

Received: 2009.10.20
Accepted: 2009.12.21
Published: 2010.02.01

Rola wybranych metaloproteinaz i ich inhibitorów w rozwoju raka jelita grubego

The role of selected matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer development

Magdalena Groblewska, Barbara Mroczko, Maciej Szmítkowski

Zakład Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Streszczenie

Rak jelita grubego jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych przewodu pokarmowego. Rozwój tego nowotworu jest procesem wieloetapowym, zajmującym kilkanaście lat – od małych ognisk dysplastycznych w nabłonku jelita, poprzez polipy gruczolowe aż do powstania raka *in situ*. W procesie karcynogenezy raka jelita grubego znaczącą rolę odgrywają metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) i ich tkankowe inhibitory (TIMPs). Jedną z metaloproteinaz o ważnym znaczeniu w rozwoju raka jelita grubego jest MMP-9, enzym degradujący kolagen błony podstawnej naczyń i macierzy zewnątrzkomórkowej, co ułatwia wzrost, migrację i inwazję komórek nowotworowych, powstawanie przerzutów odległych oraz angiogenezę w obrębie guza. Wykazano wzmożoną ekspresję MMP-9 w tkance tego nowotworu, korelującą ze stopniem zaawansowania choroby, większą inwazyjnością oraz krótszym czasem przeżycia chorych na raka jelita grubego.

Słowa kluczowe:

rak jelita grubego • gruczolak jelita grubego • metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej • tkankowe inhibitory metaloproteinaz

Summary

Colorectal cancer is one of the most common malignant tumors of the gastrointestinal tract. The development of this tumor is a complex, long-term, and multi-step process, from small dysplastic lesions of normal colorectal mucosa, through adenomatous polyps, to carcinoma *in situ*. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) play an important role in colorectal carcinogenesis. MMP-9 is able to degrade collagen IV from basement membranes and extracellular matrix, which is associated with tumor progression, including invasion, metastasis, growth, migration, and angiogenesis. It was demonstrated that increased expression of MMP-9 plays a crucial role in the development of several human malignancies, including colorectal cancer. Increased expression of MMP-9 correlated with tumor stage, invasiveness, and poor survival of colorectal cancer patients.

Key words:

colorectal cancer • colorectal adenoma • matrix metalloproteinases • tissue inhibitors of metalloproteinases

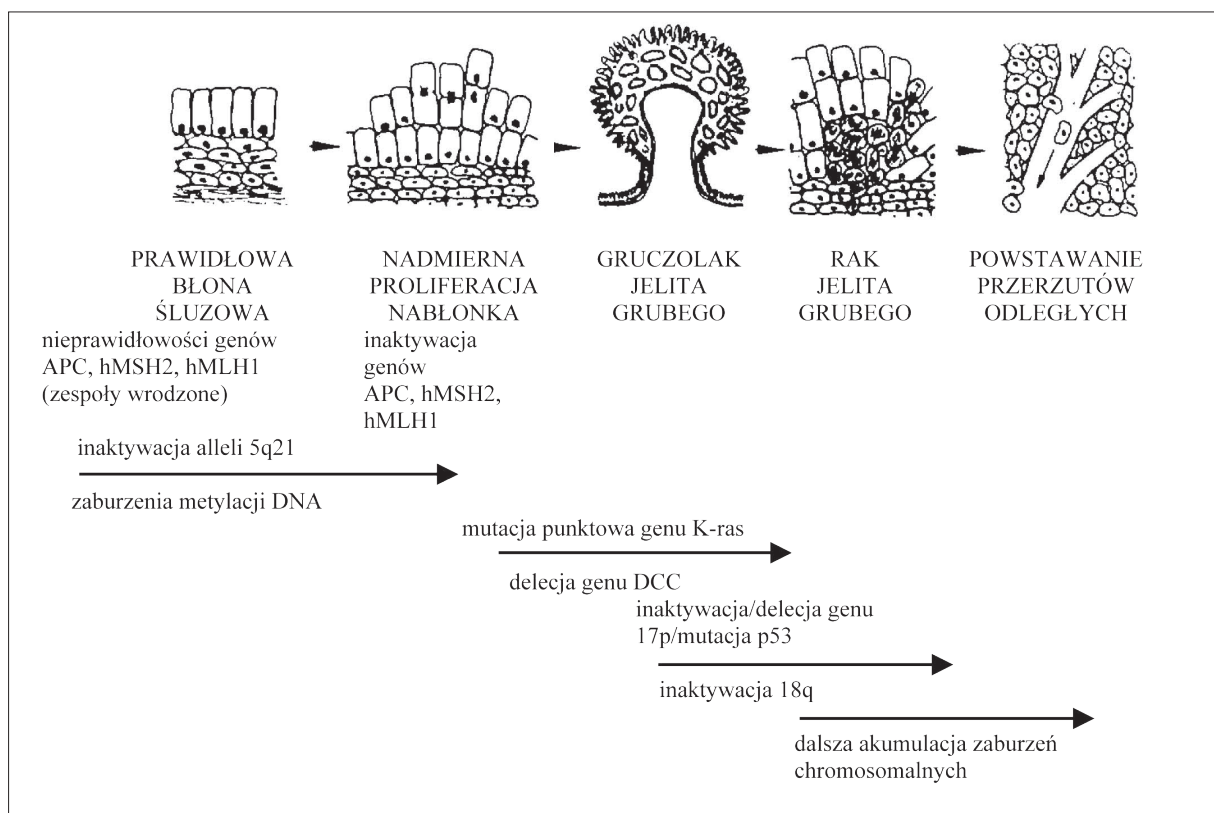
Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=903908>**Word count:** 3555**Tables:** 1**Figures:** 1**References:** 61**Adres autorki:** dr n. med. Magdalena Grobewska, Zakład Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, ul. Waszyngtona 15a, 15-269 Białystok; e-mail: bialka@umwb.edu.pl**RAK JELITA GRUBEGO**

Mimo ogromnego postępu, jaki się dokonał w medycynie w ostatnich dekadach, choroby nowotworowe wciąż pozostają główną przyczyną zgonów. Wśród nich wysoką pozycję zajmuje rak jelita grubego. Szacuje się, że jest on trzecią na świecie przyczyną zgonów na nowotwory, po raku płuc u obu płci oraz raku piersi u kobiet i raku gruczołu krokowego u mężczyzn [24]. W Polsce liczba nowych zachorowań zwiększa się o 2,5% rocznie i dochodzi do 30/100000 mieszkańców, a odsetek 5-letnich przeżyć wynosi zaledwie 25% [40]. Wśród kobiet przeważa rak okrężnicy, u mężczyzn częściej występuje rak odbytnicy. U obu płci umieralność jest większa z powodu raka odbytnicy [40].

Czas rozwoju tego nowotworu od powstania guza do wystąpienia klinicznie jawnych objawów wynosi od kilku do kilkudziesięciu lat. Występowaniu raka jelita grubego sprzyja niewłaściwa dieta, zawierająca nadmierne ilości węglowodanów, produktów wysokotłuszczowych i nitrozaminy oraz

zbyt małe spożycie surowych warzyw i owoców. Również niewielka aktywność fizyczna sprzyja zachorowaniom na ten nowotwór, m.in. z powodu skłonności do zaparć i przedłużonego kontaktu toksyn z błoną śluzową jelita grubego. Wpływ na powstawanie raków jelita grubego mają też czynniki genetyczne. Istnieje także rodzinna odmiana raka jelita grubego – wrodzony rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością (HNPCC – hereditary non-polyposus colorectal cancer).

Na podstawie badań genetycznych opracowano teorię „adenoma-carcinoma sequence”, wyjaśniającą procesy rozwoju nowotworu złośliwego z gruczolaka jelita [9]. Sekwencja zdarzeń zaczyna się od rozwoju małego ogniska dysplastycznego w nabłonku i stopniowego wzrostu tej zmiany do gruczolaka, który przez kolejne stopnie dysplazji nabiera cech charakteru inwazyjnego w postaci raka (ryc. 1). Potencjalną zdolność polipa do przemiany złośliwej można określić na podstawie oceny jego wielkości, typu makroskopowego, mikroskopowego i stopnia dysplazji.



Ryc. 1. Sekwencja zaburzeń genetycznych prowadzących do rozwoju raka jelita grubego

Dysplazja polega na zmianach cytologicznych i architektonicznych komórek nabłonkowych. W zależności od stopnia nasilenia nieprawidłowości komórkowych klasyfikowana jest jako lekka, średnia lub ciężka. Obecność dysplazji, uznawanej za zmianę przedrakową, jest powodem zaliczania gruczolaków do grupy polipów nowotworowych [23]. Zmiany polipowate w jelicie grubym najczęściej ulegają przemianom do nowotworu złośliwego, jeśli mają budowę histologiczną z przewagą elementów kosmkowych (*adenoma villosum* lub *adenoma villotubulare*), średnicę większą niż 2 cm i charakteryzującą się dysplazją dużego stopnia. Proces powstawania gruczolaka i jego dalszej transformacji w raka jest następstwem zmian ekspresji genów regulujących procesy proliferacji i różnicowania komórek. Zaburzenia dotyczą zarówno onkogenów, np. Ki-ras i c-myc, jak i genów supresorowych – APC, MCC, DCC oraz p53 [42]. W wyniku tych mutacji dochodzi do selekcji klonów komórkowych, u których brak jest prawidłowej kontroli cyklu komórkowego i różnicowania. Komórki te mają zdolność niekontrolowanego rozrostu i uniezależnienia się od mechanizmów regulacji apoptozy, czyli programowanej śmierci.

METALOPROTEINAZY MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ

Macierz zewnątrzkomórkowa (extracellular matrix – ECM) jest dynamiczną strukturą złożoną z różnych makrocząstek, np. kolagenu, fibronektyny, lamininy czy też proteoglikanów tkanki łącznej, które regulują funkcje komórek poprzez wytworzenie dla nich swoistego mikrośrodowiska. Przemiany macierzy pozakomórkowej są integralną częścią rozmaitych fizjologicznych i patologicznych procesów, takich jak rozwój i formowanie tkanek, procesy rozrostu i różnicowania komórek, a także naciekanie i tworzenie przerzutów nowotworu [52,54]. Składniki macierzy zewnątrzkomórkowej są trawione przez różne enzymy proteolityczne, w tym przez metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs). Są one grupą proteaz wielodomenowych, których aktywność enzymatyczna jest uzależniona od obecności jonów cynkowych w centrum katalitycznym cząsteczki. MMPs są aktywne w lekko zasadowym lub obojętnym pH, w obecności jonów wapnia [39,55]. Enzymy te są zaliczane do endopeptydaz. Pierwszą poznaną i opisaną metaloproteinazą była MMP-1 u kijańka. Dotąd zidentyfikowano 28 metaloproteinaz, z których 22 występują u człowieka. Wszystkie te enzymy charakteryzują się znacznym podobieństwem budowy, zawierają propeptyd zbudowany z około 80 aminokwasów (i wchodzący w jego strukturę peptyd sygnałowy, kierujący je do miejsca docelowego) oraz domenę katalityczną, składającą się z około 170 aminokwasów. O przynależności enzymu do nadrodziny MMPs decyduje homologia z konserwatywnymi sekwencjami aminokwasów obecnymi w MMP-1, zwłaszcza z sekwencją HEXXHXXGXXH w miejscu aktywnym. W zależności od swoistości substratowej i budowy cząsteczki metaloproteinazy dzieli się na pięć zasadniczych podgrup: matrylizyny, kolagenazy, stromelizyny, żelatynazy i metaloproteinazy błonowe (membrane-type metalloproteinases – MT-MMP). Szóstą grupę stanowią MMPs niezaliczane do żadnej z poprzednich (tabela 1).

Aktywność MMPs w warunkach fizjologicznych jest kontrolowana na kilku poziomach. Ich wydzielanie może być regulowane na etapie transkrypcji przez czynniki wzrostu,

cytokiny, hormony, interakcje międzykomórkowe i komórek z macierzą zewnątrzkomórkową, a także przez różne czynniki fizyczne, np. promieniowanie ultrafioletowe [3]. O aktywności tych enzymów decydują też procesy translacji i aktywacji proenzymów pod wpływem enzymów proteolitycznych, jonów metali, plazminy, oksydantów. MMPs są wydzielane w postaci pre-proenzymów (postać nieaktywna) i uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jako nieaktywne proenzymy (proMMPs). Wyjątkiem są MT-MMPs – enzymy błonowe pozostające na powierzchni komórki. Znajdujący się w centrum aktywnym proenzymu jon cynkowy jest zablokowany wiązaniem koordynacyjnym przez cysteinę N-terminalnej części łańcucha białkowego, dzięki czemu metaloproteinazy są utrzymywane we wszystkich tkankach w postaci latentnej [8,39].

Aktywacja MMPs następuje przez odszczepienie cysteiny z fragmentu enzymu związanego z atomem cynku. Dochodzi do zmiany konformacji cząsteczki, odłączenia fragmentu N-terminalnego, w wyniku czego zostaje odsłonięte miejsce aktywne z atomem cynku i powstaje enzym o masie cząsteczkowej mniejszej o około 10 kDa od postaci nieaktywnej [27,39]. Proces aktywacji metaloproteinaz może także zachodzić z udziałem innych aktywnych MMPs lub proteaz serynowych (plazmina, kalikreina, trypsyna) oraz metaloproteinaz błonowych.

Regulacja aktywności MMPs odbywa się nie tylko poprzez mechanizmy ich aktywacji, ale także w procesach hamowania tych enzymów, na przykład przez blokowanie genów odpowiadających za syntezę MMPs lub zahamowanie przez inhibitory proteaz. Nieswoistymi inhibitorami metaloproteinaz są α_2 -makroglobulina i α_1 -antyproteaza, inhibitory proteaz odpowiadające głównie za regulację aktywności MMPs w osoczu. α_2 -makroglobulina ze względu na swoją dużą masę cząsteczkową (750 kDa) ma obniżoną zdolność przechodzenia przez łożysko naczyniowe i hamowania aktywności metaloproteinaz poza kompartmentem naczyniowym [8,55]. Naturalnymi, swoistymi inhibitorami MMPs są białka należące do grupy tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (tissue inhibitors of metalloproteinases – TIMPs), wpływające na aktywność MMPs w tkankach.

TKANKOWE INHIBITORY METALOPROTEINAZ TIMPs

Tkankowe inhibitory metaloproteinaz są białkami o masie cząsteczkowej 21-29 kDa [28,38]. U kręgowców odkryto do tej pory 4 białka z tej rodziny: TIMP-1, -2, -3 i -4, o odmiennym stopniu ekspresji u różnych gatunków. Wszystkie te białka charakteryzują się znacznym podobieństwem struktury. Zbudowane są z dwóch domen – N-końcowej, składającej się ze 125 aminokwasów i wiążącej z centrum aktywnym MMPs oraz domeny C-końcowej, wpływającej na połączenie TIMP z fragmentem podobnym do hemopexyny metaloproteinaz, zbudowanej z około 65 aminokwasów [36]. Wydzielanie TIMPs jest regulowane przez cytokiny i czynniki wzrostu [4].

Mimo podobieństwa swojej budowy, tkankowe inhibitory metaloproteinaz różnią się pod innymi względami. Na przykład TIMP-1, TIMP-2 i TIMP-4 występują w postaci rozpuszczalnej, a TIMP-3 w postaci związanej z macierzą. Ekspresja TIMP-4 różni się od pozostałych inhibitorów umiejscowieniem w tkankach – mRNA dla TIMP-4

Tabela 1. Podział i funkcje metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej

Grupa/cechy charakterystyczne	Numer	Nazwa zwyczajowa	Substraty
Matrylizyny			
Najmniejsze cząsteczki, brak domeny hemopeksyny	MMP-7	matrylizyna, metaloendopeptydaza	kolagen typ IV, glikoproteiny, żelatyna
Kolagenazy			
Zawierają domenę hemopeksyny i giętki łącznik, który wiąże ją z domeną katalityczną	MMP-1	kolagenaza śródmiaższowa (1)	kolagen typu I, II, III, V, VII, VIII, X, żelatyna, IL-1β, MMP-2, MMP-9, fibronektyna
	MMP-8	kolagenaza neutrofilowa (2)	
	MMP-13	kolagenaza 3	
Stromelizyny			
Proteinazy podścieliska	MMP-3	stromelizyna 1, proteoglikanaza	proteoglikany, fibronektyna, laminina, elastyna, żelatyna, witronektyna, plazminogen, fibrynogen, fibryna, kolagen typu III, IV, V, antytrombina III, MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13
	MMP-10	stromelizyna 2	
	MMP-11	stromelizyna 3	
	MMP-18	kolagenaza 4	
Żelatynazy			
W domenie katalitycznej obecny motyw złożony z trzech modułów typu II fibronektyny duża swoistość substratowa względem zdenaturowanego kolagenu i żelatyny, dzięki insertowi fibronektyny, wiążącemu się z żelatyną i z lamininą	MMP-2	żelatynaza A (72 KDa)	kolagen typ I, IV, V, VII, X, żelatyna, elastyna, laminina
	MMP-9	żelatynaza B (92 KDa)	
Błonowe MMPs			
Grupa I: makrocząsteczki należące do typu I białek błonowych. Są to MMP-14,-15,-16 i -24. Grupa II: MMP-17 i -25 – białka połączone z glikofosfatydyloinozytolem.	MMP-14	MT1-MMP	kolagen typ I, II, III, żelatyna, laminina, fibronektyna, fibryna, proMMP-2,-13
	MMP-15	MT2-MMP	
	MMP-16	MT3-MMP	
	MMP-17	MT4-MMP	
	MMP-24	MT5-MMP	
	MMP-25	MT6-MMP	
Inne MMPs			
MMPs nieprzypisane do żadnej z powyższych grup	MMP-11	stromelizyna	amelagenina, agrekany, elastyna
	MMP-12	metaloelastaza makrofagowa	
	MMP-19	–	
	MMP-20	enamelizyna	
	MMP-23	–	
	MMP-28	epilizyna	

występuje głównie w mózgu, sercu, jajnikach i mięśniach szkieletowych, co sugeruje, że to białko odgrywa istotną rolę w procesach rozwoju tkanek [11,29]. Poszczególne inhibitory różnią się także swoim powinowactwem do metaloproteinaz.

Podstawową rolą TIMPs, wykazaną zarówno w warunkach *in vivo* jak *in vitro*, jest hamowanie proteolitycznej aktywności metaloproteinaz. Mechanizm hamowania aktywności

metaloproteinaz przez TIMPs polega na uniemożliwieniu odsłonięcia ich centrum aktywnego przez zablokowanie odłączania N-końcowego fragmentu cząsteczki enzymu [2,55]. TIMPs hamują wszystkie poznane metaloproteinazy, przy czym są one zdolne do wiązania się nie tylko z MMPs, ale także z proenzymami (proMMPs) – dzięki temu mogą regulować także proces ich aktywacji [28]. Wyjątkiem jest TIMP-1, który nie ma właściwości blokowania aktywności metaloproteinaz błonowych. Inhibitor

ten w sposób wybiórczy wiąże się z proMMP-9 [53]. Głównymi inhibitorami wiążącymi się ze wszystkimi rodzajami MMPs są TIMP-2 i -3. W tkankach najbardziej rozpowszechnione są TIMP-1 i TIMP-2 [28].

Tkankowe inhibitory metaloproteinaz, oprócz hamowania aktywności MMPs, wykazują także inne właściwości biologiczne, m.in. regulują wzrost i proliferację wielu typów komórek. TIMP-1 pobudza rozrost różnych komórek prawidłowych, w tym komórek prekursorowych linii erytroidalnej, keratynocytów, chondrocytów, fibroblastów, komórek śródbłonna naczyń, a w stanach patologicznych – rozrost fibroblastów w przebiegu twardziny, a także komórek nowotworów wątroby, piersi, mięsaków kości i innych nowotworów złośliwych [32,51,57]. Z kolei TIMP-2 bierze udział w procesach proliferacji komórek mięsaków i włókniaków kości, a także fibroblastów w różnych tkankach [14,51]. Stwierdzono, że zdolność TIMPs do promowania rozrostu komórek jest niezależna od inhibicji MMPs [14].

Wykazano również hamujący wpływ TIMP-1 i TIMP-2 na procesy apoptozy komórek [6], zarówno przez hamowanie aktywności metaloproteinaz, jak i innym sposobem. Degradacja składników macierzy zewnątrzkomórkowej powoduje indukcję efektorów cząsteczkowych apoptozy, tj. kaspaz, co prowadzi do utraty zdolności do różnicowania i apoptotycznej śmierci komórek, zarówno w warunkach *in vivo* jak *in vitro* [5]. TIMP-1 może działać antyapoptotycznie przez zahamowanie aktywności metaloproteinaz, co stabilizuje ECM oraz interakcje między komórkami i z macierzą zewnątrzkomórkową [35]. TIMP-1 wpływa na apoptozę niezależnie od MMP, co wykazano w badaniach nad komórkami chłoniaka Burkitta. Z badań tych wynika, że ekspresja TIMP-1 była sprzężona z opornością komórek na apoptozę, a dodanie rekombinowanego TIMP-1 do hodowli powodowało zahamowanie programowanej śmierci komórek [35]. Z kolei TIMP-3 wykazuje właściwości proapoptotyczne, prawdopodobnie dzięki stabilizacji receptora komórkowego TNF α i Fas [12].

ROLA MMP-9 I TIMP-1 W RAKU JELITA GRUBEGO

Chociaż proces degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) jest obserwowany w wielu stanach fizjologicznych wykazano, że odgrywa on również ważną rolę w rozwoju nowotworów złośliwych, będąc jednym z istotnych elementów proliferacji nowotworu. Wykazano, że komórki raka jelita grubego mają zdolność syntezy metaloproteinaz, w tym MMP-9, enzymu proteolitycznego zdolnego do trawienia kolagenu typu IV – głównego składnika błony podstawnej. Degradacja kolagenu typu IV przez MMP-9 jest stwierdzana zarówno w procesach naciekania, jak i tworzenia przerzutów [37]. Uważa się, że niszczenie błony podstawnej jest głównym etapem we wzroście inwazyjnym i tworzeniu przerzutów. Zeng i wsp. badali zależność między aktywnością MMP-9 i MMP-2 a ekspresją kolagenu typu IV w rozwoju raka jelita grubego. Wykazano obecność kolagenu typu IV w warstwie podstawnej prawidłowej błony śluzowej jelita, w gruczolakach i w raku *in situ*. W żadnym z przypadków raka z przerzutami odległymi nie stwierdzono obecności tego białka, zaś w grupie chorych bez przerzutów nowotworu – u 77%. Przy jednoczesnym barwieniu na obecność kolagenu i MMP-9 stwierdzono ekspresję tego enzymu w obszarach o niewielkiej

zawartości kolagenu IV, natomiast największą ekspresję kolagenu IV – w obszarach pozbawionych MMP-9. Średnia aktywność MMP-2 i MMP-9 w guzie była też kilkakrotnie większa w porównaniu z aktywnością obu enzymów w prawidłowej błonie śluzowej jelita [61].

W pracy Wu i wsp. [56] oceniano poziom ekspresji MMP-2, MMP-9 i kolagenu typu IV za pomocą barwień immunohistochemicznych w próbkach prawidłowej tkanki jelita i tkanek raka jelita u chorych ze stopniem zaawansowania klinicznego C lub D. W tkance prawidłowej ekspresja kolagenu IV była znamiennej wyższa niż w nowotworowej, natomiast nie stwierdzono w niej obecności obu MMPs. W tkankach raka jelita grubego ekspresja MMP-2 i MMP-9 była znamiennej wyższa, a także wykazano ujemną korelację między ekspresją kolagenu i MMP-9 [56].

Lubbe i wsp. oceniali obecność MMP-9 w hodowli *in vitro* komórek linii raka jelita grubego oraz w tkankach tego nowotworu. Nadmierną ekspresję tego enzymu stwierdzono zarówno w komórkach zrębu guza, jak i w komórkach nowotworowych w guzie pierwotnym w porównaniu z prawidłową błoną śluzową jelita pobraną od tych samych pacjentów. W hodowli komórek nowotworowych wykazano też, że w warunkach *in vitro* MMP-9 reguluje cechy związane ze zdolnością komórek do przerzutowania, m.in. przez degradowanie macierzy zewnątrzkomórkowej i wpływ na tworzenie organelli odpowiedzialnych za ruch komórek [31].

Przeprowadzono także ocenę korelacji między ekspresją MMP-9 w tkance guza a cechami kliniczno-patologicznymi nowotworu i znaczenia prognostycznego oznaczania tego enzymu u chorych na raka odbytnicy. W 70% badanych próbek stwierdzono obecność MMP-9, przy czym odsetek ten wzrastał z liczbą zajętych węzłów chłonnych, stopniem zaawansowania nowotworu oraz zróżnicowaniem histologicznym guza. Ponadto dodatnia ekspresja MMP-9 w tkance guza była istotnym czynnikiem prognostycznym przeżycia chorych i pojawienia się wznowy [47]. Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie różnic w aktywności MMP-2 i MMP-9 oraz TIMP-1 i TIMP-2 w zależności od umiejscowienia guza w okrężnicy czy odbytnicy. W obu lokalizacjach stężenie MMP-2, -9 i TIMP-1 w tkance guza było wyższe niż w prawidłowej błonie śluzowej od tego samego pacjenta, a TIMP-2 – znamiennej niższe [26].

Wykazano, że podwyższona ekspresja tego enzymu w komórkach raka jelita grubego wiązała się ze zwiększoną agresywnością guza i skłonnością do naciekania [26]. W badaniach Unsal i wsp. [48] wykazano zależność między ekspresją MMP-9 w guzie pierwotnym a odpowiedzią na chemioterapię u pacjentów z rakiem odbytnicy. Ekspresję MMP-9 wykazano w 45% guzów i zależała ona od zajęcia węzłów oraz odpowiedzi klinicznej na zastosowane leczenie. Całkowitą remisję stwierdzono tylko u 25% leczonych chorych z dodatnią ekspresją MMP-9 i 52% u chorych, u których nie wykazano obecności tego enzymu w tkance nowotworu; różnica ta była istotna statystycznie [48].

Badano również zależności między ekspresją MMP-9 w głównej masie guza i w zajętych węzłach chłonnych a inwazyjnością wzrostu nowotworu i zajęciem naczyń krwionośnych. Ekspresja tego enzymu była dodatnia w ponad

50% guzów pierwotnych. Wykazano też istotną korelację między zajęciem węzłów chłonnych a ekspresją MMP-9 (zarówno w guzie pierwotnym, jak i w komórkach przechodzących poza granicę guza). Wzrost inwazyjny jest wykładnikiem agresywności nowotworu, co wskazuje na zależność między ekspresją MMP-9 i agresywnością wzrostu nowotworowego [13].

W przypadku przerzutów raka jelita grubego do wątroby zwiększona ekspresja MMP-9 i TIMP-1, a także CEA była związana ze skróceniem czasu od rozpoznania nowotworu do pojawienia się przerzutów, co potwierdza znaczenie prognostyczne oznaczania obecności tych białek dla przeżycia chorych [44].

W preparatach z raka jelita grubego ekspresja MMP-9 jest obserwowana głównie w makrofagach na obrzeżu guza, co wskazuje na indukcję wytwarzania enzymu w tych komórkach i bezpośredni związek z naciekaniem przez komórki raka. W pracy Illemanna i wsp. porównano ekspresję mRNA dla MMP-9 i immunoreaktywność MMP-9 w guzie pierwotnym i przerzutach oraz w węzłach chłonnych od tych samych pacjentów [20]. We wszystkich preparatach z guza pierwotnego ekspresja mRNA była umiejscowiona w części brzeżnej guza. W guzach przerzutowych do wątroby ekspresję MMP-9 oraz mRNA tego enzymu stwierdzono w części brzeżnej guza tylko w 20% próbek. Była ona ograniczona do małych skupisk makrofagów między limfocytami oraz do światła struktur gruczołowych i do tkanki martwiczej. We wszystkich zajętych węzłach ekspresja mRNA i immunoreaktywnej MMP-9 była obecna w makrofagach także na obrzeżu zmian nowotworowych. Dane te wskazują, że w przerzutach do wątroby nie ma takiego pobudzenia MMP-9 w makrofagach, jak w guzie pierwotnym i w węzłach, co może wskazywać, że rozсіяne komórki nowotworu mogą wykorzystywać także alternatywne mechanizmy proteolizy zależne od lokalnego mikrośrodowiska [20].

Podwyższone stężenia MMP-9 w osoczu lub surowicy obserwowano nie tylko u chorych na raka jelita grubego [19], ale także na inne nowotwory – rak żołądka [46], płuc [58] i piersi [25]. Wyższa aktywność enzymatyczna MMP-9 bądź podwyższone stężenia tego enzymu były wykrywane u chorych w zaawansowanym stadium rozwoju nowotworu. Zwiększoną ekspresję TIMP-1 obserwowano w raku jelita [17] i piersi [33]. Podwyższone stężenia tego białka w surowicy stwierdzano u chorych z przerzutami nowotworowymi [30] i były one niekorzystnym czynnikiem prognostycznym przeżycia chorych na raka płuc [58], piersi [25] oraz jelita grubego [18]. Stężenia MMP-9 i TIMP-1 były znamienne wyższe u chorych na raka jelita grubego w porównaniu z grupą osób zdrowych [41] i wykazywały zależność od stopnia zaawansowania nowotworu [21,41]. W wielu badaniach dotyczących stężeń TIMP-1 u chorych na raka jelita grubego wykazano, że mogą one być czynnikiem prognostycznym przeżycia pacjentów [50,59,60]. Podwyższona aktywność enzymatyczna i ekspresja tkankowa MMP-9 i TIMP-1 mogą być wskaźnikami inwazyjności nowotworu i powstawania przerzutów odległych.

Tkankowe inhibitory metaloproteinaz mogą regulować aktywność proteolityczną MMPs. Inhibitorem MMP-9 jest TIMP-1, wiążący się z enzymem w stosunku

stechiometrycznym 1: 1. Zwykle ekspresja TIMP-1 koreluje ze zwiększoną ekspresją MMP-9, chociaż w wyniku wzajemnych interakcji między tymi białkami, bądź w procesach niezależnych od nich, może dochodzić do miejscowego zaburzenia równowagi między aktywnością MMP-9 a stężeniem TIMP-1 [28]. Stwierdzono, że brak równowagi między MMPs a ich inhibitorami jest ważnym czynnikiem w rozwoju nowotworów złośliwych przewodu pokarmowego [49]. Islekel i wsp. ocenili zależność stężeń MMP-9 i TIMP-1 w raku jelita od cech kliniczno-patologicznych nowotworu. Metodą zymografii badano aktywność pro-MMP-9 i aktywnej postaci enzymu w tkance nowotworowej oraz w prawidłowej błonie śluzowej jelita pobranej z miejsca odległego, a metodą ELISA stężenia MMP-9 i TIMP-1 w tkance nowotworowej. Stężenia i/lub aktywność wszystkich badanych białek były większe w tkance nowotworowej niż prawidłowej. Również stosunek aktywności MMP-9 do pro-MMP-9 i współczynnik stężeń MMP-9/TIMP-1 w tkankach były znamienne wyższe w nowotworze w porównaniu z prawidłową błoną śluzową. Wykazano znamienne korelację między stężeniem MMP-9 i nacieczeniem nerwów, a także między stężeniem TIMP-1 i zróżnicowaniem histologicznym guza oraz między wartością współczynnika MMP-9/TIMP-1 i rozpoznaniem histologicznym nowotworu. Stąd też analiza przydatności klinicznej TIMP-1 w raku jelita grubego powinna być przeprowadzana w odniesieniu do MMP-9 [22].

Wyniki Murashige i wsp. sugerują, że ekspresja TIMP-1 i -2 jest związana z progresją raka jelita grubego. Autorzy ci wykazali, że ekspresja mRNA dla TIMP-1 była znamienne wyższa w preparatach z guza pierwotnego niż w prawidłowej błonie śluzowej jelita, pobranej z otoczenia guza, zaś mRNA dla TIMP-1 i TIMP-2 – wyższe w zmianach przerzutowych w wątrobie niż w prawidłowej błonie jelita. Wyższa ekspresja mRNA dla TIMP-1 dodatnio korelowała z zajęciem węzłów chłonnych, a mRNA dla TIMP-1 i TIMP-2 ze stopniem zaawansowania wg Dukesa [34].

Badania ekspresji TIMP-1 oraz MMP-2 i -9 w próbkach raka jelita grubego wykazały, że w tkance guza MMP-2 była umiejscowiona w macierzy pozakomórkowej, a także w komórkach podobnych do fibroblastów w naciekach okołoguzowych, ale nieobecna w komórkach nowotworowych. Ekspresja MMP-9 była ograniczona do granulocytów wielojądrowych, zaś TIMP-1 obecny w ECM guza tylko w 8% próbek. W prawidłowej błonie śluzowej nie wykryto ekspresji TIMP-1 ani żadnego z omawianych enzymów. Wyniki te wskazują, że elementy podścieliska raka jelita grubego mogą modulować rozwój nowotworu, będącym źródłem MMPs i TIMPs [10].

ROLA MMP-9 I TIMP-1 W POWSTAWANIU POLIPÓW GRUCZOŁOWYCH JELITA GRUBEGO I ICH TRANSFORMACJI ZŁOŚLIWEJ

Wykazano, że metaloproteinazy mogą uczestniczyć w powstawaniu raka jelita grubego na różnych etapach rozwoju tego nowotworu, poczynając od gruczolaków. Heslin i wsp. badali metodą qRT-PCR koekspresję genów różnych metaloproteinaz: MMP-2, MMP-7 oraz MMP-9 w tkance prawidłowej, gruczolakach i raku jelita [16]. Ekspresja genu MMP-7 była 43 razy większa w gruczolakach niż w prawidłowej błonie śluzowej, a także 50-krotnie wyższa w tkance nowotworowej w porównaniu z prawidłową

błoną śluzową jelita. Nie znaleziono jednak różnic znamiennych między ekspresją genu tego enzymu w tkankach gruczolaka i raka jelita grubego. Z kolei ekspresja genów MMP-9 i -2 nie różniła się między gruczolakami a prawidłową tkanką, ale była podwyższona około 2-krotnie w raku. Badacze nie wykazali również korelacji ekspresji genów dla żadnej z analizowanych metaloproteinaz z wielkością polipa, stopniem dysplazji w gruczolakach oraz stopniem zaawansowania nowotworu [16].

Sinnamonn i wsp. [43] badali ekspresję metaloproteinaz w gruczolakach jelita u myszy ze zmutowanym genem APC. Ten szczep myszy jest zwykle używany jako zwierzęcy model wczesnej karcynogenezy raka jelita grubego. U tych myszy nie występowały także geny MMP-2, -9, -12 lub MMP-19. Wykazano, że częstotliwość występowania raka jelita grubego u myszy pozbawionych genu MMP-9 była o 40% mniejsza niż w grupie kontrolnej zdrowych zwierząt, chociaż nie wykryto wpływu braku tego enzymu na wielkość guza, natomiast inne MMPs nie miały znaczenia dla rozwoju guzów jelita. U myszy pozbawionych genu MMP-9 stwierdzono też o 50% mniej komórek proliferujących, ale bez istotnego wpływu na apoptozę, przy czym w barwieniach immunohistochemicznych wykazano, że MMP-9 w tych guzach pochodziła głównie z leukocytów.

Oceniano również nasilenie ekspresji MMP-9 w zależności od etapu sekwencji rozwoju od gruczolaka do raka *adenoma carcinoma*: w gruczolakach jelita grubego, w raku jelita grubego oraz w prawidłowej tkance jelita, przy czym materiał pochodził od różnych pacjentów. Średnia ekspresja tego enzymu była znamienne wyższa w materiale z raka niż gruczolaków o dużej dysplazji (HGD – high grade dysplasia). Wykazano również, że w gruczolakach HGD ekspresja MMP-9 była znamienne wyższa niż w tych o niskim stopniu dysplazji (LGD – low grade dysplasia). Nie stwierdzono natomiast różnic statystycznych w ekspresji MMP-9 między grupą LGD a kontrolną [7]. Przeprowadzono również porównanie poziomu ekspresji MMP-9 w tkance zmienionej nowotworowo i prawidłowej błonie śluzowej pobranej od tego samego pacjenta. Wykazano, że ekspresja MMP-9 w materiale z raka jelita grubego była wyższa znamienne niż w polipach i prawidłowej błonie śluzowej, a w polipach o wysokim stopniu dysplazji wyższa niż w pozostałych typach gruczolaków i w prawidłowej śluzówce jelita [15].

Z kolei w pracy Tomity i wsp. [45] oceniano metodą immunohistochemiczną ekspresję MMP-2 i MMP-9 oraz

TIMP-1 i TIMP-2 w polipach hiperplastycznych, gruczolakach cewkowych, cewkowo-kosmkowych, kosmkowych i w gruczolakorakach. Ekspresję o typie rozszanym tych białek stwierdzano głównie w komórkach zębów, natomiast w komórkach nabłonkowych prawidłowej błony śluzowej i w polipach hiperplastycznych była niska. Poziom ekspresji badanych MMPs i TIMPs stopniowo wzrastał w gruczolakach cewkowych i kosmkowych, a w raku *in situ* wykazano wyraźną ekspresję, co odzwierciedla udział tych białek w wieloetapowym procesie karcynogenezy raka jelita grubego. Nie tylko ekspresja MMPs oceniana metodami immunohistochemicznymi, ale również aktywność tych enzymów, badana metodą zymografii, była większa w tkance nowotworowej niż w prawidłowej błonie śluzowej jelita [1]. Baker i wsp. wykazali, że aktywność MMP-9 i MMP-2 wzrastała również w zależności od stopnia zaawansowania wg Duke'a i od zajęcia węzłów chłonnych [1].

PODSUMOWANIE

Rak jelita grubego jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych przewodu pokarmowego. Rozwój tego nowotworu jest procesem wieloetapowym, zajmującym kilkanaście lat – od małych ognisk dysplastycznych w nabłonku jelita, poprzez polipy gruczolowe aż do powstania raka *in situ*. W procesie karcynogenezy raka jelita grubego znaczącą rolę odgrywają między innymi metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) i ich tkankowe inhibitory (TIMPs). Jedną z metaloproteinaz o ważnym znaczeniu w rozwoju raka jelita grubego jest MMP-9, enzym degradujący kolagen błony podstawnej naczyń i macierzy zewnątrzkomórkowej, stymulujący wzrost, migrację i inwazję komórek nowotworowych, powstawanie przerzutów odległych oraz angiogenezę w obrębie guza. Wykazano wzmogłą ekspresję MMP-9 w tkance tego nowotworu, korelującą ze stopniem zaawansowania choroby, większą inwazyjnością oraz krótszym czasem przeżycia chorych na raka jelita grubego.

Zaburzenie równowagi między poziomem metaloproteinaz a ich inhibitorami jest związane z rozwojem wielu typów nowotworów. Naturalny inhibitor MMP-9 – TIMP-1 może być niekorzystnym czynnikiem rokowniczym przeżycia chorych na raka jelita grubego. Nasiloną ekspresją MMP-9 i TIMP-1 w tkankach oraz podwyższoną ich aktywność we krwi chorych na raka jelita grubego wskazuje prawdopodobnie na znaczenie tych białek jako markerów inwazyjności i ryzyka tworzenia się przerzutów odległych, zwłaszcza do wątroby.

PIŚMIENICTWO

- [1] Baker E.A., Leaper D.J.: Measuring gelatinase activity in colorectal cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 2002; 28: 24–29
- [2] Blavier L., Henriot P., Imren S., Declercq Y.A.: Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1999; 878: 108–119
- [3] Bogaczewicz J., Chodorowska G., Krasowska D.: Rola metaloproteinaz macierzy i tkankowych inhibitorów metaloproteinaz w układzie odpornościowym skóry. *Przegl. Dermatol.*, 2005; 92: 139–149
- [4] Bogaczewicz J., Dudek W., Wroński J., Chodorowska G., Przywara S., Krasowska D., Zubilewicz T.: Rola metaloproteinaz macierzy w powstawaniu owrzodzeń żylnych goleni. *Pol. Merk. Lek.*, 2005; 19: 686–692
- [5] Boudreau N., Sympton C.J., Werb Z., Bissell M.J.: Suppression of ice and apoptosis in mammary epithelial-cells by extracellular-matrix. *Science*, 1995; 267: 891–893
- [6] Cawston T.E., Mercer E.: Preferential binding of collagenase to $\alpha 2$ -macroglobulin in the presence of the tissue inhibitor of metalloproteinases. *FEBS Lett.*, 1986; 209: 9–12
- [7] Daniel P., Wagrowska-Danilewicz M., Danilewicz M., Stasikowska O., Malecka-Panas E.: Transforming growth factor beta 1 and metalloproteinase-9 overexpression in colorectal cancer (CC) and adenoma. *Int. J. Colorectal. Dis.*, 2007; 22: 1165–1172
- [8] Egeblad M., Werb Z.: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 161–174
- [9] Fearon E.R., Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990; 61: 759–767
- [10] Gallegos N.C., Smales C., Savage F.J., Hembry R.M., Boulous P.B.: The distribution of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in colorectal cancer. *Surg. Oncol.*, 1995; 4: 21–29

- [11] Greene J., Wang M., Liu Y.E., Raymond L.A., Rosen C., Shi Y.E.: Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 30375–30380
- [12] Guede L., Courtenmanch L., Stetler-Stevenson M.: Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood*, 1998; 92: 1342–1349
- [13] Guzińska-Ustymowicz K.: MMP-9 and cathepsin B expression in tumor budding as an indicator of a more aggressive phenotype of colorectal cancer (CRC). *Anticancer Res.*, 2006; 26: 1589–1594
- [14] Hayakawa T., Yamashita K., Ohuchi E., Shinagawa A.: Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J. Cell. Sci.*, 1994; 107: 2373–2379
- [15] Herszényi L., Sipos F., Galamb O., Solymosi N., Hritz I., Miheller P., Berci L., Molnár B., Tulassay Z.: Matrix metalloproteinase-9 expression in the normal mucosa-adenoma-dysplasia-adenocarcinoma sequence of the colon. *Pathol. Oncol. Res.*, 2008; 14: 31–37
- [16] Heslin M.J., Yan J., Johnson M.R., Weiss H., Diasio R.B., Urist M.M.: Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Ann. Surg.*, 2001; 233: 786–792
- [17] Hewitt R.E., Brown K.E., Corcoran M., Stetler-Stevenson W.G.: Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1) in a more tumorigenic colon cancer cell line. *J. Pathol.*, 2000; 192: 455–459
- [18] Holten-Andersen M.N., Stephens R.W., Nielsen H.J., Murphy G., Christensen I.J., Stetler-Stevenson W., Brünner N.: High preoperative plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels are associated with short survival of patients with colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 4292–4299
- [19] Hurst N.G., Stocken D.D., Wilson S., Keh C., Wakelam M.J., Ismail T.: Elevated serum matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) concentration predicts the presence of colorectal neoplasia in symptomatic patients. *Br. J. Cancer*, 2007; 97: 971–977
- [20] Illemann M., Bird N., Majeed A., Sehested M., Laerum O.D., Lund L.R., Danø K., Nielsen B.S.: MMP-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases. *Mol. Cancer Res.*, 2006; 4: 293–302
- [21] Ishida H., Murata N., Hayashi Y., Tada M., Hashimoto D.: Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in colorectal cancer patients. *Surg. Today*, 2003; 33: 885–892
- [22] İşlek H., Oktay G., Terzi C., Canda A.E., Füzün M., Küpelioglu A.: Matrix metalloproteinase-9, -3 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables. *Cell. Biochem. Funct.*, 2007; 25: 433–441
- [23] Jass J.R., Sobin L.H.: WHO international histological classification of tumors. histological typing of intestinal tumors. New York, Springer-Verlag 1989
- [24] Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Thun M.J.: Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.*, 2009; 59: 225–249
- [25] Jinga D.C., Blidaru A., Condrea I., Ardeleanu C., Dragomir C., Szegli G., Stefanescu M., Matache C.: MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J. Cell. Mol. Med.*, 2006; 10: 499–510
- [26] Kim T.D., Song K.S., Li G., Choi H., Park H.D., Lim K., Hwang B.D., Yoon W.H.: Activity and expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinases in human colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2006; 6: 211
- [27] Kolomecki K.: Hamowanie funkcji metaloproteinaz – możliwości zastosowania klinicznego. *Onkol. Pol.*, 2000; 3: 163–167
- [28] Lambert E., Dasse E., Haye B., Petitfrere E.: TIMPs as multifacial proteins. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2004; 49: 187–198
- [29] Leco K.J., Apte S.S., Taniguchi G.T., Hawkes S.P., Khokha R., Schultz G.A., Edwards D.R.: Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS Lett.*, 1997; 401: 213–217
- [30] Lein M., Nowak L., Jung K., Laube C., Ulbricht N., Schnorr D., Loening S.A.: Metalloproteinases: and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in plasma of patients with prostate cancer and in prostate cancer tissue. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1999; 878: 544–546
- [31] Lubbe W.J., Zhou Z.Y., Fu W., Zuzga D., Schulz S., Fridman R., Muschel R.J., Waldman S.A., Pitari G.M.: Tumor epithelial cell matrix metalloproteinase 9 is a target for antimetastatic therapy in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 1876–1882
- [32] Luparello C., Avanzato G., Carella C., Pucci-Minafra I.: Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and proliferative behaviour of clonal breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1999; 54: 235–244
- [33] McCarthy K., Maguire T., McGreal G., McDermott E., O'Higgins N., Duffy M.J.: High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* 1999; 84: 44–48
- [34] Murashige M., Miyahara M., Shiraishi N., Saito T., Kohno K., Kobayashi M.: Enhanced expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human colorectal tumors. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 1996; 26: 303–309
- [35] Murphy F.R., Issa R., Zhou X.Y., Ratnarajah S., Nagase H., Arthur M.J., Benyon C., Iredale J.P.: Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 11069–11076
- [36] Murphy G., Houbrechts A., Cockett M.I., Wiliamson R.A., O'Shea M., Docherty A.J.: The terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry*, 1991; 30: 8097–8102
- [37] Murray D., Morrin M., McDonnell S.: Increased invasion and expression of MMP-9 in human colorectal cell lines by a CD44-dependent mechanism. *Anticancer Res.*, 2004; 24: 489–494
- [38] Nagase H., Woessner J.F.Jr.: Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 21491–21494
- [39] Nebeshima K., Inoue T., Shima Y., Sameshima T.: Matrix metalloproteinases in tumor invasion: Role for cell migration. *Pathol. Int.*, 2002; 52: 255–264
- [40] Nowacki M.P.: Rak jelita grubego. W: Onkologia kliniczna. Red. Krzakowski M.T. II. Wyd. Med. Borgis, Warszawa, 2001; 237–253
- [41] Oberg A., Hoythya M., Tavelin B., Stenling R., Lindmark G.: Limited value of preoperative serum analyses of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal cancer. *Anticancer Res.*, 2000; 20: 1085–1091
- [42] Scott N., Quirke P.: Molecular biology of colorectal neoplasia. *Gut* 1993; 34: 289–292
- [43] Sinnamon M.J., Carter K.J., Fingleton B., Matrisian L.M.: Matrix metalloproteinase-9 contributes to intestinal tumorigenesis in the adenomatous polyposis coli multiple intestinal neoplasia mouse. *Int. J. Exp. Pathol.*, 2008; 89: 466–475
- [44] Sutnar A., Pesta M., Liska V., Treska V., Skalicky T., Kormunda S., Topolcan O., Cerny R., Holubec L.Jr.: Clinical relevance of the expression of mRNA of MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and CEA tissue samples from colorectal liver metastases. *Tumour Biol.*, 2007; 28: 247–252
- [45] Tomita T., Iwata K.: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in colonic adenomas-adenocarcinomas. *Dis. Colon Rectum*, 1996; 39: 1255–1264
- [46] Torii A., Kodera Y., Uesaka K., Hirai T., Yasui K., Morimoto T., Yamamura Y., Kato T., Hayakawa T., Fujimoto N., Kito T.: Plasma concentration of matrix metalloproteinase 9 in gastric cancer. *Br. J. Surg.*, 1997; 84: 133–136
- [47] Unsal D., Akyurek N., Uner A., Erpolat O.P., Han U., Akmansu M., Montes B.B., Dursun A.: Gelatinase B expression as a prognostic factor in patients with stage II/III rectal carcinoma treated by postoperative adjuvant therapy. *Am. J. Clin. Oncol.*, 2008; 31: 55–63
- [48] Unsal Kilic D., Uner A., Akyurek N., Erpolat P., Dursun A., Pak Y.: Matrix metalloproteinase-9 expression correlated with tumor response in patients with locally advanced rectal cancer undergoing preoperative chemoradiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2007; 67: 196–203
- [49] Vihinen P., Kahari V.M.: Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer*, 2002; 99: 157–166
- [50] Waas E.T., Hendriks T., Lomme R.M., Wobbes T.: Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 correlate with disease stage and survival in colorectal cancer patients. *Dis. Colon Rectum*, 2005; 48: 700–710
- [51] Wang T., Yamashita K., Iwata K., Hayakawa T.: Both tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and TIMP-2 activate Ras but through different pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 296: 201–205
- [52] Werb Z., Ashkenas J., MacAuley A., Wiesen J.F.: Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1996; 29: 1087–1097
- [53] Wilhelm S.M., Collier I.E., Marmer B.L., Eisen A.Z., Grant G.A., Goldberg G.I.: SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 17213–17221

- [54] Woessner J.F.Jr.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.*, 1991; 5: 2145–2154
- [55] Wojtowicz-Praga S., Dickson R.B., Hawkins M.J.: Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest. New Drugs.*, 1997; 15: 61–75
- [56] Wu W., He J.T., Ruan J.D., Wang R.B., Zhang Y.D.: Expression of MMP-2, MMP-9 and collagen type IV and their relationship in colorectal carcinomas. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.*, 2008; 24: 908–909
- [57] Yamashita K., Suzuki M., Iwata H., Koike T., Hamaguchi M., Shinagawa A., Noguchi T., Hayakawa T.: Tyrosine phosphorylation is crucial for growth signaling by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2). *FEBS Lett.*, 1996; 396: 103–107
- [58] Ylissirnio S., Hoyhtya M., Turpeenniemi-Hujanen T.: Serum matrix metalloproteinases-2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2 in lung cancer-TIMP-1 as prognostic marker. *Anticancer Res.*, 2000; 20: 1311–1316
- [59] Yukawa N., Yoshikawa T., Akaike M., Sugimasa Y., Rino Y., Masuda M., Imada T.: Impact of plasma tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 on long-term survival in patients with colorectal cancer. *Oncology* 2007; 72: 205–208
- [60] Yukawa N., Yoshikawa T., Akaike M., Sugimasa Y., Takemiya S., Yanoma S., Imada T., Noguchi Y.: Prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients with colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2004; 24: 2101–2105
- [61] Zeng Z.S., Cohen A.M., Guillem J.G.: Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 1999; 20: 749–755

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.