

Magdalena BODNAR<sup>1</sup>  
 Hanna REKWIROWICZ<sup>1</sup>  
 Paweł BURDUK<sup>2</sup>  
 Robert BILEWICZ<sup>2</sup>  
 Wojciech KAŻMIERCZAK<sup>2</sup>  
 Andrzej MARSZAŁEK<sup>1,3</sup>

## Intensywność wypalanych papierosów a biologia raka płaskonabłonkowego krtani

### Impact of tobacco smoking on biologic background of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma

<sup>1</sup>Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,  
 Collegium Medicum  
 im. L. Rydygiera w Bydgoszczy,  
 Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej

<sup>2</sup>Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,  
 Collegium Medicum im. L. Rydygiera  
 w Bydgoszczy,  
 Katedra i Klinika Otolaryngologii

<sup>3</sup>Uniwersytet Medyczny  
 im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu,  
 Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej

#### Dodatkowe słowa kluczowe:

rak krtani  
 markery procesu nowotworowego

#### Additional key words:

laryngeal cancer  
 cancer markers

*Badania przeprowadzono na materiale archiwalnym zgromadzonym w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej CM UMK w Bydgoszczy. Przeprowadzone badania nie wpłynęły w żaden sposób na modyfikację, wdrożenie, odstępstwo, zniekształcenie, czy jakiegokolwiek inne zmiany procedur diagnostycznych oraz terapeutycznych u pacjentów.*

Wśród czynników związanych ze zwiększonym występowaniem raka krtani szczególną uwagę zwraca się na palenie tytoniu. Związane jest to z obecnością w dymie tytoniowym substancji chemicznych o charakterze mutagennym i kancerogennym. Substancje te penetrują komórki, wnikają do jąder komórkowych, gdzie w konsekwencji powodują uszkodzenie materiału genetycznego. Kumulacja mutacji prowadzi do nabycia przez komórki zdolności do inwazji miejscowej, a tym samym inicjacji procesu nowotworowego. Badaniem objęto grupę 11 pacjentów wybranych spośród wszystkich przypadków raka krtani, które poddano diagnostyce w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej w Bydgoszczy w 2008r. Wykonano barwienia immunohistochemiczne w celu oceny lokalizacji cytoplazmatycznego białka MMP-2. Dokonano także oceny ekspresji antygenów będących wskaźnikami proliferacji komórkowej: PCNA i Ki-67 oraz określono ich korelację z procesem nowotworowym. Analizowanych pacjentów podzielono na dwie grupy: osoby palące do 20 papierosów dziennie i powyżej 20 papierosów dziennie. U wszystkich pacjentów rozpoznano płaskonabłonkowego raka krtani o stopniu złośliwości histologicznej G2. Dokonano oceny klinicznego stopnia zaawansowania procesu nowotworowego zgodnie z klasyfikacją TNM. U pacjentów oceniono stopień zaawansowania miejscowego nowotworu (T): T2-T4, węzłowego (N): N0 - N3 oraz obecność przerzutów odległych (M) - u wszystkich pacjentów stwierdzono M0. Zaobserwowano podobieństwa w poziomie ekspresji analizowanych białek w poszczególnych grupach pacjentów. U pacjentów palących do 20 papierosów dziennie obserwowano zmniejszoną ekspresję MMP-2, PCNA oraz Ki-67 w porównaniu z pacjentami wypalającymi większe ilości papierosów. Tendencję taką zaobserwowano zarówno w komórkach nowotworowych jak i dysplastycznych. Stwierdzono różnice poziomów ekspresji badanych markerów uwzględniając intensywność ekspozycji na dym tytoniowy. Prawdopodobnie stanowi to odzwierciedlenie różnego stopnia uszkodzenia komórek.

The most common risk factors related to the occurrence of laryngeal cancer is related to tobacco smoking. It is interlinked to the presence of chemical substance in tobacco smoke. These substances are mutagenic factors and they are carcinogens. These substances penetrate cell, they penetrate cellular nucleus and in consequence, it causes damage to the genetic material. Accumulation of mutations enables cells to conduct local invasion, and it initiates tumor invasion and metastasis. We used tissue samples from 11 patients that were selected from all head and neck specimens and diagnosed at Department of Clinical Pathology in Bydgoszcz in 2008. We have made immunohistochemical staining in order to describe localization of MMP-2. Furthermore, the expression of proliferative antigens: PCNA and Ki-67 in laryngeal carcinoma and their relations to tumor invasion and metastasis were measured. We divided patients into two groups: people who smoke less than 20 cigarettes a day and people who smoke over 20 cigarettes a day. All patients were diagnosed with a squamous cell carcinoma with histological grade G2. Tumors were staged according to the TNM classification. Studied patients were classified ranging T2 - T4, N0 - N3 and all were M0. We found out similarities in expression of analyzing antigens in individual groups of patients. We observed decreased expression of MMP-2, PCNA and Ki-67 amongst patients who smoke less than 20 cigarettes a day in comparison with patients who smoke more than 20 cigarettes a day. We noticed such trend in tumor cells and in dysplastic cells. We certify differences between levels of expression of researched markers according they intensity of exposure on tobacco smoking. Probably those differences may represent different levels of cell damage.

#### Adres do korespondencji:

Dr hab. Andrzej Marszałek, prof. UMK  
 Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej  
 Collegium Medicum im. L. Rydygiera  
 w Bydgoszczy  
 Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
 85-094 Bydgoszcz,  
 ul. M. Skłodowskiej-Curie 9  
 Tel. (+52) 585 42 00; Fax. (+52) 585 40 49  
 e-mail: amars@cm.umk.pl

## Wstęp

Rak krtani (*Laryngeal carcinoma*) jest jednym z najczęściej występujących nowotworów w obrębie głowy i szyi i stanowi szósty, co do częstości występowania nowotwór złośliwy na świecie [7, 10].

U mężczyzn stanowi ok. 5% wszystkich guzów złośliwych i jest czwartym, co do częstości występowania nowotworem złośliwym, po raku płuc, żołądka oraz prostaty. Natomiast u kobiet zajmuje 27. miejsce wśród nowotworów złośliwych, obejmując 0,6% wszystkich rozpoznawalnych nowotworów złośliwych [7, 10].

Częstość występowania raka krtani jest ok. 7 razy większa u mężczyzn niż u kobiet [10], a współczynnik zachorowalności w Polsce wynosi obecnie 7,7:1,0 [M:K], zmieniając się stale na niekorzyść kobiet [10, 26]. Ponadto rocznie odnotowuje się ok. 2-3 krotny wzrost zachorowań na raka krtani u kobiet [26].

Wykazano, iż największa zachorowalność na ten typ nowotworu przypada na 6. i 7. dekadę życia, a w tym przedziale wiekowym diagnozowanych jest około 65% chorych na raka krtani [26].

Wśród wszystkich złośliwych nowotworów krtani, aż 95% stanowi rak płaskonabłonkowy (ang. Squamous cell carcinoma, łac. Carcinoma planoepitheliale). Nabłonek pokrywający górny odcinek przewodu oddechowego i pokarmowego (jama ustna, gardło, krtani, jama nosowa oraz zatoki boczne nosa) ulega ekspozycji na wiele czynników karcenogennych inicjujących proces transformacji nowotworowej [15].

W etiologii raka krtani istotną rolę odgrywają przede wszystkim czynniki środowiskowe, jednak coraz częściej zwraca się również uwagę na udział czynników genetycznych predysponujących do wystąpienia nowotworu [7, 15, 23]. Wśród czynników związanych ze zwiększonym występowaniem raka krtani zwraca się szczególną uwagę na palenie papierosów oraz nadużywanie alkoholu [7, 15]. Związane jest to z oddziaływaniem substancji chemicznych wykazujących właściwości mutagenne oraz kancerogenne. Należą do nich przede wszystkim benzo(a)piren, niektóre aminy aromatyczne oraz N-nitrozaminy [3, 23]. Ponadto wyróżnia się także ekspozycję na czynniki środowiskowe. Wśród najczęściej wymienianych są: dym tytoniowy w środowisku (osoby narażone, zwane zwyczajowo „biernymi palaczami”), a także narażenie w miejscu pracy, gdzie rejestruje się działanie takich czynników jak: pył drzewny, produkty powstające podczas destylacji węgla, nikiel, azbest, kauczuk, guma, produkty przemysłu garbarskiego, farby, rozpuszczalniki, spaliny olejów napędowych. Podniesiono także udział takich czynników jak: rozmieszczenie geograficzne, czynniki demograficzne, wirusy (HIV, HPV, HSV), refluks żołądkowo-przełykowy, dieta, stany przedrakowe lub występowanie innych chorób współistniejących (np. astma oskrzelowa, gruźlica) [7, 15, 23].

Kancerogeneza jest złożonym procesem, u którego podstaw leży proces transformacji nowotworowej poszczególnych komórek, uzyskanie fenotypu nowotworowego oraz przekazywanie tych właściwości

Tabela I

## Charakterystyka grupy badanej.

Characteristics of studied group.

	Liczba osób	Średnia wieku [lata]	Płeć [K/M]	Klasyfikacja TNM		
				T [1/2/3/4] [liczba osób]	N [0/1/2/3] [liczba osób]	M [0/1] [liczba osób]
Grupa A	9	57	1/8	0/2/4/3	5/3/0/1	9/0
Grupa B	2	58,5	0/2	0/0/2/0	0/1/1/0	2/0

K - Kobiety; M - Mężczyźni

komórkom potomnym pod wpływem działania m.in. czynników egzogennych – kancerogenów (np. dymu tytoniowego). Komórki o fenotypie nowotworowym charakteryzują się niepojętym wzrostem związanym z wysoką niestabilnością genetyczną, utratą zdolności do różnicowania, a także nabywaniem zdolności do inwazji i przerzutów [15, 20, 23].

Podkreśla się, że ryzyko występowania raka krtani wzrasta wraz liczbą wypalanych dziennie papierosów, a także jest ono większe u osób, które wcześniej rozpoczęły palenie [15]. Wykazano także, że palenie dziennie ponad 20 papierosów oraz spożywanie wysokoprocentowych alkoholi przez ponad 15 lat może powodować zwiększenie ryzyka zachorowania na raka krtani ok. 330 razy [15].

Dym tytoniowy w znacznym stopniu dysponuje do wystąpienia raka krtani. Z przedstawionych analiz wynika, że ok. 95% chorych na nowotwory krtani to palacze tytoniu [7]. Dym tytoniowy powstający podczas niepełnego spalania tytoniu zawiera ponad 4 tys. związków chemicznych, wśród których ponad 60 stanowią mutageny [3]. Najważniejszym składnikiem dymu tytoniowego odpowiedzialnym za uzależnienie jest nikotyna. Natomiast za właściwości mutagenne i kancerogenne odpowiedzialne są m.in. policykliczne węglowodory aromatyczne, związki heterocykliczne, N-nitrozaminy, aminy aromatyczne, aminy N-heterocykliczne, reaktywne formy tlenu [3, 7, 23].

Podczas spalania papierosa powstają dwa strumienie dymu; główny (MS - ang. mainstream smoke) oraz boczny (SS - ang. sidestream smoke). MS uwalniany jest z końca papierosa, posiada mniejsze stężenie niektórych mutagenów, jednak średnica cząsteczek wchodzących w jego skład jest mniejsza w porównaniu z cząsteczkami strumienia bocznego, zatem mogą one łatwo przenikać do komórek, a następnie jądra komórkowego ostatecznie powodując uszkodzenia DNA [3]. Ponadto zawiera on znaczne ilości wolnych rodników, co powoduje jego zwiększoną "toksyczność" w stosunku do tkanek [7, 23]. Największym zagrożeniem dla komórki pozostaje ekspozycja na działanie reaktywnych form tlenu i wolnych rodników [23]. Znajdują się one zarówno w substancjach smolistych oraz fazy gazowej pochodzących z papierosów, a ich stężenie znacznie przewyższa poziom pozostałych kancerogenów. Pomimo tego, że biorą one udział w aktywacji transkrypcji genów, odpowiadzi przeciwzapalnej, stanowią także przyczynę uszkodzeń DNA oraz białek [3, 7].

Najbardziej wrażliwym elementem DNA

na działanie substancji toksycznych jest guanina. Uszkodzenia DNA powstałe w wyniku działania kancerogenów prowadzą m.in. do zwiększenia niestabilności cząsteczki DNA oraz niewłaściwego parowania zasad azotowych w czasie naprawy lub powielania DNA, zablokowania miejsc wiążących enzymy, które uczestniczą w procesach replikacji i biosyntezy białka, stając się bezpośrednią przyczyną rozwoju procesu nowotworowego [3, 15, 23].

## Materiał i metody

### Grupa badana

Badaniem objęto grupę 11 wybranych pacjentów spośród wszystkich przypadków raka krtani, które poddano diagnostyce w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej w Bydgoszczy w 2008r. W grupie badanej było 10 mężczyzn i 1 kobieta w wieku od 44 do 69 lat (średnia wieku - 58 lat). W badaniu podmiotowym w Klinice Otolaryngologii Szpitala Klinicznego im. dr A. Jurasza w Bydgoszczy zwrócono szczególną uwagę na dane epidemiologiczne, takie jak: wiek, płeć, miejsce zamieszkania (miasto, wieś), palenie czynne/bierne, ilość wypalanych papierosów dziennie, częstość spożywania alkoholu (w tygodniu). U wszystkich pacjentów wykonano laryngektomie; w rutynowych badaniach histopatologicznych rozpoznano płaskonabłonkowego raka krtani (Squamous Cell Carcinoma) o stopniu złośliwości histologicznej G2. Dokonano oceny klinicznego stopnia zaawansowania procesu nowotworowego zgodnie z klasyfikacją TNM (IUAC), opierającą się na lokalizacji ogniska pierwotnego oraz stopniu zaawansowania miejscowego (T), węzłowego (N) oraz obecności przerzutów odległych (M).

Uwzględniając ilość wypalanych dziennie papierosów, pacjentów podzielono na dwie następujące grupy badawcze:

A - osoby palące do 20 papierosów dziennie;

B - osoby palące powyżej 20 papierosów dziennie (tabela I).

Analizie poddano preparaty tkankowe pochodzące z materiału pooperacyjnego. Zostały one rutynowo utrwalone w 10% formalinie buforowanej, opracowane oraz zatopione w bloczki parafinowe. Materiał został skrojony na skrawki o grubości 4 lub 5 µm (4 µm - reakcja immunohistochemiczna, 5 µm - barwienie HE). Barwienia immunohistochemiczne wykonano w celu zbadania lokalizacji MMP-2 oraz oceny ekspresji PCNA, Ki-67 w badanej tkance.

MMP-2 - (ang. *matrix metalloproteinase 2*) (złatynaza A), endopeptydaza zlokalizowana w cytoplazmie, posiada zdolność degradacji kolagenu IV, odgrywa istotną rolę w procesie inwazji nowotworu.

PCNA - (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) wielofunkcyjne białko jądrowe (m.c. 32 kDa) będące wskaźnikiem proliferacji komórkowej oraz ściśle związane z replikacją DNA.

Ki-67 - niehistonowe białko jądrowe (m.c. 35-40 kDa) obecne jedynie w komórkach proliferujących, będące wskaźnikiem aktywności proliferacyjnej komórki.

### Badania immunohistochemiczne:

Skrawki o grubości 4 µm deparafinizowano, uwodniono oraz płukano w wodzie destylowanej. Determinanty antygenowe zostały odsonięte w buforze cytrynianowym pH 6 w kuchenke mikrofalowej (dla oznaczeń MMP-2)

oraz w buforze EDTA o pH 8 w łaźni wodnej (dla oznaczeń PCNA). Aktywność endogennej peroksydazy została zablokowana poprzez inkubację skrawków w 3% roztworze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w temperaturze pokojowej. Natomiast przygotowanie skrawków materiału do oceny ekspresji Ki-67 przygotowano wykorzystując PT-Link (DAKO, Denmark). Następnie za pomocą surowicy bydlęcej (5% BSA) zablokowano miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał. Kolejno skrawki inkubowano z przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko MMP-2, PCNA (Novocastra Laboratories, Newcastle UK) oraz Ki-67 (DAKO, Denmark), rozcieńczone odpowiednio (1:100, 1:50, 1:25) w 1% roztworze BSA (BSA+PBS). Następnie przeprowadzono inkubację z drugorzędowym przeciwciałem (DAKO EnVision TM+ System Labelled Polymer HRP - Anti Mouse, DAKO). Lokalizację kompleksu antygen przeciwciała uwidoczniono poprzez dodanie 3,3'-diaminobenzyny, jako chromogenu (DAB(+) Chromogen, DAB(+) Substrate Buffer, DAKO Denmark). Następnie w celu uwidocznienia jąder komórkowych skrawki barwiono hematoksyliną, odwodniono, prześwietlono i zamknięto w balsamie kanadyjskim.

Ocenę mikroskopową przeprowadzono w 5 polach mikroskopowych, przy powiększeniu obiektywu 20x dla MMP-2 oraz przy powiększeniu obiektywu 40x dla PCNA i Ki-67. Lokalizację odpowiednich antygenów definiowano na podstawie obecności barwnego produktu reakcji DAB. Oceniano reakcję cytoplazmatyczną dla MMP-2 oraz jądrową dla PCNA i Ki-67. Intensywność reakcji oceniano jako: 0 - brak odczynu barwnego, 1 - słabe zabarwienie komórek, 2 - średnie zabarwienie komórek, 3 - intensywne zabarwienie komórek.

### Wyniki

W wyniku przeprowadzonych badań z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko: MMP-2, PCNA oraz Ki67 stwierdzono obecność ocenianych antygenów we wszystkich analizowanych próbkach.

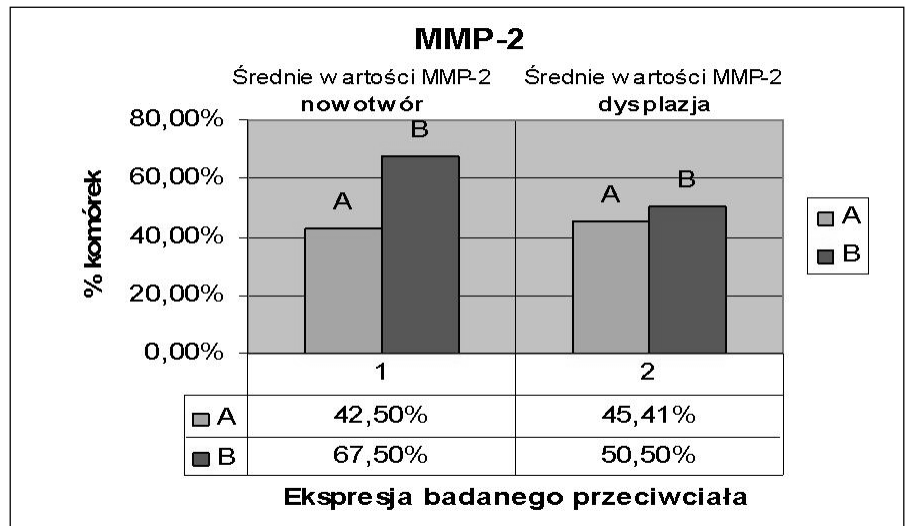
W poszczególnych grupach badanych zaobserwowano podobieństwa w poziomie ekspresji analizowanych białek. Uwzględniając przyjętą skalę oceny, u pacjentów palących do 20 papierosów dziennie obserwowano zmniejszoną ekspresję MMP-2 w porównaniu z pacjentami wypalającymi większe ilości papierosów. Tendencję taką zaobserwowano zarówno w komórkach nowotworowych jak i dysplastycznych (rycina 1).

Podobną zależność do opisanej powyżej odnotowano analizując ekspresję PCNA. Niższy odsetek komórek nowotworowych oraz dysplastycznych z silną ekspresją tego antygeny zaobserwowano w grupie A (rycina 2).

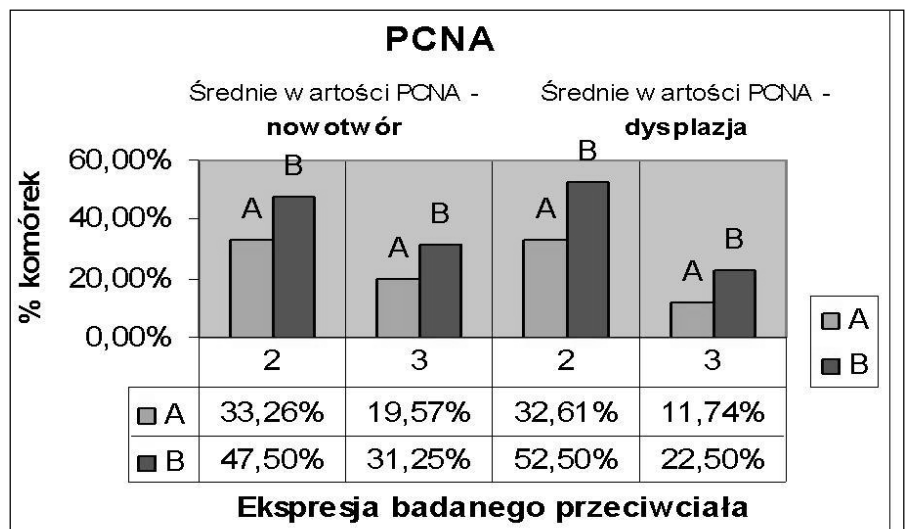
W badaniach materiału klinicznego prowadzonych z użyciem przeciwciała dla Ki-67 wykazano wysoką ekspresję tego antygeny w zaledwie 9% analizowanych komórek pochodzących od pacjentów zakwalifikowanych do grupy B. Natomiast nieco niższa ekspresja (5%) była stwierdzona w komórkach u pacjentów grupy A.

Na rycinie 1. przedstawiono średnie wartości ekspresji MMP-2 w poszczególnych grupach. Dodatkowe oznaczenie: A - pacjenci wypalający do 20 papierosów dziennie; B - pacjenci wypalający powyżej 20 papierosów dziennie.

Na rycinie 2. przedstawiono średnie wartości ekspresji PCNA w poszczególnych grupach. Dodatkowe oznaczenie: A - pacjenci wypalający do 20 papierosów dziennie; B - pacjenci wypalający powyżej 20 papierosów dziennie.



Rycina 1  
Poziomy ekspresji żelatynazy A (MMP-2) w obrębie utkania raka krtani oraz zmian dysplastycznych.  
Levels of expression of Gelatinase A (MMP-2) in tumor cells and in tumor stroma.



Rycina 2  
Poziomy ekspresji jądrowego antygeny proliferacyjnego (PCNA) w materiale tkankowym raka krtani oraz nabłonku z dysplazją.  
Levels of expression of proliferative cell nuclear antigen (PCNA) in tumor cells of laryngeal carcinoma and dysplastic epithelium.

### Omówienie

Inicjacja procesu nowotworowego uzależniona jest od nabycia przez komórki nowotworowe fenotypu inwazyjnego. Determinuje to w konsekwencji zdolność komórek do naciekania otaczających tkanek, jak również tworzenia przerzutów w miejscach odległych od ogniska pierwotnego [5].

Nowotwory płaskonabłonkowe rozwijające się w obszarze głowy i szyi wywodzą się z nabłonka wielowarstwowego płaskiego lub gruczołowego [5]. W przypadku tego drugiego pod wpływem działania kancerogenów m.in. dymu tytoniowego najczęściej ulega on najpierw metaplastacji płaskonabłonkowej i ewentualnie przy nagromadzeniu kolejnych zaburzeń genetycznych, poprzez zmiany dysplastyczne dochodzi do nowotworzenia. Mutageny zawarte w dymie tytoniowym penetrują komórki, wnikają do jądra komórkowego, gdzie powodują uszkodzenie materiału genetycznego. Kumulacja mutacji doprowadza komórki do utraty cech dojrzałości, utraty specjalizacji czynnościowej,

we, a przede wszystkim nabycia przez nie zdolności do inwazji miejscowej, a tym samym inicjacji procesu nowotworowego [23].

Rak krtani jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym obszaru głowy i szyi. Do najistotniejszych czynników uczestniczących w etiologii tego nowotworu zalicza się palenie tytoniu. Wykazano, iż u osób z rakiem krtani około 95% to palacze tytoniu [7]. Badania Kocha i wsp. [9] wykazały ogniska raka pierwotnego aż u 39% osób palących, podczas gdy u osób niepalących odsetek ten wynosił zaledwie 9%. Podobne wyniki przedstawił Tan i wsp. [24] lokalizując pierwotne ognisko nowotworu w krtani u 41% osób palących i 15% pacjentów niepalących. Przyjmuje się, że w skali ogólnoświatowej pierwotne ogniska raka zlokalizowane w krtani osób palących papierosy wynoszą ok. 40%, natomiast w Polsce wartość ta przekracza 60% [7,9,24].

Wciąż poszukuje się parametrów, które pozwoliłyby na bardziej precyzyjne monitorowanie procesu nowotworowego raka pła-

skonabłonkowego krtani. Z tego względu niezwykle istotne są badania dotyczące m.in. markerów proliferacji komórkowej tj. PCNA, Ki-67. Ponadto, ze względu na możliwość nacieku, ważną wydaje się być ocena ekspresji metaloproteinaz, a w szczególności MMP-2, będących enzymami proteolitycznymi uczestniczącymi zarówno w fizjologicznych, jak i patologicznych procesach przebudowy macierzy tkankowej [28]. Metaloproteinazy stanowią grupę cynkoależnych enzymów, mających zdolność niszczenia składników wchodzących w skład macierzy wewnątrzkomórkowej m.in. gelytyny, kolagenu typu I, składników błony podstawnej, a także degradacji czynników wzrostu oraz receptorów znajdujących się na powierzchni komórek nowotworowych [6]. Całość zmian w konsekwencji prowadzi do nabycia dodatkowych cech przez zmienione komórki i ostatecznie do ekspansji nowotworów. Wielu autorów podkreśla znaczenie poziomu ekspresji MMP-2 zarówno w ocenie inwazji nowotworów, w progresji tego procesu, a także w powstaniu przerzutów do węzłów chłonnych [6,13,28]. Ze względu na działanie tego enzymu, ułatwiające migrację komórek nowotworowych stwierdzono także wpływ ekspresji MMP-2 na wartość prognostyczną w ocenie czasu przeżycia chorych m.in. z rakiem płaskonabłonkowym obszaru głowy i szyi [13,19]. Niemniej jednak migracja komórek nowotworowych oraz ich zdolność do tworzenia przerzutów odległych uwarunkowana jest obecnością różnych enzymów należących do endopeptydaz, w tym w szczególności MMP-2.

Analiza wyników badań dotyczących lokalizacji MMP-2 jednoznacznie wskazuje na ich obecność zarówno w cytoplazmie komórek nabłonkowych, ale także w łącznotkankowym zrębie [6,18,]. Badania przeprowadzone przez *Yoshizaki* i wsp. [28] wykazały, że białka: MMP-2, MT1-MMP oraz TIMP obecne są przede wszystkim na powierzchni oraz w cytoplazmie komórek pochodzących z pierwotnych guzów języka. Ci sami autorzy stwierdzili także obecność MMP-2 w komórkach zrębu łącznotkankowego. Podobne obserwacje odnotowano również w niniejszej pracy. Antygen obecny był zarówno w komórkach zrębu łącznotkankowego, jak i w komórkach nowotworowych raka płaskonabłonkowego krtani. Podkreślić należy, iż w obecnych badaniach zaobserwowano różnice w poziomach ekspresji tego białka w poszczególnych lokalizacjach. Stwierdzono zwiększoną ekspresję MMP-2 w utkaniu guza w stosunku do ekspresji tego antygeny w zrębie łącznotkankowym.

Dotychczasowe wyniki badań wskazują na obecność MMP-2 w utkaniu guza, co może stanowić wskaźnik aktywacji procesu inwazji nowotworowej oraz w konsekwencji zjawisko powstawania przerzutów [6,18,28]. Wysoka ekspresja tego białka związana jest również ze złym rokowaniem raka płaskonabłonkowego obszaru głowy i szyi [6,13]. Wielu autorów podkreśla, że silna ekspresja MMP-2 w utkaniu guza stanowi istotny element w przebiegu procesu nowotworowego [6,28]. Analiza badań przeprowadzonych przez *Liu* i wsp. [13] wykazała, że 50% komórek raka płaskonabłonkowego krtani charakteryzuje się wysoką ekspresją białka

MMP-2. Podobne obserwacje stwierdzono w odniesieniu do innych nowotworów. Wśród różnych nowotworów odsetek tego antygeny wynosi od 21% do 100% [2,16]. W raku niedrobnokomórkowym płuc ekspresja MMP-2 wynosi 24,7% [2], natomiast w przypadku raka żołądka także jest 81,6% [16]. Badania dowodzą także, że poziom ekspresji MMP-2 w komórkach utkania m.in. raka piersi, płuc, żołądka, a także niektórych obszarów nowotworów głowy i szyi koreluje ze stopniem zaawansowania zmian miejscowych nowotworu, a także z przerzutami [2,16,28].

Niemniej jednak wnioski zawarte w doniesieniach dotyczących ekspresji MMP-2, odnoszących się do wykorzystania go jako klinicznego wskaźnika prognostycznego w raku płaskonabłonkowym krtani (m.in. do obszaru ogniska guza pierwotnego, a także do obecności przerzutów do węzłów oraz odległych tkanek) nie są jednoznaczne [6,13]. *Yoshizaki* i wsp. [28] oceniali ekspresję MMP-2 oraz TIMP w rakach płaskonabłonkowych języka. Badania nie potwierdziły korelacji pomiędzy silną ekspresją tych białek a miejscowym zaawansowaniem zmian nowotworowych (cecha T). Podobne wyniki uzyskały dwa inne zespoły badawcze - *Kawata* i wsp. [8] oraz *Liu* i wsp. [13]. Analiza ekspresji MMP-2 i MMP-9 w rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi, nie potwierdziła zależności pomiędzy ekspresją tych metaloproteinaz a cechą T. Odmienne wyniki uzyskali *Kurahara* i wsp. [11], którzy wykazali korelację pomiędzy obecnością białek z rodziny MMP (w tym także MMP-2) a miejscowym zaawansowaniem nowotworu. Niejednoznaczne są również wyniki badań dotyczące zależności pomiędzy MMP a zaawansowaniem zmian węzłowych (cecha N) [12,18]. Badania *Kurahary* i wsp. [11], *Shimady* i wsp. [22] i innych [18,28], wykazały istnienie zależności pomiędzy ekspresją MMP-2 a zaawansowaniem cechy N. Ponadto *Kusukawa* i wsp. [12] analizując chorych z rakiem płaskonabłonkowym obszaru głowy i szyi udokumentowali, że zwiększona ekspresja pro MMP-2 związana jest z występowaniem oraz nasileniem przerzutów do węzłów chłonnych. Zależności tej nie wykazały badania prowadzone przez *Imanishi* i wsp. [6].

Według niektórych autorów zależność pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej guza (G) a ekspresją MMP-2 nie ma istotnego znaczenia oraz nie wpływa na rokowanie chorych z rakiem płaskonabłonkowym w obrębie głowy i szyi [18]. Ponadto *Sarioglu* i wsp. [21] zlokalizowali MMP-2 zarówno w obszarze dysplazji, carcinoma *in situ* jak i w komórkach inwazyjnego raka. W cytowanych badaniach zaobserwowano istotną zależność pomiędzy ekspresją antygeny w wyżej wymienionych obszarach. Jednak ci sami autorzy stwierdzają brak istotnej zależności pomiędzy MMP-2 a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu [21]. W naszych badaniach zaobserwowano wyższą ekspresję MMP-2 w utkaniu nowotworowym raka krtani w porównaniu z obszarami dysplazji w badanej tkance. Może to mieć odzwierciedlanie w dalszej obserwacji klinicznej, gdyż potwierdzono, że pacjenci z wysoką ekspresją MMP-2 charak-

teryzują się znacznie gorszym rokowaniem, w porównaniu z pacjentami, u których ekspresja MMP-2 jest niższa. Podkreśla się zatem, że ocena poziomu ekspresji tego antygeny cytoplazmatycznego w utkaniu guza, może stanowić istotną wartość prognostyczną dla pacjentów [2,13,18,28].

Wysoki indeks mitotyczny może być wskaźnikiem znacznej złośliwości biologicznej komórki nowotworowej. Ekspansywny typ wzrostu guzów głowy i szyi wskazuje na duże znaczenie prognostyczne u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym [25]. Dlatego też podkreśla się znaczenie oceny proliferacji komórkowej, której wskaźnikami są antygeny jądrowe lokalizowane przez przeciwciała anty - Ki-67 i anty - PCNA. Ocena ekspresji tych antygenów służy do określania populacji komórek znajdujących się w fazie wzrostu. Analiza badań wykazała ekspresję białka Ki-67 we wszystkich stadiach cyklu komórkowego z wyjątkiem fazy G0. Ponadto udowodniono, że w komórkach proliferujących ekspresja antygeny Ki-67 jest różna i zależy od fazy cyklu komórkowego. Wykazano, że w późnej fazie G1 antygen ten występuje w strefie okołojądrowej. Natomiast w fazie S zlokalizowany jest homogenicznie w strukturze jądra, a w fazie G2 stwierdzono mieszany odczyn w obrębie jądra komórkowego [27].

W niniejszej pracy obecność antygeny jądrowego Ki-67 zaobserwowano w pojedynczych komórkach prawidłowego nabłonka. Natomiast największą ekspresję Ki-67 odnotowano w komórkach nowotworowych. Ponadto obecność antygeny zaobserwowano w całym obszarze objętym dysplazją. *Brown* i wsp. [1] oraz *Lörz* i wsp. [14] potwierdzili tę zależność. Podkreślono występowanie wyizolowanych komórek prawidłowego nabłonka, wykazujących dodatni odczyn Ki-67 w raku płaskonabłonkowym płuc. Wykazano wzrost ekspresji Ki-67 w dysplazji, a także na obszarze carcinoma *in situ* wskazując na jego ekspresję na całej długości i grubości tkanki [1,14]. Autorzy zaznaczyli także, że w raku inwazyjnym komórki o dodatnim odczynie znajdują się na obwodowych częściach nacieku nowotworowego. Pobodnie analiza wyników badań *Pignataro* i wsp. [19] wskazuje na wyraźny wzrost ekspresji antygeny Ki-67 w obszarach o umiarkowanej oraz nasilonej dysplazji, które następnie przekształciły się w raka inwazyjnego. Ekspresja była znacząco wyższa w porównaniu z przypadkami, gdzie nie zaobserwowano progresji nowotworowej [19]. W ocenie ekspresji Ki-67 w utkaniu raka płaskonabłonkowego odnotowano istotną zależność pomiędzy stopniem dojrzałości histologicznej guza a obecnością antygeny Ki-67 [14]. *Lörz* i wsp. [14] oraz *Girod* i wsp. [4] zwracają uwagę na znaczenie kliniczne ekspresji Ki-67 w nacieku nowotworowym. Podkreśla się także, że wysoka ekspresja białka związana jest ze skróceniem przeżycia pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym krtani [4].

Kolejnym równie istotnym markerem proliferacji komórkowej jest PCNA. Nasilenie ekspresji tego antygeny zaobserwowano podczas oceny nabłonka prawidłowej błony śluzowej krtani w wysoko dojrzałym raku płaskonabłonkowym [25]. W niniejszej

pracy natomiast, zaobserwowano znaczny wzrost ekspresji PCNA w utkaniu raka płaskonabłonkowego w porównaniu z obszarami dysplazji. W badaniach innych autorów przeprowadzono także analizę ekspresji PCNA u chorych na raka głośni w wczesnych etapach choroby przed zastosowaniem leczenia oraz we wznowach. *Munk-Wikland* i wsp. [17] wykazali niższy poziom ekspresji PCNA we wczesnych wznowach choroby w porównaniu z ekspresją tego antygenu jądrowego w komórkach guza pierwotnego. Zależności takiej nie wykazano analizując ekspresję PCNA [4]. Natomiast analiza badań *Welkoborsky'ego* i wsp. [25] wykazała znaczenie prognostyczne PCNA dla czasu całkowitego przeżycia pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym [4,25].

### Wnioski

Stwierdzono różnice poziomów ekspresji badanych markerów w zależności od intensywności ekspozycji na dym tytoniowy. Może być to odzwierciedleniem różnego stopnia uszkodzenia komórek. Uzyskane wstępnie wyniki są rezultatem badań przeprowadzonych na wybranych przypadkach pacjentów z rakiem krtani i wymagają dalszej weryfikacji na większym materiale klinicznym.

### Piśmiennictwo

- Brown D.C., Gatter K.C.:** Monoclonal antibody Ki-67: Its use in histopathology. *Histopathology* 1990, 17, 489.
- Cox G., Jones J.L., Andi A. et al.:** A biological staging model for operable non-small cell lung cancer. *Thorax*. 2001, 39, 561.
- Florek E., Piekoszewski W.:** Toksykologiczne aspekty palenia tytoniu. *Pol. Med. Rodz.* 2004, 6, 789.
- Girod S.C., Pfeiffer P., Ries J. et al.:** Proliferative activity and loss of function of tumor suppressor genes as "biomarkers" in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic and neoplastic oral squamous cell carcinoma. *Brit. J. Oral Maxil. Surgery* 1998, 36, 252.
- Golusiński W.:** Prognozowanie w rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi na podstawie oceny proliferacji komórek nowotworowych. *Post. Chirurgii Głowy i Szyi* 2003, 1, 1.
- Imanishi Y., Fujii M., Tokumaru Y. et al.:** Clinical significance of expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 in human head and neck squamous cell carcinoma. *Hum. Pathol.* 2000, 31, 895.
- Jurkiewicz D., Dżaman K., Rapiejko P.:** Czynniki ryzyka raka krtani. *Pol. Merk. Lek.* 2006, 121, 94.
- Kawata R., Shimada T., Maruyama S. et al.:** Enhanced production of matrix metalloproteinase-2 in human head and neck carcinomas is correlated with lymph node metastasis. *Acta. Otolaryngol.* 2002, 122, 101.
- Koch W.M., Lango M., Sewell D. et al.:** Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope* 1999, 109, 1544.
- Kruk-Zagrajewska A., Wierzbicka M., Leszczyńska M. i wsp.:** Rozpoznawanie i leczenie raka krtani. *Post. Chirurgii Głowy Szyi* 2006, 1, 5.
- Kurahara S., Shinohara M., Ikebe T. et al.:** Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMP in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 1999, 21, 627.
- Kusukawa J., Sasaguri Y., Shima I. et al.:** Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis in squamous cell carcinoma. A clinicopathologic study. *Am J. Clin. Pathol.* 1993, 99, 18.
- Liu W., Zeng Z.Y., Wu Q.L. et al.:** Overexpression of MMP-2 in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2005, 132, 395.
- Lörz M., Meyer-Breiting E., Bettinger R.:** Proliferating cell nuclear antigen counts as markers of cell proliferation in head and neck cancer. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 1994, 251, 91.
- Mazur E.:** Genetyka w nowotworach głowy i szyi. *Onkol. Pol.* 2007, 10, 120.
- Monig S.P., Baldus S.E., Henneken J.K. et al.:** Expression of MMP-2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopatologia* 2001, 39, 597.
- Munck-Wikland, E., Edstroem, S., Jungmark E. et al.:** Nuclear DNA content, proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) and p53 immunostaining in predicting progression of laryngeal cancer in situ lesions. *Int. J. Cancer* 1994, 56, 95.
- O-Charoenrat P., Rhys-Evans P.H., Eccles S.A. et al.:** Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2001, 127, 813.
- Pignataro L., Capaccio P., Pruneri G. et al.:** The predictive value of p53, MDM-2, cyclin D1 and Ki-67 in the progression from low-grade dysplasia towards carcinoma of the larynx. *J. Laryngol. Otol.* 1998, 112, 455.
- Sarasin A.:** An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 2003, 544, 99.
- Sarioglu S., Ozer E., Kirimca F. et al.:** Matrix metalloproteinase-2 expression in laryngeal and preneoplastic and neoplastic lesions. *Pathol. Res. Pract.* 2001, 197, 483.
- Shimada, Nakamura H., Yamashita K. et al.:** Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human oral squamous cell carcinomas: implications for lymph node metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 2000, 18, 179.
- Szyfter K.:** Rola czynnika genetycznego w powstawaniu i przebiegu płaskonabłonkowego raka krtani. *Post. Chirurgii Głowy Szyi* 2002, 1, 5.
- Tan E.H., Adelstein D. J., Droughton M.L. et al.:** Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers. *Am. J. Clin. Oncol.* 1997, 20, 146.
- Welkoborsky H.J., Dienes H.P., Hinni M. et al.:** Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995, 104: 503.
- Wierzbicka M., Szyfter W., Bień S. i wsp.:** Zalecenia diagno-stycznno-terapeutyczne dla wybranych nowotworów głowy i szyi. *Rak krtani. Współcz. Onkol.* 2006, 5, 195.
- Wright N.A.:** Cell proliferation in health and disease. *Recent. Adv. Histopathol.* 1984, 12, 17.
- Yoshizaki T., Maruyama Y., Sato. H. et al.:** Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 2001, 95, 44.