

Anna Goździalska<sup>2</sup>, Anna Gawędzka<sup>3</sup>, Paweł Brzewski<sup>4</sup>,  
Anna Wojas-Pelc<sup>4</sup>, Jerzy Jaśkiewicz<sup>1</sup>

# Diagnostyka chorób nowotworowych skóry na podstawie oznaczenia ekspresji metaloproteinaz

---

## Abstract

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc- dependent endopeptidase. A characteristic feature of MMPs is the ability of degradation of at least one component of the extracellular matrix (ECM). Degradation of ECM components like collagen proteins, proteoglycans and laminins leads to change in tissue structure, which enables the migration of tumor cells.

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common malignant tumor of the skin. BCC is derived from cells of the basal layer of the epidermis. Basal cell carcinoma is characterized by a slight ability to metastases. BCC is most common in Caucasians and the main cause of this type of tumor is the solar radiation.

The aim of this study was to determine the expression of mRNA for MMP-2 and MMP-9 in basal cell carcinoma tissue and bordering healthy skin tissue (control sample). Both, examined and control tissues, were taken from the same patients. Skin tissues were obtained from 15 patients diagnosed as BCC nodularis skin cancer. Using the method of RT-PCR showed significant increase in expression of mRNA for MMP-2 and MMP-9 in tumor tissue compared to non tumor skin tissue.

It can be assumed that the molecular study of MMPs expression in skin tissue may be a useful and complementary diagnostics test in histopathologic diagnosis of skin cancer. Diagnostic tests, complemented with molecular markers, may allow

---

<sup>1</sup> Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych.

<sup>2</sup> Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Zakład Analityki Biochemicznej Wydział Farmaceutyczny.

<sup>3</sup> Akademia Wychowania Fizycznego w Krakowie, Zakład Farmakologii i Biofizyki.

<sup>4</sup> Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Katedra i Klinika Dermatologii.

for precise definition of the border margin of excised tumor, which is an important prognostic factor.

**Key words:** metalloproteinases (MMPs), basal cell carcinoma (BCC)

## Wstęp

Metaloproteinazy (MMPs) macierzy zewnątrzkomórkowej są grupą metalozależnych enzymów o działaniu proteolitycznym. Wraz z trzema innymi rodzinami białek: astacydami, adamalizinami i serralizinami, należą do nadrodziny endoproteinaz posiadających w swojej budowie jon cynku [1, 2]. Metaloproteinazy syntezowane są przez większość prawidłowych komórek organizmu min.: fibroblasty, mastocyty, komórki dendrytyczne, komórki mikrogleju, keratynocyty, mioocyty, komórki śródbłonna [3, 4]. Enzymy te wydzielane są również przez komórki nacieku zapalnego, a także przez komórki nowotworowe [1, 5]. Komórki śródbłonna mają konstytutywną zdolność do wydzielania MMP-2 [6], a pod wpływem różnych czynników stymulujących nabierają zdolności do wydzielania: MMP-1,-3,-9,-14 [7]. Do tej pory poznano i sklasyfikowano 23 typy MMPs, a 22 z nich występuje u człowieka [8]. Substratami dla metaloproteinaz są białka macierzy pozakomórkowej (ECM) takie jak: lamina, różnego typu kolageny, elastyna, fibronektyna, witronektyna, entacyna, tenascyna, agrecan i proteoglikany [7, 8]. MMPs działają w środowisku obojętnym lub lekko zasadowym, w obecności jonów wapnia. Jako jedyne enzymy MMPs mają zdolność trawienia kolagenu typu IV [12]. Degradacja składników macierzy pozakomórkowej powoduje powstanie wolnej przestrzeni dla komórek podścieliska. Metaloproteinazy trawiąc połączenia międzykomórkowe i składniki błon podstawowych mogą zmieniać mikroarchitekturę tkanek oraz wpływać na funkcjonowanie poszczególnych komórek [1]. Różne cząsteczki sygnałowe i/ lub ich receptory mogą ulegać aktywacji lub hamowaniu pod wpływem proteolitycznego działania metaloproteinaz [7]. Tym sposobem metaloproteinazy pośrednio wpływają na wiele ważnych procesów komórkowych, takich jak: ruchliwość, różnicowanie, proliferacja a nawet apoptoza [1, 4, 13].

W warunkach fizjologicznych MMPs biorą udział w wielu ważnych procesach. Podczas wzrostu i budowy tkanki podporowej narządów wewnętrznych umożliwiają migrację proliferującym komórkom [6]. MMPs stymulują wzrost neuronów [5], biorą udział w angiogenezie nowych naczyń krwionośnych [7]. Są niezbędne do prawidłowego rozwoju szkieletu człowieka [5, 6]. Metaloproteinazy zapewniają odnowę tkanki łącznej i uczestniczą w procesie gojenia ran, wrzodów żołądka, złamań oraz powstawania blizny [20, 22, 26]. Warunkują cykliczne zmiany endometrium w trakcie cyklu miesięczkowego oraz zmiany zachodzące w trakcie ciąży, porodu i połogu [4, 12]. Również w procesach zapalnych MMPs odgrywają istotną rolę – zapewniają komórkom odpowiedzi przeciwzapalnej dotarcie do miejsca uszkodzenia. Wpływają na metabolizm jo-

nów chlorkowych w komórkach nabłonka dróg oddechowych oraz na czynność płytek krwi [5]. Metaloproteinazy biorą udział w przebudowie tkanki skórnej, będącej efektem naturalnego procesu starzenia skóry [14]. Zaobserwowano zmienioną aktywność metaloproteinaz w wielu procesach patologicznych. Metaloproteinazy i ich inhibitory uczestniczą w przebiegu zawału mięśnia sercowego i tworzeniu tętniaka aorty [5]. Biorą udział w procesach chorobowych charakteryzujących się degradacją tkanki m.in. w chorobach autoimmunologicznych, stwardnieniu rozsianym, chorobie Alzheimera, stwardnieniu zanikowym bocznym, marskości wątroby, a także osteoporozie [2, 6, 12, 15].

Metaloproteinazy odgrywają znaczącą rolę w progresji nowotworu. Pobudzają komórki nowotworowe do wzrostu przez wpływ na uwalnianie transmembranowych czynników wzrostu. MMPs mogą również hamować rozwój nowotworu przez wydzielania TGF- $\beta$  [5]. Dzięki trawieniu macierzy zewnątrzkomórkowej i połączeń międzykomórkowych metaloproteinazy umożliwiają komórkom nowotworowym migrację oraz inwazję [14]. Niektóre MMPs mogą obniżać skuteczność przeciwnowotworowych reakcji immunologicznych przez niszczenie receptorów dla IL-2 na limfocytach T [4, 5].

Metaloproteinazami uczestniczącymi w procesie angiogenezy są głównie: MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 trawiące kolagen typu IV [12]. Proces ten jest konieczny do przerwania ciągłości błony naczyń krwionośnych. Przerwanie błony podstawnej naczyń pozwala na migrację komórek śródbłonka naczyń do macierzy pozakomórkowej [7, 12]. Tam w przygotowanej przez metaloproteinazy przestrzeni komórki śródbłonka naczyń mogą tworzyć nowe naczynia dla rosnącego guza. Z rozwojem guza nowotworowego, który wymaga nowych naczyń krwionośnych do swojego wzrostu, zawsze zatem jest związana przynajmniej jedna z wymienionych metaloproteinaz [4, 6].

Przerwanie błony naczyń krwionośnych umożliwia także komórkom nowotworowym migrację do krwioobiegu, a przez to tworzenie przerzutów. Metaloproteinazy mają wpływ na uwalnianie i aktywację sekwestrowanych czynników angiogennych, takich jak: VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ . Metaloproteinazy trawiąc plazminogen, kolageny typu IV i VIII przyczyniają się do powstawania angiostatyny, tumostatyny i endostatyny, będących silnymi inhibitorami angiogenezy, co sprawia, że MMPs wykazują również działanie antyangiogenne [7].

Udział metaloproteinaz w rozroście nowotworów potwierdza wzrost wydzielania i aktywności metaloproteinaz niemal we wszystkich typach nowotworów u ludzi. Stwierdzenie podwyższonego poziomu MMP koreluje ze stopniem zaawansowania, wyższą inwazyjnością, szybkością dawania przerzutów odległych i krótszym okresem przeżycia chorego [6, 8]. Nasiloną miejscową ekspresją MMPs uważana jest za nowy, istotny czynnik prognostyczny, który może decydować o wdrożeniu leczenia uzupełniającego [1].

Wykazano, że niektóre komórki nowotworowe mają zdolność syntezy i sekcji metaloproteinaz. Komórki raka żołądka, płuc i piersi wydzielają – MMP-7,

komórki raka płaskonabłonkowego – MMP-8, a różnego rodzaju komórki nowotworowe pochodzenia nabłonkowego mogą produkować: MMP-2, MMP-9 i MMP-14 [5, 8, 12].

Na powierzchni komórek nowotworowych oraz niektórych komórek prawidłowych obecne są cząsteczki syntezowanego przez nie czynnika EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*). Czynniki te pobudzają produkcję metaloproteinaz przez fibroblasty obecne w pobliżu komórek posiadających EMMPRINs na swojej błonie [4, 5, 6]. Powoduje to trawienie macierzy zewnątrzkomórkowej np. wokół komórek nowotworowych. Podwyższone stężenie EMMPRINs stwierdzono na powierzchni komórek nowotworu: pęcherza moczowego, płuc, piersi i przewodu pokarmowego [5].

Nowotworem określa się nieprawidłową tkankę, której komórki dzielą się nadmiernie w niekontrolowany sposób. Rozrost tkanki nowotworowej nie ustępuje po usunięciu czynnika, przez który został zainicjowany. Nowotwory rozwijają się z komórek zdrowych, które w procesie kancerogenezy ulegają transformacji nowotworowej. Kumulujące się w genomie prawidłowej komórki mutacje zaburzają cykl komórkowy. W wyniku mutacji protoonkogenów i genów supresorowych zanika kontrola cyklu komórkowego, a komórki zyskują zdolność do nieograniczonej liczby podziałów [10]. WHO klasyfikuje nowotwory w oparciu o rodzaj tkanki, z jakiej wywodzą się komórki nowotworowe i poziom zróżnicowania komórek nowotworowych. Nowotwory ogólnie dzieli się na łagodne i złośliwe – oba typy tworzą nieustająco rosnące, choć z różną szybkością guzy.

Rak podstawnokomórkowy skóry stanowi ¼ wszystkich diagnozowanych nowotworów. BCC obejmuje 65–75% ogólnej liczby wszystkich nowotworów skóry, a wśród nieczerniakowych nowotworów skóry jest najczęściej diagnozowanym typem [14, 15, 16, 17]. Wzrost zapadalności na BCC odnotowuje się w regionach o dużym nasłonecznieniu, zwłaszcza na terenach wyżynnych i w okolicach równika [18, 19]. Guzy typu BCC pojawiają się najczęściej na skórze osób starszych. Szczyt zachorowalności przypada na 7. dekadę życia. U osób młodszych BCC występuje sporadycznie, a u dzieci praktycznie jest niespotykany [10, 20]. Jednym z czynników sprzyjających rozwojowi guzów BCC jest jasny kolor skóry [21]. Istnieje sześć fototypów skóry (I–VI) określanych według skali Fitzpatricka. Skala opiera się na indywidualnej reakcji skórnej na promienie słoneczne. Z badań wynika, że osoby o niskim fototypie (I–III) znacznie częściej chorują na BCC [22, 23]. Zapadalność na BCC nie jest determinowana płcią, mimo to częściej chorują mężczyźni. Wynika to raczej z wykonywania przez mężczyzn zawodów narażonych na ciągłą ekspozycję słoneczną niż z predyspozycji genetycznych [10, 17, 18].

Rak podstawnokomórkowy jest zaliczany do guzów typu płodowego. Komórki guza są zróżnicowane na poziomie tworzących się zawiązków przydatków ektodermy [4, 21]. Komórki te są małe, okrągłe, o silnie zasadochłonnej cytoplazmie i swoim wyglądem przypominają keratynocyty warstwy podstaw-

nej naskórka [22]. Badania immunohistochemiczne potwierdzają, że komórki BCC wywodzą się z komórek macierzystych naskórka [4], ale także z komórek macierzy włosa. W cytoplazmie komórek BCC obecne są cytokeratyny 5 i 14 charakterystyczne dla prawidłowych keratynocytów warstwy podstawnej i komórek mieszka włosowego, natomiast brak cytokeratyny 1 i 10 typowych dla komórek warstwy kolczystej naskórka [18].

Rak podstawnokomórkowy jest nowotworem o niewielkiej i tylko miejscowej złośliwości [17, 18, 21]. Rozrasta się kosztem otaczających go tkanek [14, 20], rozbudowując macierz pozakomórkową bogatą w kolageny, fibronektynę, laminę, tenascinę. BCC charakteryzuje się powolnym wzrostem, który w znacznym stopniu ogranicza apoptoza kompensująca nieustanie proliferujące komórki nowotworowe [19]. BCC rzadko występuje w postaci agresywnych guzów, które głęboko naciekają i dają wznowy. Nawet tego typu zamiany sporadycznie przerzutują [1]. Ta cecha wyróżnia BCC spośród nowotworów skóry. Oszacowana dla niego skłonność do dawania przerzutów wynosi od 0,1–0,003% [16, 17, 22]. Na rzadkość tworzenia przerzutów przez guzy BCC ma wpływ kilka czynników. Przede wszystkim ciągłość błony podstawnej naskórka. Guzy BCC najczęściej nie niszczą błony podstawnej naskórka, ale mimo to pod ich wpływem w blaszce jasnej brak ekspresji antygenu pemfigoidu, a antygeny blaszki gęstej i siateczkowatej wykazują zmienioną ekspresję. Rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych ogranicza także komponenta dermalna produkowana przez fibroblasty, która jednocześnie odżywia komórki BCC [19].

Etiopatogeneza raka podstawnokomórkowego jest złożona i wciąż nie jest do końca poznana [24]. Najczęściej nowotwór rozwija się spontanicznie na zdrowej skórze i jest niebolesny. Istnieją jednak stany przedrakowe zwiększające szanse na rozwój BCC, a zalicza się do nich: rogowacenie starcze, róg skóry, skórę pergaminową lub barwnikową, uszkodzenia rentgenowskie, rogowacenia chemiczne (arsenowe, dziegiowe). Znane są również przypadki pojawienia się nowotworów BCC na uszkodzonej skórze np. po bliźnie poszczepiennej [16, 17, 18, 21].

Większość ognisk BCC zlokalizowana jest na nieowłosionej skórze głowy [6]. Około 80% zmian BCC występuje w górnej części twarzy powyżej linii łączącej kąty ust z płatkami usznymi. Najrzadziej guzy BCC rozwijają się na owłosionej skórze głowy i górnej części tułowia [17, 18].

Ze względu na cechy morfologiczne guza wyróżnia się kilka typów klinicznych BCC. Do najpowszechniejszych należą: postać guzkowa, powierzchniowa i barwnikowa [11]. Do odmian bardziej agresywnych związanych z naciekaniem i niszczeniem tkanek zalicza się typy naciekające, twardzinopodobny oraz mikroguzkowy [17, 25].

W 60% diagnozowanych przypadków spotykana jest postać guzkowa (*BCC nodosum*) [39]. Ten typ BCC tworzy niewielkie, twarde guzki o połyskującej powierzchni, otoczone perłowym wałem skóry. Guzki nie mają charakteru zapalnego, ale na ich powierzchni może się tworzyć owrzodzenie pokryte strupka-

mi. Tego typu guzki łatwo krwawią przy niewielkim uszkodzeniu. Często guzek bywa pokryty zmianami naczyńowymi typu teleangiektazji. Postać płaska BCC rozrasta się obwodowo, tworząc bliznowacenie w środku zmiany [19, 21, 22].

Drugą co do częstości występowania postacią BCC jest jego odmiana powierzchniowa (*BCC superficiale*). Postać ta ma przewlekły przebieg i rozprzestrzenia się na przekroju lat. Typ ten znacznie różni się od pozostałych typów BCC. Dlatego diagnostyka *BCC superficiale* jest trudna, a zmiany bywają mylone z łuszczycą lub zapaleniem skóry. Odmiana powierzchniowa BCC charakteryzuje się wielogniskowym wzrostem i lokalizacją na powierzchni tułowia, gdzie tworzy liczne, dobrze odgraniczone, powierzchowne plamy [18, 21].

Oszacowano, że co roku w Europie, USA i Australii liczba nowych przypadków BCC wzrasta o 3–6%. Brak danych na temat niezarejestrowanych przypadków BCC powoduje, że spora grupa chorych nie jest uwzględniana w statystykach. Wzrastająca zapadalność na raka podstawnkomórkowego skóry, przyczynia się do rozwoju metod badawczych nad molekularnym podłożem tego nowotworu. Obecnie intensywnie bada się wpływ metaloproteinaz na patogenezę chorób skóry, w tym także nowotworów skóry, zarówno agresywnych nowotworów – czerniaka i raka kolczystokomórkowego, jak i form łagodnych, do których zaliczany jest BCC.

## Cel badań

Celem przedstawionych badań było oznaczenie ekspresji mRNA dla MMP-2 i MMP-9 w biopsjach skóry zmienionej nowotworowo w przebiegu raka podstawnkomórkowego i w skórze zdrowej, pochodzącej z marginesu guza, pobranych od tych samych pacjentów.

## Materiał

Materiał do badań stanowiły biopsjaty skóry z guza podstawnkomórkowego oraz wycinki marginesu zdrowej tkanki otaczającej guz pochodzące od tego samego pacjenta. Na podstawie decyzji Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego uzyskano zgodę na przeprowadzenie badań w powyższym materiale. Przebadano grupę 15 pacjentów ze stwierdzonymi zmianami nowotworowymi skóry oznaczonymi histopatologicznie jako BCC *nodularis* i BCC *superficiale*. Średni wiek w badanej grupie chorych wynosił 73 lata.

## Metody

W celu zabezpieczenia RNA przed działaniem RNaz fragmenty tkanek, z których izolowano całkowite RNA inkubowano w odczynniku RNAlater RNA Stabilization Reagent firmy Qiagen. Biopsjaty skórne poddano pulweryzacji. Ekstrakcję całkowitego RNA wykonano przy użyciu zestawu RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen). Izolację prowadzono zgodnie z procedurą podaną przez producenta.

Cały proces prowadzono w komorze DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR (Biosan). Po izolacji oceniano ilość oraz jakość wyizolowanego całkowitego RNA metodą spektrofotometryczną. Reakcję RT-PCR prowadzono stosując zestaw RevertAid H Minus First stand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). W niniejszej pracy stosowano starter oligo(dT), który hybrydyzuje z końcami poliadenyłowymi mRNA. Wszystkie etapy przygotowania próbek do reakcji RT wykonywano w komorze DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR (Biosan). Reakcja RT wykonywana była z zastosowaniem termocyklera Mastercycler gradient EP 5331 (Eppendorf). W niniejszych badaniach użyto cDNA powstałe w reakcji RT z zastosowaniem startera oligo (dT). Powstałe cDNA stosowano jako matrycę do amplifikacji określonego fragmentu genu MMP-2. Stosowano startery o następującej sekwencji: nić sensowna (kodująca): 5'-CACTTTCCTGGGCAACAAAT-3', nić antysensowna (matrycowa): 5'-CTCCTGAATGCCCTTGATGT-3'. Wielkość produktu powstającego w reakcji PCR wynosiła 271 bp. Mieszaninę reakcyjną przygotowywano w sterylnych próbkówkach o pojemności 200 $\mu$ l, w temperaturze 4°C. Następnie próbkówki umieszczano w termocyklerze Mastercycler Gradient EP 5331 (Eppendorf). Profil temperaturowy reakcji PCR: 95°C 10 min, 96°C 15 sek, 58°C 1 min, 72°C 2 min, 61°C 30 min. Reakcję PCR dla amplifikacji sekwencji genu MMP-9 wykonano w analogiczny sposób jak dla genu MMP-2. Stosowano startery o następującej sekwencji: nić sensowna (kodująca): 5'-TCCCTGGAGACCTGAGAACC-3', nić antysensowna (matrycowa): 5'-GTCGTCGGTGTCTAGTTGG-3'.

Wielkość produktu powstającego w reakcji PCR wynosiła 659bp. Jako gen referencyjny wybrano gen ludzkiej  $\beta$ -aktyny (ACTB). Reakcję PCR dla amplifikacji sekwencji genu ACTB wykonano w analogiczny sposób jak dla genu MMP-2 i MMP-9. Startery komplementarne do sekwencji docelowej genu ACTB: nić sensowna (kodująca): 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3', nić antysensowna (matrycowa): 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'. Wielkość produktu powstającego w reakcji PCR wynosiła 234bp. Produkty reakcji PCR rozdzielono elektroforetycznie w żelu agarozowym. W tym celu przygotowano 1,5% żel agarozowy, który wylewano stosując zestaw do elektroforezy horyzontalnej firmy Kucharzyk (Polska). Do próbek badanych dodawano stałą objętość buforu obciążającego 6x Orange Loading Dye Solution (Fermentas), mieszano, a następnie nakładano na żel, w objętości 5 $\mu$ l/studzienkę. Na każdy żel nakładano również marker wielkości GeneRuler™ 1kb Plus DNA ladder (Fermentas, Litwa), w ilości 5 $\mu$ l/studzienkę. Elektroforezę prowadzono w buforze TBE. Rozdział elektroforetyczny wykonywano przez 1,5 godziny, przy napięciu prądu wynoszącym 100 V i natężeniu 0,07 A. Po elektroforezie żele agarozowe inkubowano w roztworze bromku etydyny w buforze TBS, a następnie wykonywano zdjęcie w świetle UV z zastosowaniem kamery DS Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System firmy Kodak (USA). Analiza densytometryczna prążków wykonana została z użyciem oprogramowania Quantity One 4.3.2.

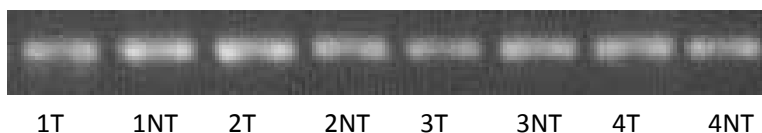
## Analiza statystyczna

Normalność rozkładu sprawdzano testem Shapiro-Wilka, a następnie wykorzystano test t-Studenta dla oceny znamienności statystycznej.

## Wyniki

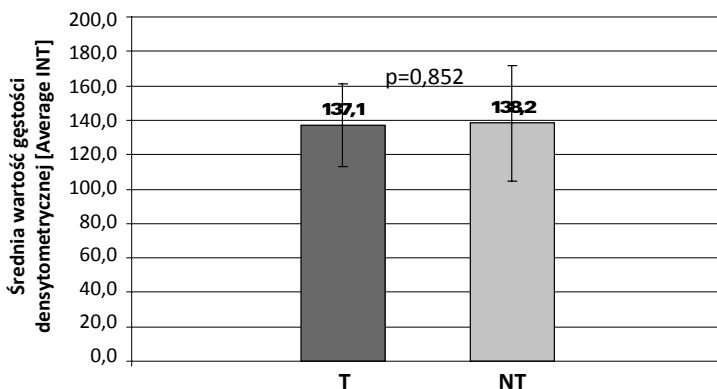
W wyniku rozdziału produktów reakcji RT-PCR w żelu agarozowym, dla mRNA dla MMP-2 pochodzącego z tkanek guza BCC typu powierzchniowego oraz mRNA dla MMP-2 pochodzącego z tkanek stanowiących margines guza u tych samych pacjentów, uzyskano elektroforegramy (ryc. 1).

Rycina 1. Przykładowy elektroforegram rozdziału produktów reakcji RT-PCR dla mRNA dla MMP-2 w guzie powierzchniowym BCC (T) oraz w tkance marginesu guza (NT)



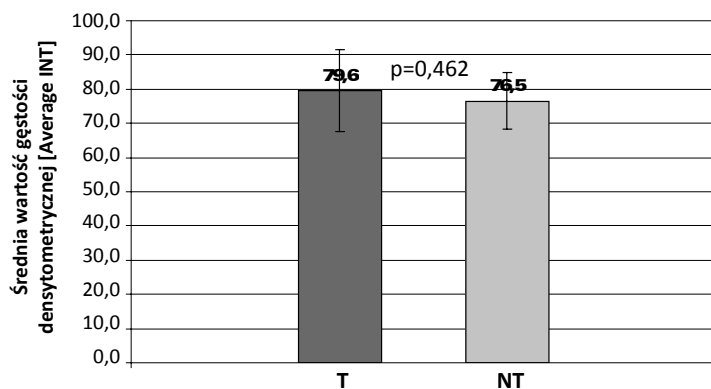
Elektroforegramy poddano obróbce densytometrycznej w programie Quantity One 4.6.3. Wartość densytometryczna każdego prążka odpowiada ekspresji mRNA dla MMP-2. Jako gen reporterowy wykorzystano cDNA dla  $\beta$ -aktyny. Średnie wartości gęstości densytometrycznej, liczone w grupach dla tkanek guza i tkanek marginesu guza u tych samych pacjentów przedstawiono na rycinach 2–5.

Rycina 2. Średnie wartości gęstości densytometrycznej ( $n = 8$ ) dla MMP-2, T-tkanki BCC typu powierzchownego, NT-tkanki pobrane z marginesu guza BCC

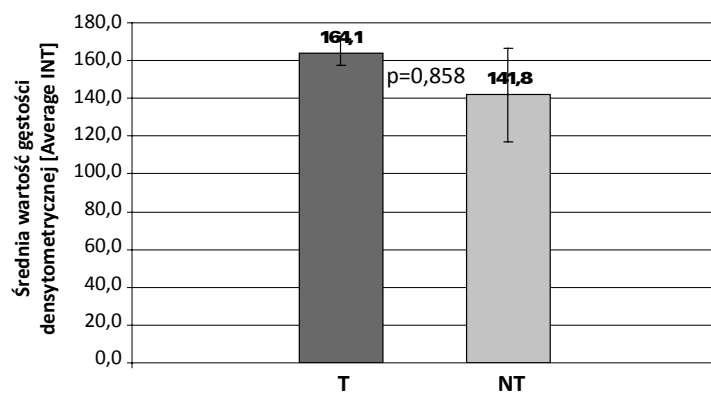




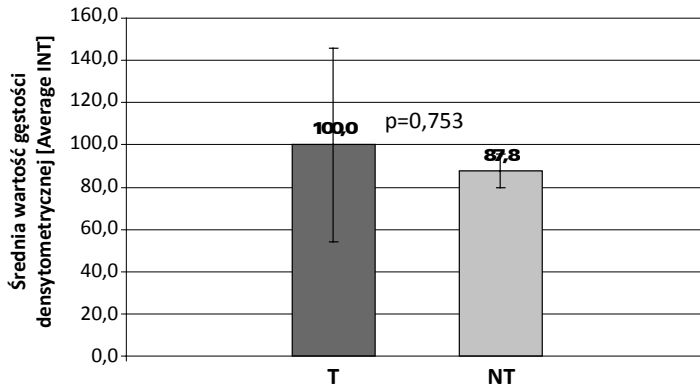
Rycina 3. Średnie wartości gęstości densytometrycznej (n = 8) dla MMP-9, T-tkanki BCC typu powierzchniowego, NT-tkanki pobrane z marginesu guza BCC



Rycina 4. Średnie wartości gęstości densytometrycznej (n = 7) dla MMP-2, T-tkanki BCC typu guzkowego naciekającego, NT-tkanki stanowiące margines guza BCC



Rycina 5. Średnie wartości gęstości densytometrycznej ( $n = 7$ ) dla MMP-9, T-tkanki BCC typu guzkowego naciekającego, NT-tkanki stanowiącej margines guza BCC



### Omówienie wyników

Uzyskane w przeprowadzonych badaniach wyniki dotyczące ekspresji mRNA dla MMP-2 i MMP-9 w guzach BCC potwierdzają rolę metaloproteinaz w inwazji nowotworu. W tkankach guza BCC typu powierzchniowego ekspresja mRNA dla metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w guzie i marginesie guza jest bardzo zbliżona. Wynik ten potwierdza obecność jedynie powierzchniowych zmian. W BCC typu guzkowego naciekającego wykazano wyższą ekspresję mRNA dla metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w porównaniu do ekspresji mRNA w tkance marginesu guza. Różnica w ekspresji mRNA dla MMP-2 była prawie dwukrotnie większa od różnicy w ekspresji mRNA dla MMP-9. Nie poznano do tej pory przyczyny odmiennej ekspresji różnych rodzajów MMPs przez komórki BCC. Można przypuszczać, że na różnice w ekspresji MMP-2 i MMP-9 może wpływać czynnik EMMPRIN. Białko to jest wydzielane przez komórki nowotworowe oraz niektóre komórki prawidłowe. EMMPRIN indukuje wydzielanie, przez fibroblasty podścieliska guza, metaloproteinaz typu MMP-1, MMP-2, MMP-3.

MMP-9 ma dwojaki wpływ na rozwój guza nowotworowego. Aktywna MMP-9 może promować proces tworzenia przerzutów, ale jednocześnie ma możliwość ograniczenia angiogenezy. MMP-9 wraz z MMP-3, MMP-7 i MMP-12 są głównymi metaloproteinazami generującymi bardzo silny inhibitor angiogenezy. Czynnikiem ten jest aminokońcowym fragmentem plazminogenu, który ulega oderwaniu pod wpływem proteolitycznego działania wymienionych MMPs. Zważywszy na rzadkość tworzenia przerzutów przez BCC, zaobserwowana podwyższona ekspresja mRNA dla MMP-9 w typie guzkowym naciekającym wskazuje na rolę MMP-9 ograniczającą proces angiogenezy. Powolny wzrost zmian BCC mógłby wynikać zatem z obecności angiostatyny, silnie hamującej proliferację komórek nabłonkowych.

Wykazano brak znamiennej statystycznie różnicy w średnich wartościach ekspresji mRNA dla MMP-2 i MMP-9 między tkanką guza BCC typu powierzchownego, a tkanką stanowiącą margines guza. Wykazano wyższą średnią wartość ekspresji mRNA dla MMP-2 i MMP-9 w tkance guza BCC typu guzkowego naciekającego do średniej wartości ekspresji mRNA dla MMP-2 i MMP-9 w tkance marginesu guza. MMPs jako czynniki prognostyczne mogłyby znaleźć zastosowanie dla typów agresywnych BCC, które dają nawroty oraz mogą tworzyć przerzuty. Oznaczenia poziomu metaloproteinaz mogłyby również służyć do monitorowania leczenia agresywnych odmian BCC.

Wzrastająca tkanka guza BCC oddziałuje na otaczające go tkanki, a oddziaływanie to, potwierdzone uzyskanymi wynikami sprawia, że oznaczenie poziomu metaloproteinaz w tkankach otaczających guz mogłyby również służyć do ustalania rozmiaru bezpiecznego marginesu podczas usuwania zmiany, która nacieka głęboko i trudno ocenić jej faktyczny zasięg.

Stale odkrywane są nowe fakty dotyczące udziału MMPs w patogenezie różnych chorób. Sam potencjał proteolityczny metaloproteinaz w progresji nowotworów został już udowodniony. Jednak ich rola w rozwoju nowotworów, także tych dotyczących skóry nie ogranicza się tylko do przygotowania wolnej przestrzeni dla nieustannie proliferujących komórek guza, przebudowy podścieliska czy udziału w tworzeniu naczyń dla guzów. Aktywne metaloproteinazy mają bowiem zdolność do aktywacji lub inhibicji agonistów i antagonistów receptorów. Tym sposobem komórki nowotworowe wydzielając MMPs lub indukując wydzielanie MMPs przez inne komórki, mają szeroki wpływ na procesy biologiczne zachodzące w tkankach otaczających guz.

Uzyskane wyniki potwierdzają łagodny charakter zmian typu powierzchownego BCC oraz agresywny charakter zmian typu guzkowego naciekającego BCC. Badania molekularne ekspresji MMPs tkanki skórnej mogą stać się użytecznym oznaczeniem diagnostycznym uzupełniającym badania histopatologiczne w diagnostyce raka skóry. Uzupełnienie badań diagnostycznych o markery molekularne może pozwolić na precyzyjne określenie granicy marginesu wyciętego guza, co ma duże znaczenie rokownicze. Wyniki powyższego badania, korespondując z wynikami badań histopatologicznych, stwarzają nadzieję na poszerzenie diagnostyki BCC.

Cały czas trwają badania nad skutecznością leków hamujących aktywność MMPs. Przypuszcza się, że zastosowanie inhibitorów metaloproteinaz w leczeniu nowotworów złośliwych spowoduje zmniejszenie masy guza lub zahamuje jego dalszy rozrost oraz może zapobiec tworzeniu się przerzutów.

## Wnioski

Wykazano brak znamiennej statystycznie różnicy w średnich wartościach ekspresji mRNA dla MMP-2 i MMP-9 między tkanką guza BCC typu powierzchownego a tkanką stanowiącą margines guza. Wykazano wyższą średnią wartość ekspresji mRNA dla MMP-2 i MMP-9 w tkance guza BCC typu guzkowego na-

ciekającego do średniej wartości ekspresji mRNA dla MMP-2 i MMP-9 w tkance marginesu guza. Uzyskane wyniki potwierdzają łagodny charakter zmian typu powierzchniowego BCC oraz agresywny charakter zmian typu guzkowego naciekającego BCC.

## Bibliografia

- [1] Kwiatkowski P., Godlewski J., Śliwińska-Jewsiewicka A., Kmieć Z., *Rola metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w procesie inwazji nowotworu*, „Polish Annals of Medicine” 2008, Vol. 15 (1), s. 43–50.
- [2] Westermarck J., Kähäri V.-M., *Regulation of Matrix Metalloproteinase Expression in Tumor Invasion* MediCity Research Laboratory and Department of Medical Biochemistry, University of Turku, and Department of Dermatology, Turku University Central Hospital, FIN-20520 Turku, Finland 0892-6638/99/0013-0781/\$02.25 FASEB 781.
- [3] Dziankowska-Bartkowiak B., Waszczykowska E., Żebrowska A., *Udział metaloproteinaz i ich inhibitorów patomechanizmie wybranych chorób skóry*, „Alergia – Astma – Immunologia” 2004, t. 9, nr 2, s. 71–79.
- [4] Kerkelä E., Saarialho-Kere U., *Matrix Metalloproteinases in Tumor Progression: Focus on Basal and Squamous Cell Skin Cancer*, „Experimental” 2003, Vol. 12, s. 109–125. C Blackwell Munksgaard, 2003.
- [5] Śliwowska I., Kopczyński Z., *Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej – charakterystyka biochemiczna i kliniczna wartość oznaczania u chorych na raka piersi*, „Współczesna Onkologia” 2005, Vol. 9, t. 8, s. 327–335.
- [6] Łukaszewicz-Zajac M., Mroczko B., Szmitowski M., *Znaczenie metaloproteinaz oraz ich inhibitorów w raku żołądka*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” (online) 2009, Vol. 63, s. 258–265.
- [7] Bogaczewicz J., Dudek W., Zubilewicz T., Wroński J., Przywara S., Chodorowska G., Krasowska D., *Rola metaloproteinaz macierzy i ich tkankowych inhibitorów w angiogenezie*, „Polski Merkurusz Lekarski” 2006, t. XXI, nr 121, s. 80.
- [8] Groblewska M., Mroczko B., Szmitowski M., *Rola wybranych metaloproteinaz i ich inhibitorów w rozwoju raka jelita grubego*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” (online) 2010, Vol. 64, s. 22–30.
- [9] Borst P., *Ethidium DNA Agarose Gel Electrophoresis: How it Started*, „IUBMB Life” 2005, Nov., Vol. 57, Issue 11, s. 745–747.
- [10] Bąkowska A., Czyż P., Kaszuba A., Miękoś-Zydek B., Skrzypczyk M., Kijowski R., *Ocena stopnia ekspresji onkoproteiny p53 w raku kolczystokomórkowym i podstawnokomórkowym skóry*, „Postępy Dermatologii i Alergologii” 2007, Vol. XXIV, t. 4, s. 178–182.
- [11] Jochymski C., Lesiak A., Słowik-Rylska M., Kozłowski W., Sysa-Jędrzejowska A., Rogowski-Tylman M., Narbutt J., *Ekspresja białka Ki-67 i β-kateniny w powierzchniowej i guzkowej odmianie raka podstawnokomórkowego*, „Postępy Dermatologii i Alergologii” 2008, Vol. XXV, t. 6, s. 269–275.
- [12] Kołomecki K., *Hamowanie funkcji metaloproteinaz – możliwości zastosowania klinicznego*, „Onkologia Polska” 2000, t. 3, nr 3, s. 163–167.

- [13] Carmeli E., Moas M., Powers S.L., Powers S.K., *High Intensity Exercise Increases Expression of Matrix Metalloproteinases in Fast Skeletal Muscle Fibres*, The Physiological Society 2005.
- [14] Monhian N., Jewett BS., Baker SR, Varani J., *Matrix Metalloproteinase Expression in Normal Skin Associated With Basal Cell Carcinoma and in Distal Skin from the Same Patients*, „Archives of Facial Plastic Surgery” 2005, Vol. 7, s. 238–243.
- [15] Kurzepa J., Bartosik-Psujek H., Suchożebrska-Jesioneck D., Rejda K., Stryjecka-Zimmer M., Stelmasiak Z., *Rola metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w patogenezie stwardnienia rozsianego*, „Neurologia i Neurochirurgia Polska” 2005, Vol. 39, t. 1, s. 63–67.
- [16] Chicheł A., Skowronek J., *Współczesne leczenie raka skóry – dermatologia, chirurgia czy radioterapia?*, „Współczesna Onkologia” 2005, Vol. 9, t. 10, s. 429–435.
- [17] Daniel L., Leoniewski-Kmak K., *Leczenie długotrwale rozwijającego się raka podstawnkomórkowego skóry, niszczącego połowę twarzy – opis przypadku*, „Współczesna Onkologia” 2005, Vol. 9, t. 10, s. 440–442.
- [18] Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H.H., Burgdorf W.C.H., *Dermatologia*, t. 2, Berlin Heidelberg 1999–2000, red. naukowa wydania polskiego prof. dr hab. med. W. Gliński, prof. dr hab. med. H. Wolska, s. 1387–1396.
- [19] Jabłońska S., Najewski S., *Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005–2006, s. 15–28, s. 399–403.
- [20] Nejc D., Piekarski J., Pasz-Walczak G., Jezierski A., *Rak podstawnkomórkowy skóry – młody wiek chorych przyczyną wątpliwości diagnostycznych*, „Onkologia Polska” 2002, t. 5, nr 3–4, s. 179–181.
- [21] Sachdeva S., *Fitzpatrick Skin Typing: Applications in Dermatology*, „Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology” 2009, Vol. 75, Issue 1, s. 93–96.
- [22] Steven T., *Difficult to Diagnose Skin Cancer. The ‘Aggressive’ BCC*, „Australian Family Physician” 2009, Vol. 38, No. 7.
- [23] Kuczborska I., Batycka-Baran A., *Osobliwości epidemiologiczne i diagnostyczne najczęstszych chorób skóry u rasy czarnej*, „Postępy Dermatologii i Alergologii” 2010, Vol. XXVII, t. 1, s. 45–49.
- [24] Sobjanek M., Zabłotna M., Michajłowski I., Urban M., Nedoszytko B., Mędrzycka-Dąbrowska W., Włodarkiewicz A., Roszkiewicz J., *Polimorfizm genu śród-błonkowo-naczyniowego czynnika wzrostu a podatność na raka podstawnkomórkowego skóry – badanie pilotażowe*, „Postępy Dermatologii i Alergologii” 2009, Vol. XXVI, t. 2, s. 71.
- [25] Telfer N.R., Colver G.B., Morton C. A., *Guidelines for the Management of Basal Cell Carcinoma*, „British Journal of Dermatology” 2008, Vol. 159, s. 35–48.