

Magdalena Jurzak^{1,2}
Grażyna Dębska¹
Grażyna Cepuch^{1,3}
Zofia Forys¹

Udział metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w transformacji prawidłowych melanocytów w komórki czerniaka złośliwego

słowa kluczowe: czerniak, metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej

The role of extracellular matrix metalloproteinase in the transformation of normal melanocytes into melanoma cells

Abstract

The most common localisation of melanoma is skin, however it may also occur within oral mucosa, eyeball, and brain. Melanoma results from carcinogenic transformation of normal melanocytes and may originate in pigment changes or *de novo* in normal skin. The occurrence and growth of melanoma are due to both genetic predispositions and environmental factors, especially UV radiation [1, 2].

The process of transformation of melanocytes into dysplastic cells, and further into melanoma cells with radial spread without metastatic tendencies as well as vertical spread with possible metastases, is multistage. It requires changes in: signal transduction patterns, proliferative activity, migration ability, and ability of cancer cells to destroy the extracellular matrix (ECM).

Extracellular matrix metalloproteinases are enzymes capable of destruction of three-dimensional ECM structure, therefore enable the migration of cancer cells. The disturbance of the interactions between cells in the primary lesion together with the ability to transform and destroy structural barriers of the ECM as well as intensified mobility of cancer cells determine its further infiltration to the surrounding tissues, carcinogenic cells migration and distant metastases [3].

During the transformation of normal melanocytes into melanoma cells the expression of extracellular matrix metalloproteinases changes between the consecutive stages of cancer development. Vertical growth and the formation of metastases requires strict cooperation between melanoma and normal skin cells since during the first stages of infiltration keratinocytes and fibroblasts produce extracellular matrix metalloproteinases [4, 5, 6]. Their expression may be regulated by the tumour itself due to melanoma cells ability to produce EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer). This factor stimulates fibroblasts surrounding cancer to synthesise extracellular matrix metalloproteinases [7].

¹ Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych.

² Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Farmaceutyczny, Oddział Medycyny Laboratoryjnej

³ Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Wydział Nauk o Zdrowiu, Zakład Pielęgniarstwa Klinicznego.

The role of extracellular matrix metalloproteinases in the cancer invasion is determined by some mechanisms influencing the expression and activation of these enzymes, substrate specificity of each extracellular matrix metalloproteinase, their influence on cytokine net, growth factors, and mutual interactions between cells and the extracellular matrix surrounding them [3].

key words: melanoma, extracellular matrix metalloproteinase

Wprowadzenie

Czerniak złośliwy MM (*melanoma malignum*) jest jednym z najgroźniejszych nowotworów występujących u człowieka, a zachorowalność na niego z każdym rokiem wzrasta [1]. Przyczyną rozwoju czerniaka złośliwego jest transformacja nowotworowa melanocytów umiejscowionych w skórze, błonach śluzowych i naczyniówce oka. Najczęściej czerniak rozwija się *de novo* z prawidłowych melanocytów naskórka [2] lub znamionowych komórek melanocytarnych, występujących w naskórku lub skórze właściwej [3, 4].

Melanocyty naskórka występują głównie między keratynocytami warstwy podstawnej (średnio na 10 keratynocytów przypada 1 melanocyt) [5, 6]. Melanocyty wraz z keratynocytami tworzą tzw. jednostki melanocytarne. Jednostka melanocytarzna składa się z 1 melanocytu i około 35 keratynocytów, do których transportowana jest melanina [5, 7].

Keratynocyty kontrolują wzrost melanocytów i ich funkcjonowanie za pomocą skomplikowanego systemu parakrynnych czynników wzrostu i cząsteczek adhezyjnych. W rozwoju czerniaka obserwowane są zmiany na poziomie interakcji komórkowych. Zmiany występujące w szlakach sygnałowych i ekspresji genów prowadzą do zaburzeń na poziomie interakcji komórkowych, zmian w potencjale proliferacyjnym melanocytów i przyczyniają się do przekształcenia melanocytów w inwazyjne komórki czerniaka. Powstające komórki nowotworowe uwalniają się spod kontroli keratynocytów w wyniku obniżenia liczby receptorów istotnych dla interakcji z keratynocytami, wzrostu liczby receptorów i cząsteczek sygnałowych, które nie występują w melanocytach, ale są ważne dla interakcji między komórkami czerniaka oraz między komórkami czerniaka i fibroblastami lub komórkami śródbłonna oraz w wyniku utraty połączenia z warstwą podstawną naskórka przez zaburzenia ekspresji integrzyn [8].

Etiopatogeneza

Czerniak jest najzłośliwszym nowotworem skóry. Przyczynia się do 75% zgonów chorych na nowotwory złośliwe skóry [9]. Najwyższy odsetek chorych odnotowuje się wśród rasy białej w Australii (zachorowalność wynosi 25/100 tys. mężczyzn i 36/100 tys. kobiet) i w USA (głównie Kalifornia, Floryda, Hawaje, zachorowalność: 2,4/100 tys. osób), a także w Norwegii [9, 10].

Na transformację prawidłowych melanocytów w inwazyjne komórki czerniaka mają wpływ zarówno predyspozycje genetyczne, jak i czynniki środowiskowe. Mutacje w genach odpowiedzialnych za proliferację i apoptozę, zmiany epigenetyczne [11], wytwarzanie autokrynych czynników wzrostu, utrata zdolności do adhezji – to czynniki, które wywołują zmiany w szlakach przekazywania sygnałów w melanocytach i uwalniają je spod ścisłej kontroli keratynocytów [8].

Głównymi czynnikami zwiększającymi ryzyko zachorowania na czerniaka są: nadmierna ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe (UV) i oparzenia słoneczne w dzieciństwie, zwłaszcza do 12 roku życia [12], obecność znamion melanocytowych wrodzonych a zwłaszcza dysplastycznych FAMMM (*familial atypical multiple mole-melanoma*), ciężkie oparzenia słoneczne przebyte w dzieciństwie, I lub II fototyp skóry (wg klasyfikacji Fitzpatricka), rodzinne występowanie czerniaka MLM (*familial melanoma*) [13], stany immunosupresji nabytej lub wrodzonej oraz stałe drażnienie mechaniczne lub chemiczne skóry. Ponadto wymienia się: wiek, obecność i liczba znamion dysplastycznych (wykazujących atypię cytologiczną) [14] i wrodzonych oraz piegów, łuszczycę [12], wcześniejsze występowanie u danej osoby czerniaka [12] lub raka skóry oraz genetycznie uwarunkowaną chorobę *Xeroderma pigmentosum*, spowodowaną defektem endonukleazy, enzymu biorącego udział w naprawie DNA [9].

W 5–10% przypadków zachorowań na czerniaka pewną rolę odgrywają predyspozycje dziedziczne, dotyczące mutacji w chromosomach 1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 11. Najczęściej są to delecje fragmentów chromosomów w rejonach 1p36, 6q, 9p21. Mutacji tych nie zidentyfikowano u wszystkich członków rodzin, w których występował ten nowotwór, np. mutacje genu p16 (znanego jako CDKN2A, INK4A lub MTS1) leżącego w rejonie 9p21 [15, 16]. Mutacje dotyczą najczęściej genów supresorowych i mają charakter recesywny. Konsekwencją mutacji jest powstawanie białek nieaktywnych lub zahamowanie syntezy białek, np. mutacje genów szlaków p16-CDK4-Rb [17] i ARF-HDM2-p53 [18], p19/INK4d, p15/INK4b. Mutacje protoonkogenów powodują najczęściej uniezależnienie od mechanizmów kontrolnych komórki, aktywując kaskadę przekazywania sygnału. Pojawiają się najczęściej w protoonkogenach ras [19] i B-raf [20] i mają zazwyczaj charakter dominujący, np. mutacje *c-met*, *c-kit*, *c-fos*, *c-myc*, *ras* [15].

Jednym z najbardziej znaczących czynników ryzyka jest rodzinna historia choroby. Czerniak jest związany z czterema zespołami dziedzicznymi: czerniakiem rodzinnym (MLM), zespołem znamion dysplastycznych (FAMMM), czerniakiem rodzinnym z rakiem trzustki FAMMM-PC (*familial atypic multiple mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome*) i czerniakiem z gwiaździakiem lub innymi nowotworami centralnego układu nerwowego MA (*melanoma-astrocytoma syndrome, melanoma and neural system tumor syndrome*). Przynajmniej 10% chorych na

czerniaka podaje w wywiadzie zachorowanie w pierwszym lub drugim pokoleniu [21].

Najważniejszym czynnikiem zewnętrznym warunkującym rozwój czerniaka jest promieniowanie UV. Bariere ochronną przed promieniowaniem stanowi melanina. Osoby mające większość barwnika brązowo-czarnego (eumelaniny), zapadają na czerniaka znacznie rzadziej niż osoby o jasnej karnacji, skórze w których dominuje feomelanina. Melanogeneza może być aktywowana (melanogeneza fakultatywna) przez promieniowanie ultrafioletowe, hormony i miejscowy stan zapalny. Wśród hormonów największe znaczenie mają melanokortyna α -MSH (*melanocyte stimulating hormone*) oraz ACTH (*adrenocorticotropic hormone*). Melanokortyna α -MSH i ACTH po zligandowaniu receptora melanokortyny MC1R (*melanocortin receptor*) na melanocytach, pobudzają ekspresję MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*) i w konsekwencji melanogenezę [22].

Promieniowanie UVB (zakres 290–320 nm) jest pochłaniane przez DNA naskórkowych melanocytów, i może powodować powstawanie fotoproduktów w obrębie DNA (cyklobutanowe dimery pirymidyny). Mutacje te mogą prowadzić do transformacji nowotworowej melanocytów. W warunkach prawidłowych są one wycinane przez układ enzymatyczny NER (*nucleotide excision repair*) [9]. Komórki, których genom został uszkodzony przez promieniowanie UV w stopniu uniemożliwiającym naprawę zwykle podlegają apoptozie w mechanizmie zależnym od genu p53. Jednakże komórki odporne na apoptozę mogą przeżyć i dawać początek klonom kumulującym mutacje. Z takich klonów drogą kolejnych selekcji rozwijają się komórki dysplastyczne, a następnie komórki nowotworowe [23]. Promieniowanie UVB działa immunosupresyjnie przez zaburzenie wytwarzania IL-2 przez komórki Langerhansa naskórka. UVA (320–400 nm) jest mniej mutagenne, gdyż w niewielkim stopniu jest absorbowane przez DNA, choć ma większą energię i przenika głębiej, aż do skóry właściwej. Powoduje powstanie reaktywnych rodników tlenowych uszkadzających materiał genetyczny, błony komórkowe i inne struktury. Przez niszczoną warstwę ozonową atmosfery przenika coraz więcej UVC, które również przyczynia się do kancerogenezy [9].

Diagnostyka czerniaka

Z diagnostycznego punktu widzenia najważniejsze są objawy charakterystyczne dla czerniaka, które usystematyzowano w formie skal diagnostycznych.

System ABCD(E) został zaproponowany przez Amerykańskie Towarzystwo Nowotworowe. System ten opiera się na punktowej ocenie parametrów zmiany barwnikowej:

A (*Asymetry*) – asymetria kształtu,

B (*Border*) – nieregularność brzegu zmiany (nierówne, postrzępione, gubiące się w skórze) lub nieostre granice,

- C (*Colour*) – różnorodny kolor (od jasnobrązowego po czarny, nierównomierny rozkład barwnika, punktowy brak barwnika),
 D (*Diameter*) – średnica powyżej 6 mm,
 E (*Elevation*) – występowanie uszkodzeń naskórka i zmian w rzeźbie powierzchni (powierzchnia zmiany wyniosła ponad poziom naskórka, nierówna, z obecnymi owrzodzeniami).

System Glasgow jest oparty na skali siedmiopunktowej, której poszczególne elementy mogą wskazywać na rozpoczęcie transformacji nowotworowej:

- 1 – zmiana rozmiaru,
- 2 – zmiana kształtu,
- 3 – zmiana koloru,
- 4 – obecność stanu zapalnego,
- 5 – obecność sączenia lub krwawienia,
- 6 – obecność objawów subiektywnych, takich jak przeczulica, świąd,
- 7 – średnica zmiany powyżej 7 mm.

Histopatologiczna ocena złośliwości czerniaka obejmuje dwie metody: Breslowa i Clarka. Klasyfikacja Clarka opiera się na ocenie głębokości naciekania w kolejne warstwy skóry, ale nie uwzględnia grubości poszczególnych warstw. Klasyfikacja Breslowa opiera się na pomiarze grubości nacieku (wartość podawana w milimetrach przy użyciu okularu mikrometrycznego, mierząc od warstwy ziarnistej naskórka do najgłębiej położonej części zmiany nowotworowej [24]).

Główne czynniki rokownicze

Zespół głównych czynników rokowniczych opiera się na systemie TNM, tzn. ocenie parametrów guza pierwotnego – *tumor* (T), obecność przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych – *nodes* (N), przerzuty odległe – *metastases* (M). W 2002 r. American Joint Committee on Cancer opracował nowy, obecnie obowiązujący system TNM. Klasyfikacja ta stosowana jest w połączeniu z oceną głębokości naciekania skóry według pięciostopniowej skali Clarka i czterostopniowej skali Breslowa [24].

Zmiany kliniczne i molekularne w czerniaku

Rozwój czerniaka skóry jest wynikiem wzajemnego oddziaływania szkodliwych czynników egzogennych oraz zmian endogennych ułatwiających powstawanie nowotworu. Czerniak może rozwinąć się z melanocytów pochodzących ze znamion lub z melanocytów zdrowej skóry.

Na poziomie zmian klinicznych obowiązuje model zaproponowany przez Clarka, który zakłada stopniowe przekształcanie się melanocytów w komórki dysplastyczne, a następnie w komórki atypowe. Etapy rozwoju prowadzącego od zmiany łagodnej do uogólnionego czerniaka obejmują kolejno: znamię nabyte zwykłe lub

znamię wrodzone, znamię dysplastyczne, czerniaka pierwotnego w fazie wzrostu powierzchniowego (radialnego), czerniaka pierwotnego w fazie wzrostu głębokiego (wertykalnego) oraz czerniaka przerzutowego [8].

Postacie kliniczne czerniaka złośliwego

Wyróżnia się kilka postaci klinicznych czerniaka złośliwego: czerniaka wywodzącego się ze złośliwej plamy soczewicowatej, czerniaka szerzącego się powierzchownie, czerniaka guzkowego, czerniaka na częściach akralnych, czerniaka łożyska paznokcia, czerniaka błon śluzowych oraz czerniaka desmoplastycznego.

Czerniak wywodzący się ze złośliwej plamy soczewicowatej LMM (*lentigo maligna melanoma*) rozwija się obrębie złośliwej plamy soczewicowatej. Postać ta stanowi 4–10% wszystkich przypadków czerniaka złośliwego. Charakteryzuje się wolnym przebiegiem i słabą dynamiką wzrostu. Zwykle umiejscawia się na twarzy (nos, policzki). Może także pojawiać się także na grzbietowej części dłoni i goleniach. Objawem złośliwej transformacji jest niewielkie nacieczenie lub pojawianie się drobnych guzków.

Czerniak szerzący się powierzchownie SSM (*superficial spreading melanoma*) jest najczęstszą odmianą, gdyż stanowi aż 70% wszystkich przypadków. Występuje na kończynach dolnych u kobiet i na tułowiu u mężczyzn. Przedstawia się jako zmiana lekko uniesiona, miejscami płaska, szerząca się obwodowo o różnorodnym zabarwieniu. Obecność odbarwień świadczy o samoistnej regresji nowotworu.

Czerniak guzowaty NMM (*nodular melanoma*) stanowi 15–30% wszystkich przypadków i najczęściej powstaje na skórze niezmienionej. Występuje w postaci ciemnych płaskowyniosłych guzków, umiejscowionych na tułowiu, głowie i szyi. Częściej występuje u mężczyzn. Wykazuje wzrost wertykalny, przez co jest uważany za najbardziej złośliwą postać. W 5% przypadków może wystąpić jako postać bezbarwnikowa (*melanoma amelanoticum*).

Czerniak umiejscowiony na częściach akralnych ALM (*acral lentiginosum melanoma*) występuje rzadko u rasy białej, gdyż stanowi tylko 2–8% wszystkich przypadków. Jest natomiast najczęstszą postacią czerniaka u ludzi rasy czarnej. Umiejscawia się na dłoniach i podeszwach w postaci dużej zmiany o hiperkeratotycznej powierzchni. Zmiany zaawansowane niejednokrotnie wrzodzieją.

Podtypem czerniaka umiejscawiającego się na częściach akralnych jest czerniak łożyska paznokcia (*subungual melanoma*). Czerniak łożyska paznokcia najczęściej umiejscawia się pod płytką paznokciową kciuka lub palucha. Zauważalnym objawem jest brązowe lub czarne przebarwienie łożyska paznokcia, zwykle umiejscowione w części proksymalnej, które następnie przechodzi na obwód, zajmując skórę wokół paznokcia.

Czerniak błon śluzowych (*mucosal melanoma*) występuje na błonach śluzowych jamy ustnej i czerwieni wargowej, ale może pojawić się również na zewnętrznych

narządach płciowych, odbycie, cewce moczowej i w przelyku. Pod względem obrazu klinicznego odpowiada postaci akralnej.

Czerniak desmoplastyczny DM (*desmoplastic melanoma*) charakteryzuje się przerostem tkanki łącznej i naciekaniem komórek nowotworowych wzdłuż nerwów, przez co jest też określany jako czerniak neurotropowy. Obraz kliniczny nie jest charakterystyczny, a rozpoznanie ustala się na podstawie badania histopatologicznego.

Ponadto wyróżnić można czerniaka neurotropowego, narządów płciowych, czerniaka okolic odbytu [2].

Pod względem zróżnicowania komórek czerniaka w stosunku do prawidłowych melanocytów wyróżniamy czerniaka melanotycznego i amelanotycznego. Czerniak melanotyczny (*melanoma melanoticum*) wykazuje podobieństwo w stosunku do prawidłowych melanocytów pod względem zróżnicowania. Zarówno prawidłowe melanocyty, jak i czerniak melanotyczny wytwarzają melaninę. Natomiast komórki czerniaka amelanotycznego (*melanoma amelanoticum*) nie wytwarzają melaniny, co wskazuje na mniejszy stopień zróżnicowania komórek, a tym samym większą złośliwość [25].

Przerzutowanie – mechanizmy, enzymy proteolityczne i degradacja macierzy pozakomórkowej

W przebiegu progresji nowotworu część komórek może nabywać fenotyp inwazyjny, który charakteryzuje się zdolnością do przerzutowania. O tworzeniu przerzutów decydują takie cechy komórek, jak: aktywność proteolityczna komórek nowotworowych, ich zdolności migracyjne, aktywność proliferacyjna oraz zdolność do neowaskularyzacji. Powstanie wtórnych ognisk nowotworowych jest spowodowane wędrowką komórek nowotworowych. Uwolnione z guza dokonują inwazji otaczających tkanek: przekraczają błonę podstawną, a następnie warstwę komórek śródbłonka naczyń krwionośnych. Wnikają do światła naczyń i kolejno przez ścianę naczyń dostają się do tkanek, w których powstają ogniska wtórne, jako wynik proliferacji i angiogenezy.

Wydzielanie przez komórki nowotworowe różnych enzymów proteolitycznych, głównie metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMPs) i aktywatorów plazminogenu umożliwia degradację składników macierzy pozakomórkowej przez co komórki są zdolne do przekraczania błony podstawnej i do przenikania przez ścianę naczyń krwionośnych i limfatycznych.

Krytycznym procesem zarówno dla wzrostu guza pierwotnego, jak i wtórnych ognisk nowotworowych jest angiogeneza. W miarę wzrostu guza dochodzi do hipoksji komórek nowotworowych. Powstałe niedotlenienie indukuje czynnik transkrypcyjny HIF-1 (*hypoxia inducible factor*), który pobudza transkrypcję genu czynnika wzrostu śródbłonka naczyń VEGF (*vascular endothelial growth factor*).

Czynnik ten stymuluje migrację komórek śródbłonka naczyń w kierunku guza, proliferację oraz formowanie nowych naczyń krwionośnych.

Proces przekraczania przez komórki nowotworowe błony podstawnej i warstwy śródbłonka naczyń wymaga aktywacji wielu enzymów proteolitycznych: metaloproteinaz macierzy, proteinaz serynowych oraz proteinaz systemu plazminy. Najważniejszą proteazą serynową jest plazmina. Powstaje ona dzięki aktywacji plazminogenu przez system aktywatora plazminogenu PAS (*plazminogen activation system*). PAS zawiera dwie proteinazy serynowe (urokinazowy aktywator plazminogenu uPA oraz tkankowy aktywator plazminogenu tPA), receptor dla urokinazowego aktywatora plazminogenu uPAR oraz dwa inhibitory PAI-1 i PAI-2. Plazmina charakteryzuje się zdolnością degradacji składników macierzy pozakomórkowej: fibronektyny, lamininy i proteoglikanów. Bierze udział w aktywacji proenzymów metaloproteinaz proMMPs, cytokin, a także może indukować angiogenezę. W warunkach fizjologicznych występuje równowaga pomiędzy aktywatorami i inhibitorami plazminogenu. Natomiast w przypadku nowotworów obserwuje się wzrost poziomu aktywatorów, podobnie jak i receptora urokinazowego aktywatora uPAR.

Wpływ na inwazyjność i przerzutowanie mają zmiany właściwości adhezyjnych oraz wzrost zdolności do migracji. Ruchliwość jako jedna z cech fenotypu złośliwego komórki nowotworowej wpływa na jej zdolność do migracji. Ruchliwość komórek jest spowodowana zmianami w obrębie struktury cytoszkieletu budowanego przez mikrofilamenty składające się głównie z aktyny. Migracja komórek podlega inicjacji pod wpływem czynników sygnałowych, tj. cytokin, hormonów. Konsekwencją działania różnych czynników molekularnych, β -arrestyny, kinazy 3-fosfatydyloinozytolu, jest polimeryzacja i rozgałęzienie włókien aktyny oraz formowanie pseudopodiów.

Cząsteczki adhezyjne CAM (*cell adhesion molecules*) są istotnymi w procesie migracji komórek. Należące do cząsteczek adhezyjnych integryny stanowią receptory elementów macierzy pozakomórkowej ECM (*extracellular matrix*) i mogą wiązać się z kolagenem, witronektyną i fibronektyną. Pełnią także funkcję przekaźników sygnałów do wnętrza komórki. Połączenie integryn z białkami ECM lub z innymi cząsteczkami adhezyjnymi wpływa na wzrost i migrację komórek. Zaburzenie glikozylacji integryn wpływa na zmianę właściwości adhezyjnych, migracyjnych oraz wzrostu inwazyjności.

Komórki nowotworowe mogą wykazywać pewne preferencje do tworzenia ognisk wtórnych w określonych narządach. Jest to związane z chemotaksją komórek do cytokin wytwarzanych w odpowiednich narządach. Przykładem może być integryna $\alpha\beta 3$, która pełni rolę w adhezji komórek czerniaka podczas kolonizacji węzłów chłonnych.

Kadheryny stanowią grupę cząsteczek powierzchniowych istotnych dla procesu przerzutowania i inwazyjności nowotworów. Dobrze poznano E-kadherynę, P-kad-

herynę i N-kadheryną. E-kadheryna i P-kadheryna są odpowiedzialne za prawidłową adhezję komórek nabłonkowych, natomiast N-kadheryna ulega ekspresji tylko w tkankach płodowych, a także w komórkach nowotworu.

Angiogeneza, jako proces tworzenia nowych naczyń z śródbłonka naczyń już istniejących jest niezbędna dla wzrostu ogniska nowotworowego. Do czynników stymulujących neoangiogenezę należą: zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), czynnik martwicy nowotworu (TNF), transformujący czynnik wzrostu ($TGF\beta$ -1), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), angiogenina, interleukina 8 oraz naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF). VEGF może wiązać się z proteoglikanami macierzy pozakomórkowej oraz z mitogenami.

Ekspresja VEGF wzrasta w nowotworach złośliwych, a jego ekspresja jest sprzężona ze wzrostem mikrounaczynienia. Hipoksja zwiększa wytwarzanie VEGF przez komórki nowotworowe. Połączenie VEGF z receptorami ulegającymi ekspresji na komórkach śródbłonka naczyń prowadzi do zwiększenia przepuszczalności naczyń oraz migracje komórek śródbłonka w kierunku guza. W konsekwencji dochodzi do rozwoju sieci naczyń krwionośnych zaopatrujących komórki nowotworowe [26].

Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej

Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej MMPs (*extracellular matrix metalloproteinases*) to enzymy należące do rodziny endopeptydaz o masie cząsteczkowej od 28 do 92 kDa. Enzymy te mają podobny schemat budowy i zawierają w swojej cząsteczce atom cynku (metaloenzymy). MMPs degradują prawie wszystkie składniki macierzy pozakomórkowej ECM, takie jak kolageny, fibronektyny, lamininy oraz inne proteoglikany i glikoproteiny, uczestnicząc w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych [27].

MMP składają się z kilku domen o różnej funkcji, wydzielane są w formie latentnej jako proenzymy (proMMP). Odcięcie propeptydu powoduje aktywację enzymu [28].

Obecnie MMP dzieli się na 8 odrębnych grup: kolagenazy (MMP-1/kolagenaza-1, MMP-8/kolagenaza-2, MMP-13/kolagenaza-3, MMP-18/kolagenaza-4), żelatynazy (MMP-2/żelatynaza A, MMP-9/żelatynaza B), stromielinazy lub stromielizyny (MMP-3/stromielizyna-1, MMP-10/stromielizyna-2, MMP-11/stromielizyna-3), matrylizyny (MMP-7, MMP-26), metaloelastazy (MMP-12), metaloproteinazy transbłonowe (MMP-14/MT1-MMP, MMP-15/MT2MMP, MMP-16/MT3MMP, MMP-17/MT4MMP, MMP-23, MMP-24/MT5MMP, MMP-25/MT6MMP), enamielizyny (MMP-20) i pozostałe metaloproteinazy (MMP-19, MMP-21, MMP-22, MMP-27, MMP-28) [29].

Kolagenazy degradują kolagen włókienkowy (głównie kolagen I, II i III), żelatynazy rozkładają zdenaturowany kolagen i kolagen typu IV, stromielizyny od-

powiedzialne są za degradację składników macierzy pozakomórkowej, takich jak laminina, fibronektyna, witronektyna, proteoglikany oraz niektóre typy kolagenu, matrylizyny natomiast rozkładają fibronektynę, kolagen IV i fibrynogen. Rolą metaloproteinaz transbłonowych jest aktywacja innych metaloproteinaz podczas transportu przez błonę komórkową do środowiska pozakomórkowego dzięki domenie zakotwiczonej MT-MMP w błonie komórkowej [29].

Struktura metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej

Metaloproteinazy są wytwarzane przez wiele rodzajów komórek: fibroblasty, leukocyty, monocyty, makrofagi, granulocyty obojętnochłonne, komórki śródbłónka i komórki nowotworowe. W komórkach syntetyzowane są w formie proenzymów, a następnie uwalniane do przestrzeni pozakomórkowej w postaci proenzymów.

Metaloproteinazy są aktywne w środowisku obojętnym lub lekko zasadowym w obecności jonów wapnia [30]. W swej budowie zawierają 2 atomy cynku, z których jeden pełni rolę katalityczną, a drugi strukturalną.

Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej charakteryzują się strukturą domenową [31]. Domeny charakterystyczne dla całej rodziny metaloproteinaz występujące w każdym enzymie to peptyd sygnałowy, propeptyd oraz domena katalityczna [28]. Sekwencja sygnałowa znajduje się na końcu łańcucha z grupą aminową i odpowiada za uwalnianie proenzymu z siateczki śródplazmatycznej do macierzy pozakomórkowej poprzez cysterny aparatu Golgiego [30]. Propeptyd jest zbudowany z 80 aminokwasów. W jego budowie wyróżnia się sekwencje PRCG(V/N)PD (Pro- Arg- Cys- Gly- (X)- Pro- Asp- Val), wewnątrz której znajduje się cysteina. Jej zadaniem jest wiązanie atomu cynku, przez co enzym pozostaje w stanie nieaktywnym [30, 32]. Domena katalityczna zbudowana jest z 170 aminokwasów. Zawiera w swej budowie miejsce aktywne. W jego obrębie występuje sekwencja aminokwasów HEXXHXXGXXH, która zawiera trzy cząsteczki histydyny wiążące atom cynku. Metaloproteinazy MMP-7 i MMP-28 zbudowane są z najkrótszego łańcucha polipeptydowego, dlatego zawierają w swej strukturze tylko trzy podstawowe domeny: sekwencję sygnałową, propeptyd oraz domenę katalityczną. Pozostałe metaloproteinazy zawierają dodatkowo domenę hemopeksynopodobną, która decyduje o wiązaniu białek macierzy pozakomórkowej, a także uczestniczy w aktywacji i inhibicji enzymów.

Poszczególne grupy metaloproteinaz zawierają w swojej strukturze swoiste domeny decydujące o konkretnych właściwościach [30].

Domena katalityczna i domena C-końcowa są oddzielone regionem zawiasowym (*hinge*) o zróżnicowanej strukturze i długości. Region zawiasowy pełni funkcję łącznika i decyduje o specyficzności substratowej kolagenaz i stromielizyn.

Żelatynazy w obrębie domeny katalitycznej zawierają fragment fibronektynopodobny, który odpowiada za wiązanie enzymu z elastyną i kolagenem. Dodatkowo żelatynaza B posiada także fragment wiążący kolagen typu V [30, 31].

Metaloproteiny błonowe zawierają domenę transbłonową umożliwiającą zakotwiczenie w błonie komórkowej [31]. Charakteryzują się także wraz z stromielizyną-3 (MMP-11) obecnością domeny furynopodobnej, która odpowiada za aktywację enzymu jeszcze przed jego sekrecją [30, 31]. Jest to związane z rozpoznawaniem tej domeny przez furynoproteazę podczas początkowego etapu aktywacji.

Metaloproteiny MMP-21 oraz MMP-22 charakteryzują się, poza obecnością domeny transbłonowej, regionami bogatymi w prolinę i domeną podobną do receptora interleukiny-1 [31].

Aktywacja metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej

Aktywność MMPs regulowana jest na kilku poziomach. Ekspresja większości MMP podlega regulacji na poziomie transkrypcji przez czynniki wzrostu, cytokiny, hormony, interakcje komórka–komórka, komórka–macierz pozakomórkowa oraz czynniki fizyczne, między innymi promieniowanie UV [33].

Regulacja ekspresji genów metaloproteinaz

Zwiększenie aktywności metaloproteinaz może być osiągnięte przez wzrost poziomu transkrypcji genów. Najważniejszą rolę w tym procesie spełnia czynnik AP-1 (*activator protein-1*), który łączy się ze specyficzną sekwencją DNA w promotorowym regionie genu MMP i stymuluje proces transkrypcji genów niektórych metaloproteinaz [30, 31, 32].

Inne czynniki transkrypcyjne: AP-2 (*activator protein-2*), Ets, Sp-1, Egr1 wraz z kolagenem typu I, integrynami i estrogenami także mogą indukować ekspresję genów metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej [8].

Na ekspresję genów MMP wpływają również składniki macierzy pozakomórkowej. Wykazano, że ekspresję genów MT1-MMP i MMP-2 zwiększa kolagen typu I, a laminina, kolagen typu IV oraz fibronektyna ją zmniejszają.

Hamowanie ekspresji genów metaloproteinaz może zachodzić również przez wiązanie czynnika transkrypcyjnego AP-1 przez inne białka, co powoduje blokowanie jego zdolności do aktywacji transkrypcji genów. Podobny mechanizm działania wykazują hormony tarczycy, progesteron i androgeny w kompleksach ze swoistymi receptorami jądrowymi oraz glukokortykoidy i kwas retinowy, który dodatkowo hamuje ekspresję genów *c-jun* i *c-fos* kodujących podjednostki AP-1 [31].

Ekspresja genów niektórych białek z rodziny MMPs w fibroblastach może być indukowana przez białko obecne w błonie komórek nowotworowych – czynnik indukujący metaloproteiny macierzy pozakomórkowej EMMPRIN (*extracellu-*

lar matrix metalloproteinase inducer) [27]. EMMPRIN jest glikoproteina o masie cząsteczkowej 58 kDa, zlokalizowaną po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Większość proteaz wykorzystywanych przez komórki nowotworowe w procesach inwazji jest wytwarzana przez inne komórki (m.in. fibroblasty). Przy pomocy białka EMMPRIN komórki nowotworowe mogą regulować ekspresję MMP wydzielanych przez prawidłowe komórki [34].

Aktywacja proenzymów metaloproteinaz macierzowych

Metaloproteiny są wydzielane przez komórki do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w formie proenzymu (latentnej, jako proMMP), w którym cynk w centrum aktywnym jest zablokowany przez połączenie z grupą tiolową cysteiny w propeptydzie. Propeptyd zawiera sekwencję PRCGXPDV (Pro, Arg, Cys, Gly, X, Pro, Asp, Val), która jest zachowana w toku ewolucji w całej rodzinie białek MMPs. Aktywacja polega na odsłonięciu jonu cynku przez odcięcie propeptydu. Aktywacja proenzymu może zachodzić w sposób autokatalityczny lub przy udziale błonowych MMP (MT-MMP, metaloproteinaz macierzy typu błonowego; *membrane type matrix metalloproteinases*). W pierwszym przypadku wiązanie Cys-Zn zostaje przerwane przy udziale enzymów proteolitycznych. Kolejnym krokiem jest autokatalityczne odcięcie propeptydu. W drugim przypadku proenzym jest aktywowany przez MT-MMP.

MT-MMP tworzą potrójne kompleksy z białkami TIMP-2 (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) i proMMP. MT-MMP działa tu jako receptor dla cząsteczki TIMP-2. Dopiero MT-MMP z przyłączoną cząsteczką TIMP-2 staje się receptorem dla proMMP, która przyłącza się do niego przy pomocy domeny C-końcowej [27].

Tkankowe inhibitory metaloproteinaz TIMPs

Aktywność metaloproteinaz podlega regulacji przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej TIMPs (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*) [23].

Aktywność MMPs zależy od aktywności transkrypcji genów MMPs, ale również od stosunku, w jakim występują aktywne enzymy i tkankowe inhibitory metaloproteinaz TIMPs (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*). Wyróżnia się cztery typy tkankowych inhibitorów metaloproteinaz macierzy (TIMP-1, 2, 3, 4), z których każdy charakteryzuje się specyficznością działania wobec określonych MMPs. Tkankowe inhibitory metaloproteinaz są wydzielane przez te same komórki, które wydzielają MMP [28]. TIMPs wykazują dwukierunkowe działanie wobec metaloproteinaz. Mogą hamować proces aktywacji nie dopuszczając do przekształcenia proMMP w MMP, bądź inhibować metaloproteiny już aktywowane poprzez two-

rzenie z nimi kompleksu (MMP-TIMP) [35]. Tworząc kompleks łączą się wiązaniem niekonwalencyjnym z MMP w stosunku 1:1.

TIMPs zawierają 12 reszt cysteinowych, tworzących 6 mostków disiarczkowych. Charakteryzują się także zawartością 6 pętli polipeptydowych [32].

W budowie tkankowych inhibitorów metaloproteinaz można wyróżnić dwie domeny: N-kończową i C-kończową. Łącząc się z MMP domena N-kończowa blokuje możliwość odłączenia N-końcowego fragmentu MMP, a tym samym uniemożliwia odsłonięcie centrum aktywnego. W ten sposób TIMPs blokują aktywację proMMP [32, 36].

Domena C-kończowa TIMPs wykazuje możliwość do łączenia się z hemopeksynopodobnym fragmentem MMP, prowadząc do powstania kompleksu MMP-TIMP [28].

W tkankach najbardziej rozpowszechnione są TIMP-1 i 2. Wykazują działanie antyangiogenne przez hamowanie proliferacji komórek śródbłonna [36]. Ponadto regulują wzrost i migrację komórek [35].

TIMP-1 jest rozpuszczalną glikoproteiną wydzielaną przez większość komórek [12]. Jego domena C-kończowa wykazuje większe zdolności do wiązania z MMP-9 [32]. TIMP-2, będący rozpuszczalnym białkiem, jest produkowany przez fibroblasty i komórki śródbłonna [28]. Wykazuje większe powinowactwo do wiązania się z domeną hemopeksynopodobną MMP-2 [32]. TIMP-2 ma zdolność blokowania MMP-2 i MMP-3 łącząc się z nimi domeną C-kończową. Działa cytostatycznie na komórki nowotworowe, zamykając je w sieci kolagenu śródmiąższowego [36]. W małych stężeniach tworzy z MMP-14 na powierzchni komórek m.in. kompleks czerniaka. Ten kompleks działa jako receptor dla proMMP-2. Kolejna cząsteczka MMP-14 przekształca postać nieaktywną w zaktywowaną MMP-2 [35]. Działanie TIMP nie ogranicza się do hamowania MMP [32]. TIMP-3 wykazuje możliwość indukowania apoptozy w komórkach czerniaka [35].

Hamowanie aktywności MMPs przez TIMPs nie polega tylko na ograniczaniu progresji zmian nowotworowych. TIMP-1 oraz TIMP-2, niezależnie od swoich właściwości inhibicji MMPs, mogą pobudzać wzrost różnych typów komórek. TIMP biorą ponadto udział w regulowaniu migracji komórek, w hamowaniu angiogenezy czy nawet, w zależności od rodzaju komórek, indukowaniu lub przeciwdziałaniu ich programowanej śmierci [33].

Udział metaloproteinaz w procesie powstawania przerzutów nowotworowych

W inwazji nowotworu i procesie powstawania przerzutów istotną rolę odgrywa migracja komórek nowotworowych. Warunkiem niezbędnym w migracji komórek jest degradacja macierzy pozakomórkowej przez metaloproteinazy [37].

Migracja komórek nowotworowych może być wzmożona poprzez nadekspresję MMP, podczas gdy nadekspresja TIMP lub zastosowanie inhibitorów MMP powoduje zmniejszenie migracji.

Regulacja wydzielania i lokalizacja MMP zależy od typu migracji komórek nowotworowych. Istnieją dwa typy migracji komórek: przemieszczanie się pojedynczych komórek lub w grupie. Pierwszy typ migracji obserwowany jest podczas inwazji nowotworów hematopoetycznych, takich jak białaczka lub chłoniak, a także w przypadku mięsaka. Natomiast migracja grupy komórek nowotworowych utrzymujących kontakt pomiędzy sobą obserwowana jest często w czasie inwazji komórek nowotworowych dobrze lub umiarkowanie zróżnicowanych, na przykład raka szyjki macicy i czerniaka złośliwego [30].

Proces powstawania przerzutów nowotworowych związany jest z proteolizą błony podstawnej naczyń oraz składników macierzy pozakomórkowej, regulacją wzrostu guza zarówno w miejscu pierwotnym, jak i w miejscu powstania przerzutu [38].

W rozwoju nowotworu i w powstawaniu odległych przerzutów niezwykle ważną rolę spełnia proces angiogenezy, czyli tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Wykazano, że nowotwór bez dodatkowych naczyń krwionośnych może osiągnąć średnicę około 1–2 mm, natomiast do dalszego wzrostu miejscowego i do rozsiewu potrzebuje składników odżywczych dostarczanych przez naczynia krwionośne.

Angiogeneza jest ściśle regulowana przez układ stymulatorów i inhibitorów, a rozpoczyna się od uwolnienia proteaz rozkładających błonę podstawną oraz macierz pozakomórkową [30].

Metaloproteiny uczestniczą w procesie przemieszczania się komórek nowotworowych przez bariery macierzy pozakomórkowej, a także w modulowaniu sygnałów oddziałujących na transformację komórek, czynniki wzrostu, angiogenezę i apoptozę [38].

Metaloproteiny poprzez łączenie się z białkiem wiążącym insulinopodobny czynnik wzrostu ILGF-BP (*insulin-like growth factor-binding protein*), uwalniają sam czynnik ILGF (*insulin-like growth factor*), wpływają na wydzielanie transmembranowych czynników wzrostu. MMP mogą także hamować wzrost komórek raka uwalniając czynnik TGF- β [39]. Metaloproteiny hamują także reakcję immunologiczną organizmu przeciwko komórkom nowotworowym przez niszczenie receptorów dla interleukiny-2 na limfocytach T [29].

Zdolność przerzutowania i inwazji tkanek zdrowych jest wyznacznikiem złośliwości nowotworu. Cechy markerów przerzutowania wykazują także metaloproteiny, a wśród nich żelatynazy [37].

Metaloproteinazy macierzy w czerniaku

Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej mają swój udział w rozwoju czerniaka skóry [23]. W przebiegu nowotworu komórki czerniaka wykazują ekspresję MMP-1, 2, 9, 13, 14 oraz TIMP-1, 2, 3 [28]. Ekspresja MMPs nie jest stała we wszystkich stadiach przebiegu nowotworu. W fazach zmian zaawansowanych (naciekania) obserwuje się podwyższoną ekspresję MMP-1, 2, 13 i 14 oraz TIMP-1 i 3, z czego w przypadku przerzutów dominują MMP-2 i 14 oraz TIMP-2. Natomiast ekspresja MMP-9 ogranicza się do wczesnych faz czerniaka [35]. Ekspresja MMPs może być regulowana także przez sam nowotwór. Wynika to ze zdolności komórek czerniaka do produkcji czynnika EMMPRIN. Czynniki te pobudzają fibroblasty otaczające nowotwór do syntezy MMPs [28]. Ekspresja czynnika EMMPRIN jest jednak, podobnie jak ekspresja MMP-9, ograniczona do fazy szerzenia się powierzchniowego [35].

Udział aktywnych MMP w progresji zmian nowotworowych nie ogranicza się jedynie do wzmoczonej degradacji strukturalnych składników ECM [33]. Metaloproteinazy macierzy mogą uwalniać immunoregulujące molekuly, takie jak cytokiny i czynniki wzrostu i/lub ich receptory z błon komórkowych i z kompleksowych połączeń z ECM, zwiększając w ten sposób ich dostępność i potęgując działanie, tak jak w przypadku TGF- β [40]. Metaloproteinazy macierzy mogą także rozkładać cytokiny i czynniki wzrostu, na przykład IL-1 β . Te same cytokiny, które mogą wpływać na ekspresję MMP, mogą także ulec enzymatycznym przemianom pod wpływem MMP [33].

Podsumowanie

Aktywność MMP w zdrowych komórkach jest precyzyjnie regulowana na poziomie transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym. Natomiast w tkankach nowotworowych metaloproteinazy wytwarzane są w dużych ilościach przez pobudzone komórki zrębu otaczającego nowotwór. Obecnie poszukuje się metod, które pozwoliłyby na wykrycie przedprzerzutowego stadium zmian komórek transformowanych nowotworowo.

Wczesne wykrywanie komórek transformowanych nowotworowo umożliwia wdrożenie takich metod terapeutycznych, które zwiększają prawdopodobieństwo wyleczenia lub wydłużają czas przeżycia.

Batimastat (BB-94) jest związkiem hydroksamatowym działającym przez chelatowanie jonów cynku, blokując w ten sposób centrum aktywne metaloproteinaz. Jest silnym, ale mało swoistym inhibitorem MMP-1, 2, 3, 7 i 9. W badaniach na mysim modelu czerniaka lek ten wykazuje hamujące działanie na tworzenie przerzutów.

Marimastat (BB2516) jest również niskocząsteczkowym syntetycznym inhibitorem MMP. Jego działanie polega na blokowaniu cynku w centrum aktywnym metaloproteinaz, hamując w ten sposób aktywność MMP-1, 2, 7 i 9.

Bibliografia

- [1] Wojas-Pelc A., Rajzer L., Jaworek A., Woźniak W., *Najnowsze metody diagnostyczne i leczenie w czerniaku*, „Przegląd Lekarski” 2006, nr 63, s. 674–680.
- [2] Wąsik F., Szepietowski J., *Czerniak złośliwy – zasady wczesnej diagnostyki*, „Medi-press. Dermatologia” 1997, nr 2, s. 11–19.
- [3] Pawlak W. Z., Wawrocka-Pawlak M., Szczylik C., *Biologia molekularna czerniaka skóry*, „Współczesna Onkologia” 2003, nr 8, s. 548–555.
- [4] Wolnicka-Głubisz A., Płonka P. M., *Rola promieniowania UV w etiopatogenezie czerniaka skóry*, „Współczesna Onkologia” 2007, nr 11, s. 419–429.
- [5] Freinkel R. K., Woodley D. T., *The Biology of the Skin*, [w:] *The Biology of Melanocytes*, red. J. N. Nordlund, R. E. Boissy, chapter 7, Parthenon Publishing, Nashville 2001, s. 113–131.
- [6] Wojas-Pelc A., Kaczorowska-Stawarz R., Knafel A., *Bielactwo nabyte – proces melanogenezy, etiopatogeneza, metody leczenia*, „Dermatologia Estetyczna” 2005, nr 3, s. 121–128.
- [7] Tsatmali M., Ancans J., Thody A. J., *Melanocyte Function and its Control by Melanocortin Peptides*, „The Journal of Histochemistry & Cytochemistry” 2002, nr 50 (2), s. 125–133.
- [8] Lesiak K., Sztiller-Sikorska M., Czyż M., *Czynniki transkrypcyjne w powstawaniu i progresji czerniaka*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 2007, nr 61, s. 576–595.
- [9] Kaszuba A., Schwartz R. A., Trznadel-Budźko E., Dobrska-Drobnik G., Seneczko M., *Melanoma malignum (część I) – epidemiologia i etiopatogeneza*, „Dermatologia” 2001, nr 8 (8), s. 769–773.
- [10] Langiewicz P., Paprocka-Langiewicz J., Leśniewski-Kmak K., Sarosiek T., Żolnierrek J., Pawlak W., *Biochemioterapia przerzutowego czerniaka skóry – doświadczenia kliniczne i analiza perspektyw*, „Współczesna Onkologia” 2003, nr 7 (8), s. 611–618.
- [11] Rothhammer T., Bosserhoff A. K., *Epigenetic Events in Malignant Melanoma*, „Pigment Cell Research” 2007, nr 20, s. 92–111.
- [12] Trzmiel D. A., Wyględowska-Kania E., Lis A. D., Pierzchała E. K., Brzezińska-Wcisło L. A., *Współczesne spojrzenie na leczenie czerniaka złośliwego*, „Wiadomości Lekarskie” 2002, R. LV, nr 9–10, s. 608–615.
- [13] Lamparska K., Przybyła A., Kaczmarek A., Leporowska E., Mackiewicz A., *Podłoże genetyczne czerniaka – badania własne i przegląd piśmiennictwa*, „Współczesna Onkologia” 2006, nr 6, s. 297–302.

- [14] Goździcka-Józefiak A., Bobowicz M. A., Kędzia H., *Genetyka molekularna i biochemia wybranych chorób u ludzi*, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2001, s. 154–155.
- [15] Drewa G., Powierska-Czarny J., *Genetyczne podłoże czerniaka złośliwego*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 1998, nr 52 (4), s. 367–380.
- [16] Brudnik U., Wojas-Pelc A., Branicki W., *Genetyczne uwarunkowania czerniaka*, „Postępy Dermatologii i Alergologii” 2006, R. XXIII, nr 1, s. 21–25.
- [17] Harland M., Sushila Mistry D., Bishop T., Newton Bishop J. A., *A Deep Intronic Mutation in CDKN2A is Associated with Disease in Subset of Melanoma Pedigrees*, „Human Molecular Genetic” 2001, nr 10, s. 2679–2686.
- [18] Kamijo T., Weber J. D., Zambetti G., Zindy F., Roussel M. F., Sherr C. J., *Functional and Physical Interactions of the ARF Tumor Suppressor with p53 and Mdm2*, „Proceedings of the National Academy of Sciences” 1998, nr 95, s. 8292–8297.
- [19] Demunter A., Stas M., Degreef H., De Wolf-Peeters C., van den Oord J. J., *Analysis of N- and K-ras Mutations in the Distinctive Tumor Progression Phases of Melanoma*, „Journal of Investigative Dermatology” 2001, nr 117, s. 1483–1489.
- [20] Gray-Schopfer V.C., da Rocha Dias S., Marais R., *The Role of B-RAF in Melanoma*, „Cancer Metastasis Review” 2005, nr 24, s. 165–183.
- [21] Berwick M., Wiggins C., *The Current Epidemiology of Cutaneous Malignant Melanoma*, „Frontiers in Bioscience” 2006, nr 11, s. 1244–1254.
- [22] Kierszenbaum A. L., *Histology and Cell Biology. An Introduction to Pathology*, chapter 11: *Integumentary System*, Mosby Elsevier 2007, s. 335–338.
- [23] Wawrocka-Pawlak M., Pawlak W. Z., *Biologia molekularna czerniaka skóry*, „Współczesna Onkologia” 2003, nr 7–8, s. 548–555.
- [24] Bień S., *Czerniak złośliwy w obrębie głowy i szyi*, „Otorynolaryngologia” 2005, nr 4 (3), s. 113–120.
- [25] Jabłońska S., Chorzelski T., *Choroby skóry. Dla studentów medycyny i lekarzy*, PZWL, Warszawa 2002.
- [26] Wideł M. S., Wideł M., *Mechanizmy przerzutowania i molekularne markery progresji nowotworów złośliwych. I. Rak jelita grubego*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 2006, nr 60, s. 453–470.
- [27] Łapińska J., *Metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej w inwazji nowotworów*, „Współczesna Onkologia” 1999, nr 3, s. 120–122.
- [28] Wawrzycka-Kaflik A., Pełka M., Broniarczyk-Dyła G., *Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej i ich tkankowe inhibitory. Charakterystyka biochemiczna i znaczenie kliniczne*, „Dermatologia Estetyczna” 2007, nr 9, s. 209–217.
- [29] Egeblad M., Werb Z., *New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression*, „National Review of Cancer” 2002, nr 2, s. 163–176.
- [30] Śliwowska I., Kopczyński Z., *Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej – charakterystyka biochemiczna i kliniczna wartość oznaczania u chorych na raka piersi*, „Współczesna Onkologia” 2005, nr 8, s. 327–335.

- [31] Przybyłowska K., Błasiak J., *Metaloproteazy i ich rola w progresji nowotworów*, „Postępy Biochemii” 2001, nr 3, s. 212–223.
- [32] Łapka A., Goździalska A., Jaśkiewicz J., *Rola metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w nowotworach piersi, ze szczególnym uwzględnieniem roli żelatynazy A oraz żelatynazy B*, „Postępy Biologii Komórki” 2006, nr 4, s. 683–695.
- [33] Bogaczewicz J., Jasielski P., Mosiewicz A., Trojanowski T., Suchożebrska-Jesioneck D., Stryjecka-Zimmer M., *Rola metaloproteaz macierzy i tkankowych inhibitorów metaloproteaz w inwazji nowotworów pochodzenia neuroepitelialnego*, „Neurologia i Neurochirurgia Polska” 2006, nr 5, s. 404–412.
- [34] Hofmann U. B., Westphal J. R., Van Muijen G. N., Ruitter D. J., *Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma*, „Journal of Investigative Dermatology” 2000, nr 3, s. 337–344.
- [35] Bogaczewicz J., Chodorowska G., Krasowska D., *Rola metaloproteaz macierzy i tkankowych inhibitorów metaloproteaz w progresji nowotworów skóry a nowe strategie farmakologicznej inhibicji metaloproteaz macierzy*, „Przegląd Dermatologiczny” 2004, nr 91, s. 153–160.
- [36] Kołomecki K., *Hamowanie funkcji metaloproteinaz – możliwości zastosowania klinicznego*, „Onkologia Polska” 2000, nr 3, s. 163–167.
- [37] Kycler W., Grodecka-Gazdecka S., Bręborowicz J., Filas V., Teresiak M., *Prognostic Value of Select Immunohistochemical Markers in Skin Melanoma*, „Nowotwory” 2002, nr 6, s. 487–495.
- [38] Hsu M.-Y., Meier F., Herlyn M., *Melanoma Development and Progression: a Conspiracy between Tumor and Host*, „Differentiation” 2002, nr 70, s. 522–536.
- [39] Duffy M. J., Maguire T. M., Hill A., McDermott E., O’Higgins N., *Metalloproteinases: Role in Breast Carcinogenesis, Invasion and Metastasis*, „Breast Cancer Research” 2000, nr 2, s. 252–257.
- [40] Yu Q., Stamenkovic I., *Cell Surface-localized Matrix Metalloproteinase-9 Proteolytically Activates TGF-beta and Promotes Tumor Invasion and Angiogenesis*, „Genes and Development” 2000, nr 14, s. 163–176.