPs) are key enzymes in the process of digesting ECM components. Increased expression of MMPs has been observed in various cancers and many researches suggested their prognostic value in prostate, stomach and breast cancers. The aim of the research was to examine MMP-1, MMP-2 and MMP-9 expression in laryngeal cancer,

¹ Klinika Otolaryngologii i Laryngologii Onkologicznej
I Katedra Otolaryngologii

² Zakład Patomorfologii Wieku Rozwojowego
Katedra Biomedycznych Podstaw Pielęgniarstwa
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

to evaluate association of this expression and clinicopathological features of laryngeal cancer and to assess their prognostic value in patients with laryngeal cancer.

Material and method. 104 patients with laryngeal cancer, who underwent surgical treatment were included in the study. Only cases with at least a 5-year follow-up were included. Immunohistochemical studies were performed on formaldehyde-fixed, paraffin embedded sections by using monoclonal antibodies against TIMP-2 antigen and ABC detection system.

Results. MMPs expression was cytoplasmatic, mainly in cancer cells, but also in some stromal cells. All examined MMPs correlated with grading (MMP-1: $p=0.012$; MMP-2: $p=0.006$; MMP-9: $p=0.001$). An association between MMP-2 and nodal metastases has been observed ($p=0.013$). Neoplasms originating from the glottis were more often found to be negative for MMP-2 than others and this correlation was statistically borderline ($p=0.08$). We found that tumors expressing MMP-2 were significantly associated with a poor prognosis. Patients with MMP-2 positive expression had shorter overall survival ($p=0,049$). Overall survival was also shorter in cases with positive MMP-9 expression. This correlation was statistically borderline ($p=0.07$).

Conclusions. Presented data suggest that there is a correlation between MMP-2 expression and clinicopathological features of laryngeal cancer. Moreover, the survival analysis revealed that this protein is a significant prognostic parameter in patients with laryngeal cancer. In spite of the existence of a correlation between MMP-1 and MMP-9 expression and the clinicopathological features of laryngeal carcinoma the survival analysis has revealed no prognostic impact of these factors in patients with laryngeal cancer.

Słowa kluczowe: MMP1, MMP2, MMP9, rak krtani, czynniki prognostyczne

Key words: MMP1, MMP2, MMP9, laryngeal cancer, prognostic factors

Wstęp

Rak krtani jest najczęstszym nowotworem złośliwym regionu głowy i szyi. Mimo coraz doskonalszych metod diagnostycznych i terapeutycznych jest on nadal w większości przypadków rozpoznawany dopiero w zaawansowanym stadium, a przeżycia 5-letnie chorych z tym nowotworem nie przekraczają 50%, w związku z częstym występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych oraz wznowy miejscowej lub węzłowej [1]. Udowodniono, że wzrost i inwazja nowotworów złośliwych oraz powstawanie przerzutów są procesami wieloetapowymi, w których niezbędne jest trawienie składników macierzy pozakomórkowej (*extracellular matrix* – ECM). W degradacji ECM kluczową rolę odgrywa grupa zależnych od cynku i wapnia endopeptydaz, nazywanych metaloproteinazami macierzy pozakomórkowej (*matrix metalloproteinases* – MMPs). Można je podzielić na pięć głównych grup, wśród których wymienić należy: kolagenazy, stromelizyny, żelatynazy, metaloproteinazy błonowe oraz metaloproteinazy niesklasyfikowane [2]. Aktywność metaloproteinaz jest regulowana przez wiele czynników na poziomie transkrypcji i translacji, a szczególną rolę w tym procesie odgrywiają specyficzne tkankowe inhibitory metaloproteinaz [3].

MMP1 jest jednym z enzymów z grupy kolagenaz. Jej podstawową cechą jest zdolność do rozkładania strukturalnych kolagenów typu I, II i III, które są podstawowym składnikiem budulcowym macierzy pozakomórkowej. Z tego względu wydaje się, że kolagenazy nie biorą udziału w początkowych stadiach nowotworzenia. Dopiero po przekroczeniu bariery błony podstawnej inwazja do otaczających tkanek wymaga udziału tych enzymów. Z tego powodu wysnuto przypuszczenie, że kolagenazy można traktować jako markery progresji nowotworów [4, 5].

MMP2 i MMP9 należą do grupy żelatynaz. Są one odpowiedzialne przede wszystkim za rozkład niefibrylarnych kolagenów, głównie typu IV, ale również kolagenów

fibrylarnych, żelatyny, fibronektyny, elastyny, agrekanu, anaktyny [6]. Ze względu na zdolność do trawienia kolagenu typu IV, która prowadzi do przerwania ciągłości błony podstawnej, podnosi się ich istotną rolę we wroście i inwazji nowotworów oraz powstawaniu przerzutów.

Udowodniono, że ekspresja metaloproteinaz jest podwyższona w wielu nowotworach złośliwych, a liczne badania sugerują ich wartość prognostyczną. Dotyczy to między innymi raka prostaty, żołądka, sutka oraz nowotworów głowy i szyi [7-12]. Z tego względu podjęto próbę oceny ekspresji metaloproteinaz w raku krtani.

Cel pracy

Celem pracy było badanie ekspresji MMP1, MMP2 i MMP9 w raku krtani, ocena zależności tej ekspresji od cech klinicznych i patologicznych nowotworu oraz określenie jej wartości prognostycznej u pacjentów z rakiem krtani.

Materiał i metoda

Badaniem objęto 104 chorych na raka krtani, leczonych chirurgicznie w Klinice Otolaryngologii UM w Łodzi w latach 1996-2000, u których okres obserwacji pooperacyjnej wynosił przynajmniej pięć lat. Charakterystykę badanej grupy chorych przedstawiono w Tabeli I.

Materiał do badań stanowiły preparaty raka krtani, utrwalone w 10% formalinie i zatopione w bloczki parafinowe. Badania immunohistochemiczne przeprowadzono według metody immunoperoksydazowej, z zastosowaniem monoklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom MMP1, MMP2 i MMP9 (NCL-MMP1, -MMP2, -MMP9, Novocastra). Obecność badanych białek oceniano ilościowo w komórkach nowotworowych, obliczając indeks. Za ekspresję dodatnią uznano obecność pozytywnego odczynu cytoplazmatycznego w $>10\%$ komórek, a za ekspresję ujemną w $\leq 10\%$ komórek nowotworowych. Wyniki oceny immunohistochemicznej zestawiono z cechami klinicznymi i stopniem histologicznego zróżnicowania raka krtani. Analizy statystycznej uzyskanych wyników dokonano przy użyciu pakietu statystycznego STATISTICA 8.0. Za zna-

Tab. I. Charakterystyka badanej grupy chorych na raka krtani (n=104)

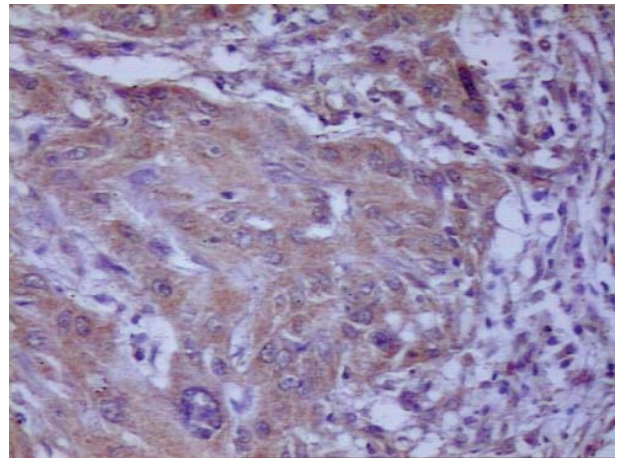
	Cecha	Liczba chorych	%
Płeć	Kobiety	10	9,6%
	Mężczyźni	94	90,4%
Wiek	Do 65 lat	77	74,0%
	Powyżej 65 lat	27	26,0%
Umiejscowienie	Piętro górne	12	11,5%
	Piętro środkowe	32	30,8%
	Piętro dolne	2	1,9%
	Piętro górne i środkowe	38	36,5%
	Piętro środkowe i dolne	6	5,8%
	Trzy piętra	14	13,5%
Wielkość guza w krtani	T1	19	18,3%
	T2	14	13,5%
	T3	28	26,9%
	T4	43	41,3%
Przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych	N0	73	70,2%
	N1	10	9,6%
	N2	17	16,3%
	N3	4	3,9%
Wznowa miejscowa	Obecna	7	6,7%
	Brak	97	93,3%
Wznowa węzłowa	Obecna	13	12,5%
	Brak	91	87,5%
Stopień zróżnicowania histologicznego	G1	16	15,4%
	G2	72	69,2%
	G3	16	15,4%

mienne statystycznie uznano wartości $p < 0,05$. Dla cech mierzalnych obliczono średnią arytmetyczną i medianę oraz oceniono ich wewnętrzne zróżnicowanie, podając odchylenie standardowe i zakres ich wartości. Zależność między badanymi cechami określono z zastosowaniem nieparametrycznego testu chi-kwadrat o niezależności zmiennych lub nieparametrycznego testu chi-kwadrat o niezależności zmiennych z poprawką Yates'a.

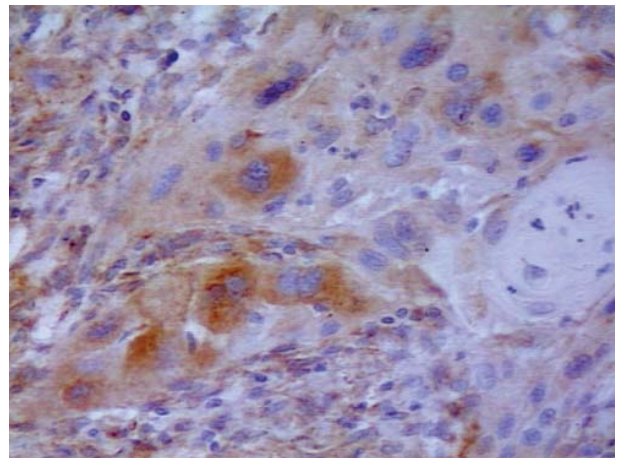
Prawdopodobieństwo całkowitego i wolnego od wznowy czasu przeżycia oceniono przy użyciu metody Kaplana-Meiera estymacji funkcji przeżywalności, stosując także kryterium podziału na grupy, jak w ocenie cech klinicznych i patomorfologicznych. W celu analizy różnic prawdopodobieństwa czasu przeżycia w tych grupach zastosowano test chi-kwadrat. Całkowity czas przeżycia oceniano od momentu rozpoznania raka krtani do zgonu lub ostatniej obserwacji. Czas przeżycia wolny od wznowy obliczano natomiast od momentu rozpoznania nowotworu do histopatologicznego potwierdzenia wystąpienia wznowy węzłowej lub miejscowej. W celu wyodrębnienia czynników mających niezależny od pozostałych cech klinicznych i patologicznych raka krtani wpływ na czas przeżycia pacjentów zastosowano analizę według modelu proporcjonalnego hazardu Cox'a.

Wyniki

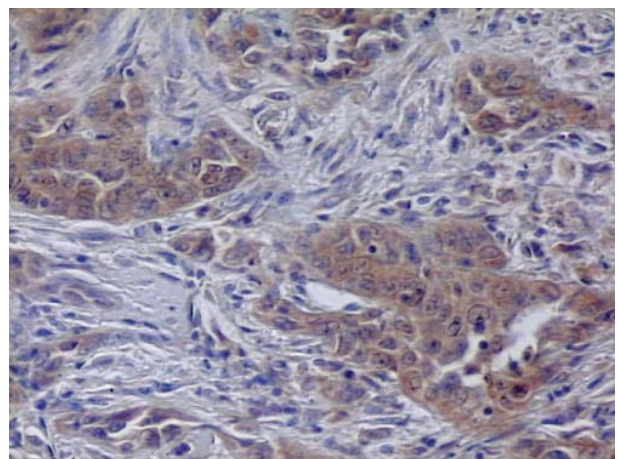
Spośród badanych 104 preparatów raka krtani do immunohistochemicznej oceny ekspresji MMP1 zakwalifikowano 93 przypadki. Pozostałe preparaty były niemożliwe do



(1)



(2)



(3)

Ryc. 1. Obraz mikroskopowy raka krtani z ekspresją MMP1 (1) i MMP9 (3) w licznych komórkach nowotworowych oraz ekspresją białka MMP2 (2) w nielicznych komórkach pod postacią rozlanego odczynu cytoplazmatycznego (odczyn immunoperoksydazowy, powiększenie 200x)

oceny ze względów technicznych, mimo wielokrotnie powtarzanych odczynów. Oceny ekspresji MMP2 i MMP9 dokonano na 104 preparatach. W każdym przypadku obserwowano cytoplazmatyczny odczyn (Ryc. 1).

Rozkład ekspresji badanych białek w zależności od cech klinicznych i histologicznych przedstawiono w Tabeli II.

Tab. II. Rozkład ekspresji MMP1, MMP2 i MMP9 w zależności od wybranych cech klinicznych i histologicznych nowotworu u chorych na raka krtani

Cecha	N	ekspresja MMP1			p	N	ekspresja MMP2			p	ekspresja MMP9		
		ujemna	dodatnia				ujemna	dodatnia			ujemna	dodatnia	
T1+T2	28	12 (42,9%)	16 (57,1%)	0,596	33	31 (93,9%)	2 (6,1%)	0,249	23 (69,7%)	10 (30,3%)	0,359		
T3+T4	65	21 (32,3%)	44 (67,7%)		71	56 (78,9%)	15 (21,1%)		42 (59,2%)	29 (40,8%)			
N0	64	21 (32,8%)	43 (67,2%)	0,161	73	62 (84,9%)	11 (15,1%)	0,013	47 (64,4%)	26 (35,6%)	0,734		
N1-N3	29	12 (41,4%)	17 (58,6%)		31	25 (80,6%)	6 (19,4%)		18 (58,1%)	13 (41,9%)			
TNM I+ TNM II	28	12 (42,1%)	16 (57,1%)	0,782	33	31 (93,9%)	2 (6,1%)	0,282	23 (69,7%)	10 (30,3%)	0,283		
TNM III+ TNM IV	65	21 (32,3%)	44 (67,7%)		71	56 (78,9%)	15 (21,1%)		42 (59,2%)	29 (40,8%)			
wznowa miejscowa (-)	87	31 (35,6%)	56 (64,4%)	0,909	97	81 (83,5%)	16 (16,5%)	0,879	59 (60,8%)	38 (39,2%)	0,189		
wznowa miejscowa (+)	6	2 (33,3%)	4 (66,7%)		7	6 (85,7%)	1 (14,3%)		6 (85,7%)	1 (14,3%)			
wznowa węzłowa (-)	81	26 (32,1%)	55 (67,9%)	0,076	91	77 (84,6%)	14 (15,4%)	0,483	58 (63,7%)	33 (36,3%)	0,491		
wznowa węzłowa (+)	12	7 (58,3%)	5 (41,7%)		13	10 (76,9%)	3 (23,1%)		7 (53,8%)	6 (37,5%)			
G1	16	10 (62,5%)	6 (37,5%)	0,012	16	14 (87,5%)	2 (12,5%)	0,006	15 (93,8%)	1 (6,3%)	0,001		
G2	61	21 (34,4%)	40 (65,6%)		72	64 (88,9%)	8 (11,1%)		46 (63,9%)	26 (36,1%)			
G3	16	2 (12,5%)	14 (87,5%)		16	9 (56,3%)	7 (43,7%)		4 (25,0%)	12 (75,0%)			
razem	93	33 (35,5%)	60 (64,5%)		104	87 (83,7%)	17 (16,3%)		65 (52,5%)	39 (37,5%)			

W zakwalifikowanych do oceny preparatach dodatnią ekspresję MMP1 stwierdzono u 60 pacjentów (64,5%) a ekspresję ujemną u 33 (35,5%). Dodatnią ekspresję MMP2 obserwowano w 17 przypadkach (16,3%) a ujemną w 87 (83,7%). Z kolei dodatnią ekspresję MMP9 stwierdzono w 39 przypadkach (37,5%), natomiast ujemną w 65 przypadkach (62,5%).

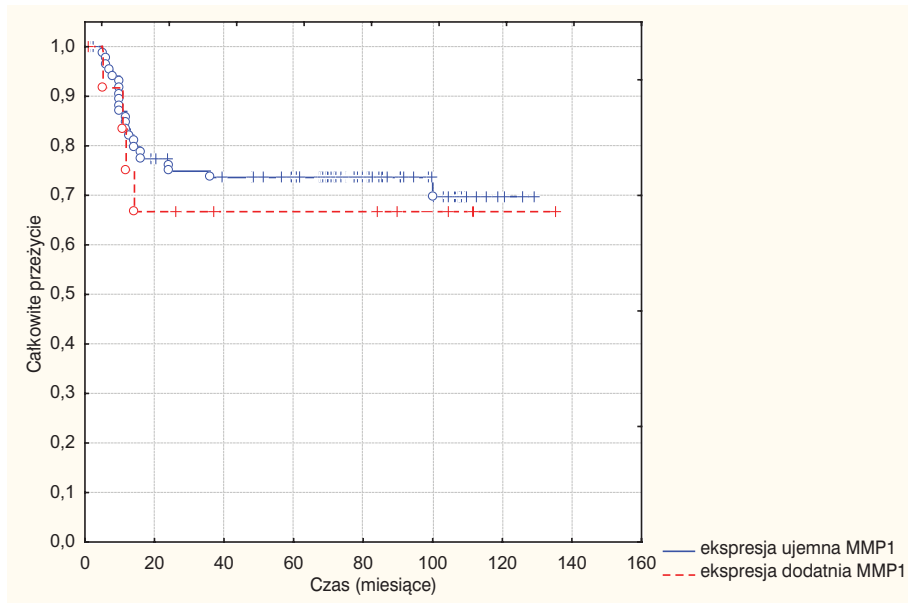
Stwierdzono istotną korelację między stopniem zróżnicowania histologicznego raka krtani a ekspresją badanych białek (MMP1: $p=0,012$, MMP2: $p=0,006$, MMP9: $p=0,001$). Dodatnią ekspresję metaloproteinaz najczęściej wykazywano w nowotworach nisko zróżnicowanych (G3).

Obserwowano istotną zależność między ekspresją MMP2 a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych ($p=0,013$). Spośród przypadków zakwalifikowanych jako N3 aż 75,0% wykazywało dodatnią ekspresję badanego białka. Nie znaleziono natomiast korelacji między ekspresją MMP1 i MMP9, a przerzutami w węzłach chłonnych. Należy jednak zauważyć, że odsetek komórek nowotworowych z dodatnią ekspresją MMP9 był coraz

wyższy w kolejnych grupach z przerzutami do węzłów chłonnych (cecha N1-N3).

Dodatnia ekspresja MMP1 i MMP2 była częściej stwierdzana w przypadku guzów wywodzących się z okolicy nadgłośnia i okolicy podgłośnia niż wywodzących się z głośnia, jednak nie były to zależności znamienne statystycznie ($p>0,05$). Guzy większe i bardziej zaawansowane (T3/T4, III/IV TNM) częściej wykazywały dodatnią ekspresję MMP1 i MMP2, w porównaniu z guzami mniejszymi i o niższym stopniu zaawansowania. Jednakże zależności te nie osiągały istotności statystycznej ($p>0,05$). W badanej grupie chorych nie obserwowano zależności między ekspresją MMP9, a punktem wyjścia raka i jego lokalizacją w krtani, jak również wielkością guza i stopniem zaawansowania procesu nowotworowego (TNM).

Nie stwierdzono zależności między ekspresją MMP1, MMP2 i MMP9 a płcią i wiekiem pacjentów ($p>0,05$). Nie obserwowano również korelacji między dodatnią ekspresją badanych białek, a wystąpieniem w przebiegu



Ryc. 2. Czas całkowitego przeżycia w zależności od ekspresji MMP1 u chorych na raka krtani ($p=0,9$)

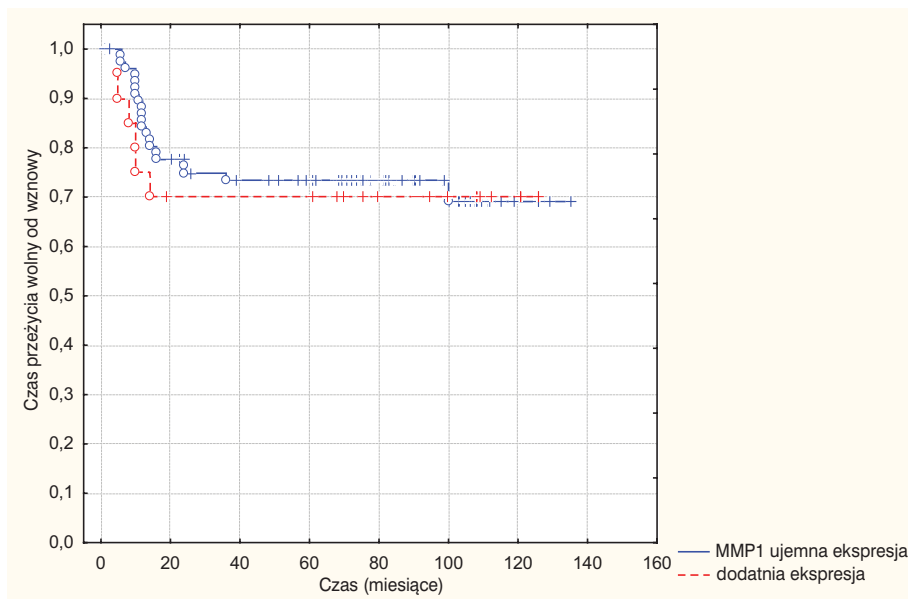
pooperacyjnym wznowy miejscowej i wznowy węzłowej ($p>0,05$).

Nie obserwowano korelacji między ekspresją MMP1 i całkowitym czasem przeżycia (Ryc. 2) oraz czasem przeżycia wolnym od wznowy i ekspresją badanych białek (Ryc. 3, 5 i 7). Analiza przeżycia pacjentów w zależności od ekspresji badanych enzymów wykazała, że całkowity czas przeżycia chorych był jednak wyraźnie krótszy w przypadkach z dodatnią ekspresją MMP2 ($p=0,042$) (Ryc. 4). Ponadto stwierdzono, że całkowity czas przeżycia był krótszy u pacjentów z dodatnią ekspresją MMP9, jednak zależność ta była na granicy istotności statystycznej ($p=0,07$) (Ryc. 6).

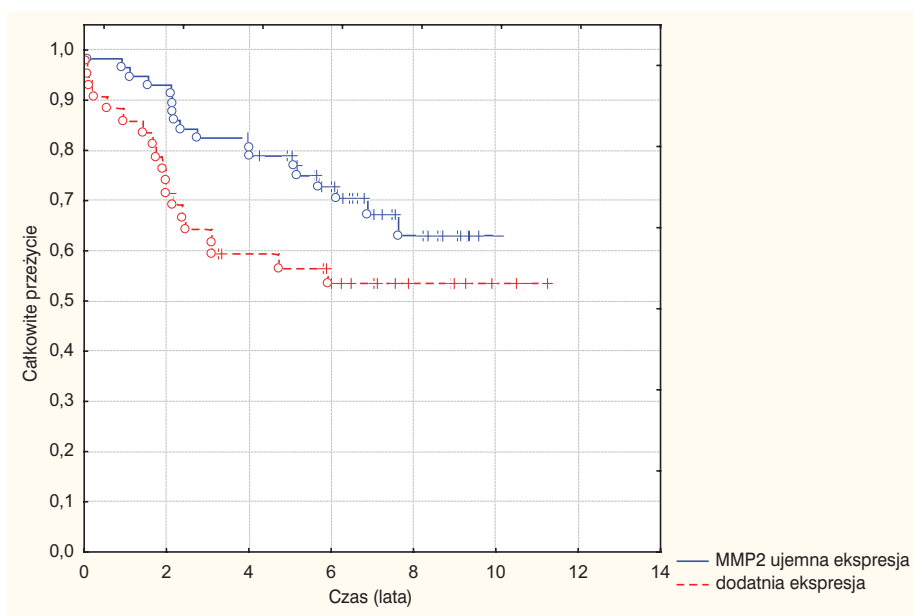
W analizie jednoczynnikowej stwierdzono, że całkowity czas przeżycia był istotnie krótszy u pacjentów: z dużym guzem pierwotnym (T3/T4) ($p<0,001$),

z nowotworem zlokalizowanym w okolicy podgłośniowej ($p=0,05$), z III/IV stopniem klinicznego zaawansowania nowotworu ($p<0,01$), z przerzutami do węzłów chłonnych szyi ($p<0,001$), ze wznową węzłową ($p<0,001$) oraz u chorych z dodatnią ekspresją MMP2 ($p=0,04$).

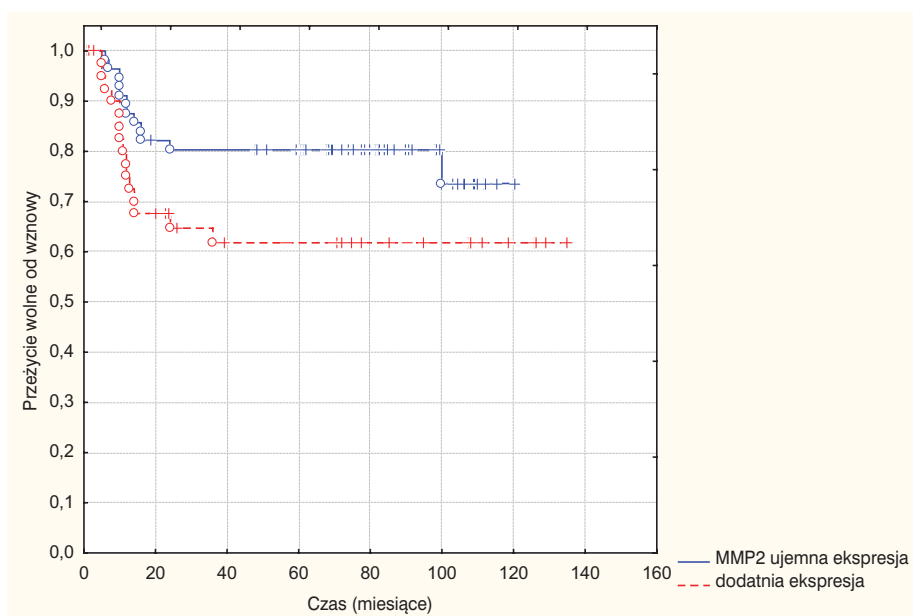
Analizy wieloczynnikowej dokonano w oparciu o parametry, które istotnie wpływały na czas przeżycia pacjentów w ocenie jednoczynnikowej. Stwierdzono, że niezależnymi czynnikami ryzyka zgonu z powodu raka krtani są: lokalizacja w okolicy podgłośniowej, obecność dużego guza pierwotnego oraz wysokie kliniczne zaawansowanie nowotworu, obecność przerzutów do węzłów chłonnych, wznowa węzłowa, dodatnia ekspresja MMP2 i dodatnia ekspresja TIMP-2. Analiza powyższych zmiennych wykazała, że lokalizacja nowotworu w okolicy podgłośniowej zwiększała ryzyko zgonu aż 12-krotnie.



Ryc. 3. Wolny od wznowy czas przeżycia w zależności od ekspresji MMP1 u chorych na raka krtani ($p=0,355$)



Ryc. 4. Całkowity czas przeżycia w zależności od ekspresji MMP2 u chorych na raka krtani ($p=0,042$)



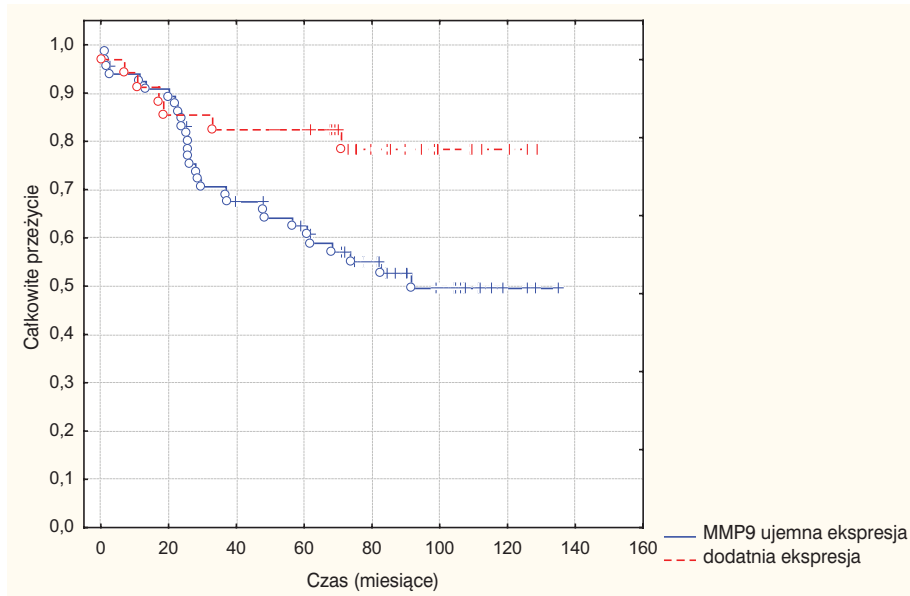
Ryc. 5. Wolny od wznowy czas przeżycia w zależności od ekspresji MMP2 u chorych na raka krtani ($p=0,39$)

Obecność dużego guza pierwotnego (T4) oraz IV stopień TNM powodowały wzrost ryzyka zgonu około 5-krotnie. Podobnie obecność przerzutów do węzłów chłonnych wiązała się ze wzrastającym ryzykiem zgonu od niespełna 3-krotnego przy przerzucie do pojedynczego węzła (N1)

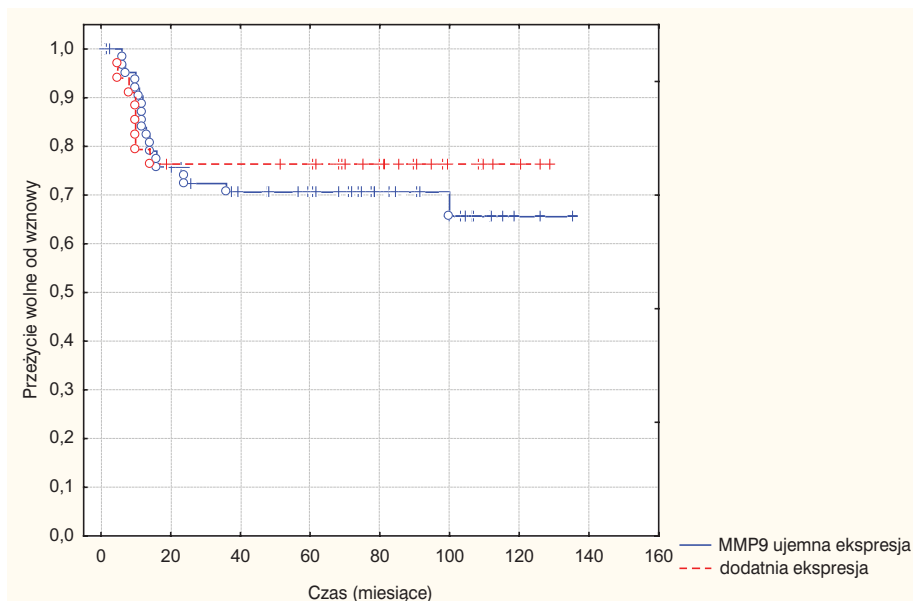
aż do 10-krotnego przy dużych przerzutach (N3). Spośród badanych białek jedynie wysoka ekspresja MMP2 okazała się być niezależnym czynnikiem, zwiększającym 2-krotnie ryzyko zgonu (Tab. III).

Tab. III. Analiza wartości rokowniczej cech klinicznych i histopatologicznych raka krtani w ocenie całkowitego czasu przeżycia wg modelu proporcjonalnego hazardu Cox'a

Zmienne niezależne	HR ^a	-95%CI	+95%CI	p
Lokalizacja podgłośniowa guza	12,274	1,331	113,221	0,027
Wielkość guza T3/T4	5,256	1,841	15,005	0,002
Przerzuty do węzłów chłonnych szyi (N)	10,334	3,300	32,361	<0,001
TNM IV	4,743	1,669	13,475	0,003
MMP2 dodatnia ekspresja	2,053	1,007	4,185	0,048



Ryc. 6. Czas całkowitego przeżycia w zależności od ekspresji MMP9 u chorych na raka krtani ($p=0,07$)



Ryc. 7. Wolny od wznowy czas przeżycia w zależności od ekspresji MMP9 u chorych na raka krtani ($p=0,6$)

Analiza wieloczynnikowa wolnego od wznowy czasu przeżycia pacjentów wykazała, że jedynym niezależnym czynnikiem ryzyka zgonu jest obecność przerzutów do węzłów chłonnych szyi, której stwierdzenie oznacza zwiększenie ryzyka zgonu z powodu raka krtani niemal 5-krotnie (HR 4,8; 95% CI 1,05-22,02; $p=0,04$). Pozostałe cechy kliniczne i patologiczne nowotworu, podobnie jak ekspresja badanych białek, nie mają znaczenia prognostycznego w ocenie wolnego od wznowy czasu przeżycia pacjentów z rakiem krtani.

Dyskusja

Wzrost i inwazja nowotworów złośliwych są wieloetapowymi procesami, w których komórki nowotworowe pokonują barierę otaczającego podścieliska oraz błony

podstawnej. Niezbędny jest tutaj udział metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej. Szczególną rolę wydają się odgrywać przede wszystkim kolagenazy, w tym MMP1, odpowiedzialne za miejscowy wzrost nowotworu oraz żelatynazy, MMP2 i MMP9, powodujące przerwanie bariery błony podstawnej. Z tego względu ekspresję metaloproteinaz oraz jej zależność z przebiegiem choroby nowotworowej oceniano w wielu nowotworach złośliwych [7-12].

W licznych badaniach udowodniono, że wysoka ekspresja MMP1 może być niekorzystnym czynnikiem rokowniczym, między innymi w nowotworach przewodu pokarmowego, trzustki, sutka [13- 15]. Także w nowotworach głowy i szyi O-charoenrat i wsp. wykazali korelację między poziomem ekspresji MMP1 a miejscowym zaawansowaniem nowotworu – guzy większe

charakteryzowały się znacznie wyższą ekspresją MMP1 [16]. Również w badanej grupie chorych guzy większe i bardziej zaawansowane (T3/T4, III/IV TNM) częściej wykazywały dodatnią ekspresję MMP1, w porównaniu z guzami mniejszymi i o niższym stopniu zaawansowania. Jednak zależności te nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$). Podobną korelację obserwowano w odniesieniu do MMP2. Także w wielu innych badaniach autorzy wykazali narastanie ekspresji MMP2 wraz z miejscowym zaawansowaniem procesu nowotworowego, między innymi w raku trzustki, żołądka, nowotworach głowy i szyi, czerniaku złośliwym [16-20]. Z drugiej jednak strony liczne doniesienia wskazują na brak istnienia takiej zależności [7, 10, 21-23], również w odniesieniu do raka krtani [24, 25]. Z tego względu wydaje się, że dokładne poznanie funkcji MMP2 w procesie miejscowego wzrostu guzów nowotworowych wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

W badaniach własnych nie stwierdzono korelacji między ekspresją MMP1, a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych oraz pojawieniem się w okresie obserwacji wznowy miejscowej i wznowy węzłowej ($p > 0,05$). Podobnie w doniesieniach innych autorów zwykle nie udaje się wykazać zależności między MMP1 w rakach regionu głowy i szyi, w tym również w raku krtani, a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych [16, 26-28]. W dostępnym piśmiennictwie jedynie badania Kurahara i wsp. udowodniły istnienie korelacji między wysoką ekspresją MMP1, a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych w nowotworach głowy i szyi [29]. Obserwacje te są zgodne z mechanizmem działania MMP1, która jest odpowiedzialna przede wszystkim za trawienie kolagenów strukturalnych macierzy pozakomórkowej – a więc za rozrost guza w pierwotnym miejscu jego powstania, lub też w nowej lokalizacji przerzutu. Nie wpływa ona natomiast na rozkład składników i przekroczenie bariery błony podstawnej, co jest niezbędnym etapem w procesie powstawania przerzutów.

Z kolei istotną rolę w powstawaniu przerzutów do węzłów chłonnych wydają się odgrywać żelatynazy, których podstawowym substratem jest kolagen typu IV, główny składnik błony podstawnej. Założenie to potwierdzają wyniki badań Kręcickiego i wsp. Autorzy zaobserwowali, że immunoekspresja MMP2 jest szczególnie wysoka w przypadkach raka krtani, w których wybarwienie kolagenu IV wzdłuż błony podstawnej jest obniżone, nieciągłe. Ponadto stwierdzili istnienie silnej zależności między brakiem ciągłości kolagenu IV a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Natomiast korelacja między ekspresją MMP2 a cechą N była na granicy istotności statystycznej [24]. W dalszych etapach wzrostu nowopowstałych guzów przerzutowych niezbędny jest proces angiogenezy, czyli nowotworzenia naczyń krwionośnych. Podnosi się tutaj rolę MMP9. Korelację między ekspresją MMP9 i nasileniem angiogenezy obserwowano w przypadku raka żołądka, piersi oraz w nowotworach głowy i szyi. Rola metaloproteinaz w tym procesie prawdopodobnie polega na ułatwianiu migracji komórek endotelium oraz na uwalnianiu czynników promujących angiogenezę z ich

połączeń ze składnikami macierzy pozakomórkowej [7, 8, 11]. W licznych nowotworach udowodniono, że ekspresja żelatynaz jest szczególnie wysoka w przypadkach, w których są obecne przerzuty do węzłów chłonnych. Zależności takie obserwowano między innymi w raku prostaty, żołądka, jamy ustnej, gardła dolnego i innych nowotworach głowy i szyi [7, 9, 11, 12, 16, 17, 23, 29-32]. W raku okolicy nagłośniowej Xie i wsp. oceniali ekspresję żelatynaz zarówno na poziomie mRNA, jak i na poziomie białka. Autorzy ci uznali, że ocena ekspresji żelatynaz w wycinkach przedoperacyjnych raka tej okolicy może być pomocna w wykrywaniu mikroprzerzutów, i w związku z tym także w kwalifikowaniu pacjentów do bardziej rozległego leczenia chirurgicznego, np. do elektrywnych operacji układu chłonnego szyi [28]. W badaniach własnych stwierdzono bardzo silną korelację między ekspresją MMP2, a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Natomiast odsetek komórek nowotworowych z dodatnią ekspresją MMP9 był coraz wyższy w kolejnych grupach z obecnymi przerzutami do węzłów chłonnych (cecha N1-N3), jednak nie były to zależności znamienne statystycznie. Wyniki te potwierdzają udział żelatynaz w procesie przerzutowania.

Analiza czasu przeżycia pacjentów w zależności od ekspresji badanych metaloproteinaz wykazała, że w badanej grupie chorych jedynie dodatnia ekspresja MMP2 wiąże się z krótszym przeżyciem. Zależność między nadekspresją MMP2 a krótszym całkowitym i wolnym od wznowy czasem przeżycia obserwowano między innymi w przypadku raka żołądka, trzustki, nerki [17, 21, 22]. W nowotworach głowy i szyi Ruokolainen H. i wsp. stwierdzili, że wysoka ekspresja tego białka jest czynnikiem prognostycznym, warunkującym krótsze przeżycie [10]. W badaniu Ondruschka C. i wsp. w analizie wieloczynnikowej obserwowano, że wysoka ekspresja MMP2 na froncie inwazyjnym guza jest niezależnym czynnikiem ryzyka zgonu z powodu nowotworów głowy i szyi [9]. Ocena MMP2 u pacjentów z rakiem krtani wykazała, że jej nadekspresja wyraźnie koreluje z krótszym całkowitym czasem przeżycia [33]. Wyniki pracy własnej oraz cytowanych badań wskazują, że ekspresja MMP2 może być wartościowym czynnikiem prognostycznym w nowotworach złośliwych, w tym również w raku krtani.

Na podstawie powyższych badań wykazano, że istnieje zależność między ekspresją MMP2, a cechami klinicznymi i patologicznymi raka krtani. Ponadto stwierdzono, że ekspresja tego białka ma wartość rokowniczą u chorych z rakiem krtani a analiza wieloczynnikowa wykazała, że jest to wskaźnik prognostyczny, niezależny od innych cech klinicznych i patologicznych nowotworu.

Ponadto, mimo stwierdzenia istnienia zależności między ekspresją MMP1 i -9 a cechami klinicznymi i patologicznymi raka krtani, nie wykazano znaczenia rokowniczego tych białek u chorych na raka krtani.

Dr n. med. Wioletta Pietruszewska
Katedra i Klinika Otolaryngologii UM w Łodzi
ul. Kopcińskiego 22
90-153 Łódź

Piśmiennictwo

1. Pawłęga J. Obecne możliwości zmniejszenia ryzyka zgonu na nowotwory głowy i szyi. *Otolaryngol Pol* 1998; 52: 199-202.
2. O-charoentrat P, Rhys-Evans P, Eccles S. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer* 2001; 92: 556-68.
3. Hrabec E, Stręk M. Human matrix metalloproteinase family: domain structure, substrate specificity and their expression pattern in normal and cancer cells. *Current Pneumology* 1997; 1: 73-85.
4. Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4823-30.
5. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML i wsp. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1135-49.
6. Kotulska-Wolwender K, Larysz-Brysz M, Fus Z i wsp. Metaloproteinyzacy macierzy pozakomórkowej – perspektywy ich wykorzystania w medycynie. *Wiadomości Lekarskie* 2002; 55: 463-71.
7. Franchi A, Santucci M, Masini E i wsp. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2002; 95: 1902-10.
8. Kurizaki T, Toi M, Tominaga T. Relationship between matrix metalloproteinase expression and tumor angiogenesis in human breast carcinoma. *Oncol Rep* 1998; 5: 673-77.
9. Ondruschka C, Buhtz P, Motsch C i wsp. Prognostic value of MMP-2,-9 and TIMP-1,-2 immunoreactive protein at the invasive front in advanced head and neck squamous cell carcinomas. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 509-15.
10. Ruokolainen H, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Tissue and circulating immunoreactive protein for MMP2 and TIMP-2 in head and neck squamous cell carcinoma – tissue immunoreactivity predicts aggressive clinical course. *Modern Pathol* 2006; 19: 208-17.
11. Sun WH, Sun YL, Fang RN i wsp. Expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in gastric cancer and its correlation with angiogenesis. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 12, 707-13.
12. Zhang L, Shi J, Feng J i wsp. Type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2 and -9) in prostate cancer. *Prost Cancer and Prost Dis* 2004; 7: 327-32.
13. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P i wsp. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med* 1996; 2: 461-62.
14. Inoue T, Yashiro M, Nishimura S i wsp. Matrix metalloproteinase-1 expression is a prognostic factor for patients with advanced gastric cancer. *Int J Mol Med* 1999; 4: 73-7.
15. Nakopoulou L, Giannopoulou I, Gakiopoulou H i wsp. Matrix metalloproteinase-1 and -3 in breast cancer: correlation with progesterone receptors and other clinicopathological feature. *Hum Pathol* 1999; 30: 436-42.
16. O-charoentrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127: 813-20.
17. Juuti A, Lundin J, Nordling S i wsp. Epithelial MMP2 expression correlates with worse prognosis in pancreatic cancer. *Oncology* 2006; 71: 61-8.
18. Kato K, Hara A, Kuno T i wsp. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in oral squamous cell carcinomas: manifestation and localization of their activity. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 340-46.
19. Mönig SP, Baldus SE, Hennecken JK i wsp. Expression of MMP2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopathology* 2001; 39: 597-602.
20. Redondo P, Lloret P, Idoate M i wsp. Expression and serum levels of MMP2 and MMP9 during human melanoma progression. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30: 541-45.
21. Allgayer H, Babic R, Beyer BC. Prognostic relevance of MMP2 (72-kD collagenase IV) in gastric cancer. *Oncology* 1998; 5: 152-60.
22. Kubben FJ, Sier CMF, van Duijn W i wsp. Matrix metalloproteinase-2 is a consistent prognostic factor in gastric cancer. *Br J Cancer* 2006; 94: 1035-40.
23. Miyajima Y, Nakano R, Morimatsu M. Analysis of expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma by in situ hybridisation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 678-84.
24. Kręcicki T, Zaleska-Kręcicka M, Jeleń M i wsp. Expression of type IV collagen and matrix metalloproteinase-2 (type IV collagenase) in relation to nodal status in laryngeal cancer. *Clin Otolaryngol* 2001; 26: 469-72.
25. Sarioglu S, Ozer E, Kirimca F i wsp. Matrix metalloproteinase-2 expression in laryngeal preneoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract* 2001. 197: 483-86.
26. Charous SJ, Strickling GP, Nanney LB i wsp. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106: 271-78.
27. Heissenberg MC, Gorogh T, Lippert BM i wsp. Metalloproteinases and their inhibitors in squamous cell carcinoma of the hypopharynx: indicators of individual tumor aggressiveness. *Otolaryngol Pol* 1998; 52: 521-26.
28. Xie M, Sun J, Li Y. Expression of matrix metalloproteinases in supraglottic carcinoma and its clinical implication for estimating lymph node metastases. *Laryngoscope* 2004; 114: 2243-48.
29. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T i wsp. Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 1999; 21: 627-38.
30. Impola U, Uitto VJ, Hietanen J i wsp. Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP9), and metalloelastase (MMP12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *J Pathol* 2004; 202: 14-22.
31. Kawata R, Shimada T, Maruyama S i wsp. Enhanced production of matrix metalloproteinases-2 in human head and neck carcinoma is correlated with lymph node metastasis. *Acta Otolaryngol* 2002; 122: 101-6.
32. Katayama A, Bandoh N, Kishibe K i wsp. Expression of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastase and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 634-40.
33. Danilewicz M, Sikorska B, Wągrowaska-Danilewicz M. Prognostic significance of the immunoexpression of matrix metalloproteinase MMP2 and its inhibitor TIMP-2 in laryngeal cancer. *Med Sci Monitor* 2003; 9: MT42-47.

Otrzymano: 16 czerwca 2009 r.

Przyjęto do druku: 30 listopada 2009 r.