

VILNIAUS UNIVERSITETAS

DIANA SCHVEIGERT

MATRIKSO METALOPROTEINAZIŲ GENŲ RAIŠKA IR JŲ
POLIMORFIZMAS SERGANT KRŪTIES IR PRIEŠINĖS LIAUKOS VĖŽIU

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, medicina (06B)

Vilnius, 2014

Disertacija rengta 2005 – 2014 metais Vilniaus universiteto Onkologijos institute (dabar Nacionalinis vėžio institutas).

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinė konsultantė

prof. dr. Janina Didžiapetrienė (Nacionalinis vėžio institutas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Kalbos redaktorė

Gražina Pruskuvienė

TURINYS

SANTRUMPOS	5
1. ĮVADAS	6
1.1. Tiriamoji problema ir jos aktualumas	6
1.2. Suformuluotos hipotezės	7
1.3. Darbo tikslas	8
1.4. Darbo uždaviniai.....	8
1.5. Darbo mokslinis naujumas	9
1.6. Autoriaus indėlis.....	9
2. LITERATŪROS APŽVALGA	10
2.1. Matrikso metaloproteinazių klasifikacija	10
2.2. Matrikso metaloproteinazių struktūra.....	15
2.3. Matrikso metaloproteinazių reguliaciniai mechanizmai.....	16
2.4. Matrikso metaloproteinazių fiziologinės funkcijos	18
2.5. Matrikso metaloproteinazių inhibitoriai	20
2.6. Matrikso metaloproteinazių vaidmuo naviko augimo, invazijos ir metastazavimo procesuose.....	23
2.7. Krūties vėžys ir matrikso metaloproteinazės.....	26
2.7.1. Estrogenų ir progesterono receptoriai.....	29
2.8. Priešinės liaukos vėžys ir matrikso metaloproteinazės.....	31
2.9. Matrikso metaloproteinazių genų mutacijos ir vėžys	33
3. TIRIAMOJI MEDŽIAGA IR METODAI	37
3.1. Tyrimo objektas	37
3.2. Tyrime dalyvavusių pacientų charakteristika	39
3.2.1. Sergančiosios krūties vėžiu.....	39
3.2.2. Sergantieji priešinės liaukos vėžiu.....	41
3.3. Tyrimo metodai	43
3.3.1. RNR gryninimas iš kraujo ir navikinio audinio.....	43
3.3.2. Genų raiškos tyrimas	45
3.3.3. DNR gryninimas iš kraujo	46
3.3.4. Polimorfizmo tyrimas restrikcijos fragmento ilgio polimorfizmo metodu.....	47
3.3.5. Statistinė analizė	50
4. REZULTATAI.....	51

4.1. Krūties vėžys	51
4.1.1. Matrikso metaloproteinazių genų raiška sergančiųjų krūties vėžiu kraujyje	51
4.1.2. Matrikso metaloproteinazių genų polimorfizmas sergančiųjų krūties vėžiu kraujyje	56
4.1.3. Matrikso metaloproteinazių genų raiška krūties navikuose.....	64
4.1.4. Sergančiųjų krūties vėžiu pacientų išgyvenamumui įtaką darantys veiksniai	71
4.2. Priešinės liaukos vėžys	74
4.2.1. Matrikso metaloproteinazių genų raiška sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje.....	74
4.2.2. Matrikso metaloproteinazės 9 geno polimorfizmas sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje	78
4.2.3. Sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų išgyvenamumui įtaką darantys veiksniai.....	84
5. REZULTATŲ APTARIMAS.....	86
5.1. Krūties vėžys	86
5.2. Priešinės liaukos vėžys	93
6. IŠVADOS.....	98
LITERATŪROS SĄRAŠAS	99
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS.....	114
PRIEDAI.....	116
PADĖKA	120

SANTRUMPOS

BM – bazinė membrana;

bp – bazių poros;

ER – estrogenų receptoriai;

Fas receptorius – apoptozės inicijavimo receptorius (CD95);

FGF – fibroblastų augimo veiksnys;

GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija;

HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptorius 2;

kDNR – kopijinė DNR;

MMP – matrikso metaloproteinazės;

MMPAI – matrikso metaloproteinazių audininiai inhibitoriai;

MMPSI – matrikso metaloproteinazių sintetiniai inhibitoriai;

MT-MMP – membraninio tipo matrikso metaloproteinazės;

PCA3 – priešinės liaukos vėžio antigenas 3;

PGR – polimerazės grandininė reakcija;

PR – progesterono receptoriai;

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas;

TGF- β – transformuojantis augimo veiksnys β ;

TNF- α - navikų nekrozės veiksnys α ;

TNM – piktybinių navikų išplitimo įvertinimo sistema;

ULU – užląstelinis užpildas;

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas.

1. ĮVADAS

1.1. Tiriamoji problema ir jos aktualumas

Matrikso metaloproteinazės (MMP) yra šeima nuo cinko priklausomų proteolitinių fermentų, dalyvaujančių naviko angiogenezėje, jo augimo bei metastazavimo procesuose, todėl, siekiant įvertinti sergančiųjų įvairių lokalizacijų vėžiu prognozę, svarbu nustatyti šių fermentų raiškos pokyčius. Buvo manyta, kad MMP yra fermentai, kurie veikia tik kaip naviko augimo ir metastazavimo procesų stimulatoriai, ir todėl laikytasi nuomonės, kad užblokavus šių fermentų aktyvumą būtų galima slopinti naviko augimo ir plitimo procesus. Todėl buvo sukurti ir tirti klinikoje plataus veikimo spektro sintetiniai MMP inhibitoriai. Pagrindiniai šių inhibitorių taikiniai buvo MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-11 ir MMP-12. Pažymėtina, kad dauguma su šiais slopikliais susijusių tyrimų buvo nutraukti anksčiau laiko, nes negauta klinikinio efekto arba pasireiškė ženklus nepageidaujamas poveikis tiriamųjų organizmui. Tai parodė, kad teorinės žinios apie MMP raišką sergant įvairių lokalizacijų piktybiniais navikais ir šios raiškos sąsają su navikiniu procesu nepakankamos. Pastaraisiais metais daugėja eksperimentinių ir klinikinių duomenų, iš kurių matyti, kad padidėjęs MMP aktyvumas gali tiek skatinti, tiek slopinti navikinį procesą (25). Taigi, individualizuojant sergančio onkologine liga paciento gydymą, reikia atsižvelgti į konkrečios MMP aktyvumą, nes vienu atveju MMP skatina navikinį procesą ir gali būti tam tikrų lokalizacijų navikų terapijos taikiniu, tad jų raišką reikia slopinti, o kitu atveju, esant tam tikrų lokalizacijų navikui, MMP slopina navikinį procesą, ir jų raiškos nereikėtų slopinti (24). Kadangi MMP dalyvauja navikinių ląstelių metastazavimo procese, jų raiškos kraujyje įvertinimas galėtų būti prognozinis žymuo, rodantis mikrometastazių formavimosi procesą. Tačiau vis dar nėra atlikta didelių daugiacentrių tyrimų, patvirtinančių šių fermentų svarbą koreguojant pacientų gydymo taktiką bei vertinant pacientų išgyvenamumą, kas leistų prognozuoti ligos eigą.

MMP raiškos pokyčiams įtakos turi mutacijos jų genų promotorinėse sekose. Pažymėtina, kad vieno nukleotido polimorfizmas, nustatomas MMP genų promotorinėse sekose ir galintis turėti įtakos MMP raiškai, siejamas su agresyvesne navikinio proceso eiga. Vieno nukleotido polimorfizmo tyrimai įgyja vis daugiau reikšmės prognozuojant ligą, tačiau iki šiol tyrimų rezultatai nevienareikšmiai. Pavyzdžiui, MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmas vienu autorių darbuose siejamas su invaziniu krūties naviku (97), o kiti autoriai šios sąsajos nekonstatuoja (77). Vadinasi, svarbu nustatyti bei įvertinti, kokie polimorfizmo variantai gali turėti įtakos ligos eigai.

Analizuojant atliktus tyrimus matoma tendencija, kad MMP raiška ir funkcijos priklauso nuo naviko lokalizacijos. Susistemintų duomenų apie MMP raiškos pokyčius atsižvelgiant į naviko lokalizaciją, ląstelių kilmę, ligos vystymosi greitį vis dar nėra. Todėl svarbu išsiaiškinti MMP raiškos pokyčius esant tam tikros lokalizacijos navikams, susieti juos su pacientų klinikinėmis-patologinėmis charakteristikomis bei įvertinti gautus duomenis prognozinio aspektu.

1.2. Suformuluotos hipotezės

1. Matrikso metaloproteinazių (MMP) genų raiška sergant vėžiu yra susijusi su klinikinėmis-patologinėmis ligos charakteristikomis.
2. Matrikso metaloproteinazių (MMP) genų raišką galima sieti su sergančių vėžiu pacientų išgyvenamumu ir ši raiška gali būti nepriklausomas prognozinis veiksnys vertinant sergančiųjų vėžiu pacientų išgyvenamumą.
3. Matrikso metaloproteinazių (MMP) genų promotoriuose pasitaikantis vieno nukleotido polimorfizmas (VNP) gali būti prognozinis veiksnys numatant krūties ir priešinės liaukos vėžio eigą.

1.3. Darbo tikslas

Nustatyti matrikso metaloproteinazių genų (MMP) raišką ir vieno nukleotido polimorfizmą MMP genų promotorinėse sekose sergant krūties ir priešinės liaukos vėžiui bei įvertinti tirtuosius parametrus prognozinio aspekto.

1.4. Darbo uždaviniai

1. Sergančioms krūties vėžiu pacientėms nustatyti matrikso metaloproteinazių (*MT1-MMP*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-11*, *MMP-13*) genų raišką ir vieno nukleotido polimorfizmą jų genuose (*MMP-3* -1171 5A/6A; *MMP-9* -1562 C/T) bei įvertinti tirtuosius parametrus priklausomai nuo paciento klinikinių-patologinių charakteristikų.
2. Įvertinti sąsają tarp matrikso metaloproteinazių (*MT1-MMP*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-11*, *MMP-13*) genų raiškos bei vieno nukleotido polimorfizmo jų genuose (*MMP-3* -1171 5A/6A; *MMP-9* -1562 C/T) ir sergančiųjų krūties vėžiu išgyvenamumo.
3. Sergantiems priešinės liaukos vėžiu pacientams nustatyti matrikso metaloproteinazių (*MMP-9*, *MMP-11*) genų raišką ir vieno nukleotido polimorfizmą jų genuose (*MMP-9* -1562 C/T) bei įvertinti tirtuosius parametrus priklausomai nuo paciento klinikinių-patologinių ligos charakteristikų.
4. Įvertinti sąsają tarp matrikso metaloproteinazių (*MMP-9*, *MMP-11*) genų raiškos, vieno nukleotido polimorfizmo jų genuose (*MMP-9* -1562 C/T) ir sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu išgyvenamumo.

1.5. Darbo mokslinis naujumas

Krūties vėžys yra dažniausiai diagnozuojama onkologinė liga tarp moterų, o priešinės liaukos vėžys – tarp vyrų. Nepaisant diagnostinių ir terapinių galimybių tobulėjimo, sergančiųjų vėžiu pacientų išgyvenamumas išlieka vis dar mažas dėl ligos atsinaujinimo. Todėl svarbu nustatyti ligos progresavimo riziką, kas leistų anksčiau pastebėti atsinaujinusią ligą ir kuo greičiau pradėti gydymą.

Kadangi MMP dalyvauja navikų augimo ir metastazavimo procesuose, todėl buvo svarbu įvertinti jų svarbą prognoziniu aspektu. Mūsų atliktas tyrimas leido palyginti vis dar nepakankamai ištirtų MMP ir jų genų vieno nukleotido polimorfizmo kaip žymenų informatyvumą priklausomai nuo pacientų klinikinių-patologinių charakteristikų ir išgyvenamumo. Išryškinta MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo, kaip veiksnio, turinčio įtakos pacienčių išgyvenamumui, svarba sergant II stadijos krūties vėžiu. Parodyta *MMP-11* geno raiškos sąsaja su ilgesne pacientų, sergančių priešinės liaukos vėžiu, gyvenimo trukme.

1.6. Autoriaus indėlis

Šio darbo autorė parengė tyrimo protokolą bei visus reikalingus dokumentus Biomedicininį tyrimų etikos komiteto leidimui vykdyti tyrimą. Disertantė atliko MMP genų raiškos ir jų polimorfizmo tyrimus pacientų kraujyje ir navikuose. Autorė interpretavo gautus rezultatus atlikusi statistinę tyrimo duomenų analizę. Su bendraautoriais parengė 5 mokslinius straipsnius disertacinio darbo tematika. Vykdomą mokslo darbą disertantė viešino stendiniais ir žodiniais pranešimais tarptautinėse mokslinėse konferencijose.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Matrikso metaloproteinazių klasifikacija

1962 metais mokslininkai *J. Gross* ir *C.M. Lapiere* tirdami pokyčius buožgalvio audiniuose pastebėjo, kad buožgalvių odoje, uodegoje, žarnyne ir žiaunose yra fermentas, galintis skaidyti fibrilinį kolageną (35). Šis fermentas buvo pavadintas kolagenaze ir tai pirmoji aprašyta MMP, vėliau įvardyta kaip MMP-1. Kolagenazės funkcijos sudomino ir kitus mokslininkus bei paskatino tirti šį skaidymo procesą žmogaus audiniuose, nes kolageno skaidymas yra svarbus žaizdų gijimo bei audinių regeneracijos procesuose, taip pat sergant įvairiomis ligomis, tarp jų artritu, ateroskleroze, aneurizma, vėžiu. 1975 metais mokslininkų grupė iš sąnarinio tepalo (*lot. synovia*) išskyrė pirmąją žmogaus organizme sintetinamą MMP-1 (143). Ir tik praėjus 11 metų buvo nustatyta šio fermento pirminė struktūra (36).

Žmogaus genome identifikuoti 24 genai, koduojantys skirtingas MMP. MMP – tai šeima nuo cinko priklausomų proteolitinių fermentų, galinčių skaidyti visus užląstelinio užpildo (ULU) komponentus. ULU plačiau apžvelgiamas 2.4 poskyryje. Pagal savo domenų struktūrą, sekų panašumą bei skaidomus substratus MMP yra skirstomos į šešias grupes (1 lent.) (84, 100). MMP-4, MMP-5, MMP-6 ir MMP-22 nėra pateikta 1 lentelėje, nes nustatyta, kad jų struktūra tarpusavyje yra identiška (85).

1 lentelė. MMP klasifikacija (84) ir (100)

Fermento pavadinimas	MMP numeracija
<i>Kolagenazės</i> Kolagenazė-1 Kolagenazė-2 Kolagenazė-3	MMP-1 MMP-8 MMP-13
<i>Želatinazės</i> Želatinazė A Želatinazė B	MMP-2 MMP-9
<i>Stromelizinai</i> Stromelizinas-1 Stromelizinas-2 Stromelizinas-3	MMP-3 MMP-10 MMP-11
<i>Matrilizinai</i> Matrilizinas Matrilizinas-2	MMP-7 MMP-26
<i>Membraninio tipo MMP</i> MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MP4-MMP MT5-MMP MT6-MMP	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17 MMP-24 MMP-25
<i>Kitos MMP</i> Metaloelastazė Enamelizinas Epilizinas	MMP-12 MMP-19 MMP-20 MMP-21 MMP-23 MMP-27 MMP-28

MMP – matricso metaloproteinazė

Kolagenazių grupę sudaro trys fermentai – kolagenazė-1 (MMP-1), kolagenazė-2 (MMP-8) ir kolagenazė-3 (MMP-13). Kolagenazės specifiskai skaido kolageno skaidulas į smulkius fragmentus, kurie greitai denatūruoja kūno temperatūroje ir toliau skaidomi kitų MMP, pavyzdžiui, želatinazių (3, 84). MMP-1 yra sekretuojama kaip 52 kDa profermentas (neaktyvi fermento forma), kuri *in vivo* gali aktyvinti proteazės (pvz., plazminas). MMP-1 išskiria įvairių tipų ląstelės: fibroblastai, keratinocitai, chondrocitai, monocitai, makrofagai bei piktybinių navikų ląstelės. MMP-1 skaido I, II, III, VII, VIII, X tipo kolageną, fibronektiną, lamininą, agrekaną, α2-makroglobuliną.

Fermentas dalyvauja tokiuose biologiniuose procesuose kaip keratinocitų migracija, trombocitų agregacija, uždegimas, ląstelių proliferacija. MMP-1 yra vienintelė tarp MMP, galinti krūties liaukos audinyje skaidyti visų tipų kolageną, todėl šio fermento raiška yra siejama su krūties vėžiu (2, 3, 134). MMP-8 sekretuojama kaip 75 kDa profermentas, kuris aktyvinamas tripsino. MMP-8 skaido I, II, III, V, VII, VIII, X tipo kolageną, želatiną, agrekaną ir fibronektiną. Pagrindinis MMP-8 sekrecijos šaltinis yra polimorfonukleariniai leukocitai, taip pat MMP-8 išskiria makrofagai, fibroblastai, epitelio ląstelės. Tyrimai naudojant peles parodė, kad mutantinėms, neturinčioms *MMP-8* geno, pelėms greičiau vystėsi odos vėžys. Panaudojus krūties vėžio ląstelių liniją MDA-MB-435 nustatyta, kad didelė MMP-8 raiška sietina su metastazinėmis šių ląstelių savybėmis (37, 132). Klinikiniuose tyrimuose didesnė MMP-8 raiška siejama su geresne sergančiųjų burnos ertmės (liežuvio) navikais ligos eiga (63). Trečioji kolagenazių grupės atstovė MMP-13 sekretuojama kaip 65 kDa profermentinas ir aktyvinamas iki 55 kDa aktyvaus fermento, skaidančio I, II, III, IV, IX, X, XIV tipo kolageną, želatiną, fibronektiną, agrekaną, plazminogeną bei kitus substratus. MMP-13 aktyvina proMMP-9 ir proMMP-13. Didelė MMP-13 raiška yra nustatoma galvos ir kaklo, krūties piktybiniuose navikuose, taip pat piktybiniuose periferinių nervų dangalų navikuose (18, 31, 46).

Želatinazių grupę sudaro 72 kDa želatinazė A (MMP-2) ir 92 kDa želatinazė B (MMP-9). MMP-2 yra produkuojama įvairių tipų ląstelių – fibroblastų, miofibroblastų, monocitų, chondrocitų, endotelinių ląstelių. MMP-2 skaido I, IV, V, VII, X, XI, XIV tipo kolageną, želatiną, elastiną, fibronektiną, agrekaną bei aktyvina proMMP-9 ir proMMP-13. Šis fermentas dalyvauja įvairiuose fiziologiniuose ir patologiniuose procesuose, pavyzdžiui, MMP-2 raiška yra susijusi su trombocitų agregacija, krūties epitelinių ląstelių migracija. MMP-9 skaido IV, V, VII, X, XIV tipo kolageną, želatiną, agrekaną, elastiną, fibronektiną, lamininą. Šį fermentą produkuoja taip pat įvairių tipų ląstelės – alveoliniai makrofagai, polimorfonukleariniai leukocitai, osteoklastai, keratinocitai, endotelinės ląstelės. Padidėjusi MMP-2 ir MMP-9

raiška siejama su greitesniu įvairių lokalizacijų navikų augimu bei metastazavimu (2, 4, 134).

Stromelizinų grupę sudaro trys atstovai: stromelizinas-1 (MMP-3), stromelizinas-2 (MMP-10) ir stromelizinas-3 (MMP-11). MMP-3 yra išskiriama kaip 57 arba 59 kDa profermentas, kuris *in vivo* proteolitiškai aktyvinamas iki 45 kDa aktyvios MMP-3 formos. MMP-3 skaido II, III, IV, V, IX tipo kolageną, proteoglikanus, fibronektiną, lamininą. MMP-3 išskiria fibroblastai, makrofagai, endotelinės, epitelinės ląstelės. MMP-3 raiška siejama su reumatoidiniu artritu ir vėžinių ląstelių invazija (2, 29, 84, 101). MMP-10 yra sekretuojama kaip 56 kDa profermentas, kuris aktyvinamas iki 47 kDa aktyvaus fermento. MMP-10 substratinis specifiskumas yra toks pats, kaip ir MMP-3. Be to, MMP-10 gali aktyvinti proMMP-1, proMMP-7, proMMP-8 ir proMMP-9. Didesnė šio fermento raiška nustatyta keratinocituose. *In vitro* tyrimais parodyta, kad MMP-10 skatina galvos ir kaklo plokščialąstelinės karcinomos ląstelių invaziją, taip pat dažnai dideli šio fermento kiekiai nustatomi minėtos lokalizacijos navikuose bei koreliuoja su vėlyvesne ligos stadija ir navikinių ląstelių metastazavimu (7, 23). MMP-11 nuo kitų dviejų stromelizinų grupės atstovų skiriasi tuo, kad šis fermentas yra aktyvinamas ląstelėje ir išskiriamas iš ląstelės jau aktyvios 47 kDa dydžio formos. Iš pradžių šio fermento raiška buvo nustatyta fibroblastuose, supančiuose invazines krūties naviko ląsteles, ir tyrimai rodo, kad padidėjusi MMP-11 raiška gali būti siejama su krūties vėžio progresavimu (2, 84, 109).

Matrilizinų grupę sudaro dvi MMP – matrilizinas (MMP-7) ir matrilizinas-2 (MMP-26). MMP-7 yra mažiausia proteinazė, priklausanti MMP šeimai, kurios struktūroje yra tik propeptidas ir katalitinis domenas. MMP-7 sekretuojama kaip 28 kDa profermentas. Serino proteazės, tokios kaip tripsinas, plazminas gali suskaidyti jungtį, jungiančią propeptidą ir katalitinį domeną, ir taip susidaro aktyvi MMP-7 forma. MMP-7 gali aktyvinti proMMP-1, proMMP-2 ir proMMP-9. MMP-7 skaido IV ir X tipo kolageną, elastiną, fibronektiną, želatiną, lamininą bei proteoglikanus. Matrilizino substratai yra ne tik ULU komponentai, bet ir ląstelės paviršiaus molekulės,

pavyzdžiui, navikų nekrozės faktoriaus (TNF- α , *angl. tumor necrosis factor alpha*). Padidėjusi MMP-7 raiška kolorektalinio vėžio navikuose siejama su blogesniu pacientų išgyvenamumu, palyginti su išgyvenamumu tų pacientų, kuriems navikuose nustatoma maža MMP-7 raiška (2, 28, 84). MMP-26 substratai yra I, II, III, IV tipo kolagenas, fibronektinas. MMP-26 gausiai ekspresuoja keratinocitai, plaučių ir krūties piktybinio naviko ląstelės. MMP-26 gali aktyvinti proMMP-9, o jo paties aktyvumas gali būti slopinamas audininių matrikso metaloproteinazių inhibitorių - MMPAI-2 ir MMPAI-4 (1).

Membraninio tipo matrikso metaloproteinazių (MT-MMP) grupę sudaro šeši fermentai: keturi atstovai turi transmembraninį segmentą (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP), o kiti – glikozilfosfatidilinozitolinį (GPI) inkarą (MT4-MMP, MT6-MMP) (2). MT-MMP gali skaidyti įvairius ULU komponentus – I, II, III tipo kolageną, fibronektiną, lamininą, agrekaną, vitronektiną. Pirmoji membraninio tipo MMP (MT1-MMP) buvo išskirta iš invazinių plaučių naviko ląstelių. MT1-MMP atlieka ląstelės membranos receptoriaus funkciją neaktyvios MMP-2 (proMMP-2) ir audininio MMP-2 inhibitoriaus (MMP AI-2) kompleksui prisijungti (5, 126). Taip pat visos membraninio tipo MMP, išskyrus MT4-MMP, gali aktyvinti proMMP-2 (84).

Kitos septynios MMP nėra priskiriamos nė vienai iš aukščiau išvardytų grupių. Metaloelastazę (MMP-12) ekspresuoja makrofagai ir šis fermentas dalyvauja makrofagų migracijos procese. Be elastino, MMP-12 substratai yra fibronektinas, želatina ir lamininas. MMP-19 pirmą kartą buvo išskirta iš pieno liaukos ir kepenų ląstelių. Šio fermento funkcijos nėra plačiai ištirtos. Nustatyta, kad jo raiška susijusi su keratinocitų proliferacijos, migracijos ir adhezijos procesais. Enameliziną (MMP-20) ekspresuoja dantų emalio ląstelės, šis fermentas skaido amelogeniną ir jo raiška nustatyta odontogeniniuose navikuose. MMP-23 yra unikalus savo struktūra MMP šeimos atstovas, nes savo struktūroje turi imunoglobulino tipo domeną. Šio fermento raiška identifikuota tik kiaušidėse, sėklidėse ir priešinėje liaukoje, todėl manoma, kad jo funkcijos yra susijusios su reprodukciniais procesais. Naujausio šeimos

atstovo epilizino (MMP-28) nedidelė raiška nustatyta placentos, plaučių, širdies audiniuose. Šio fermento didesnė raiška nustatyta keratinocituose pacientams, sergantiems osteoartritu ir reumatoidiniu artritu, esant audinio pažeidimams (2; 51, 84).

2.2. Matrikso metaloproteinazių struktūra

MMP turi charakteringą pirminę struktūrą, susidedančią iš signalinio peptido, propeptido, katalitinio domeno (15). Paprastai propeptidą sudaro apie 80 aminorūgščių. Katalitiniame domene esantis cinko (Zn^{2+}) jonas yra reikalingas MMP aktyvumui. Dėl šio metalo jono šios fermentų šeimos pavadinime atsirado žodis „metalo“ (11, 85). Homologinį hemopeksinui domeną savo struktūroje turi dauguma MMP. Šiame domene yra keturių β klosčių struktūra, dalyvaujanti baltymas-baltymas sąveikoje. Taip pat šis domenas prisideda prie teisingo substrato atpažinimo, fermento aktyvinimo procesų (15, 85, 92).

Želatinazių katalitinis domenas turi tris pasikartojančius homologinius II tipo fibronektinui intarpus, kurie dalyvauja jungiantis šiems fermentams prie kolageno. Matrilizinais (MMP-7 ir MMP-26) turi minimalią domeninę struktūrą, reikalingą jų raiškai ir neaktyviai būsenai palaikyti. Trys MMP (MMP-11, MMP-21, MMP-28) propeptide turi sritį, kurią skaido furininio tipo proteazės, todėl manoma, kad šios MMP yra aktyvinamos ląstelės viduje ir vėliau išskiriamos į išorę (15, 85, 92).

Membraninio tipo MMP (MT-MMP), kitaip nei kitos MMP, sekretuojamos į užląstelinę aplinką, įsitvirtina plazminėje membranoje per transmembraninį domeną (MT1-, MT2-, MT3- ir MT5-MMP) arba per glikozilfosfatidilinozitolinį (GPI) inkarą (MT4- ir MT6-MMP) (15, 118). Transmembraninės MT-MMP turi trumpą apie 20 aminorūgščių citoplazminę uodegą, o MT4-MMP ir MT6-MMP, nėra transmembraniniai baltymai, jie prisijungia prie membranos per GPI inkarą. Pažymėtina, kad transmembraninio tipo MMP yra 8 aminorūgščių intarpas katalitiniame domene, kurio neturi per

GPI inkarą, prisijungusios prie plazminės membranos MT-MMP ir kitos tirpios MMP. Šis intarpas sudaro išsikišimą tarp β II ir β III klosčių, kuris vadinamas „MT-kilpa“. Tyrimais parodyta, kad „MT-kilpa“ neturi įtakos katalitinės srities aktyvumui, tai yra struktūrinė katalitinio domeno adaptacija, leidžianti efektyviai suskaidyti proMMP-2 peptidinę jungtį ir taip aktyvinti MMP-2 (121).

2.3. Matrikso metaloproteinazių reguliaciniai mechanizmai

Ilgą laiką buvo manoma, kad MMP pagrindinė funkcija yra tik ULU ir bazinių membranų (BM) struktūrinių komponentų skaidymas, tačiau detalesni tyrimai parodė, kad šie fermentai taip pat veikia ir ne matriksinius baltymus, tokius kaip citokinai, chemokinai, receptoriai, krešėjimo veiksniai, priešmikrobiniai peptidai ir kt. Be to, į MMP reikėtų žvelgti plačiau, ne tik kaip į fermentus, galinčius tik skaidyti, bet kaip į fermentus, dalyvaujančius įvairiuose užląsteliniuose procesuose, susijusiuose su ląstelė-ląstelė sąveikos reguliacija bei ląstelė-užpildas signalų perdavimu (11, 73, 100, 128).

Katalitinis MMP aktyvumas reguliuojamas trimis lygmenimis – genų raiška, fermento inaktyvinimo ir profermento aktyvinimo „cisteino atskyrimo“ mechanizmu. Išskiriamų įvairių MMP kiekis varijuoja priklausomai nuo audinio ir jį sudarančių ląstelių tipo (100).

MMP genų raiškai transkripciškai įtakos gali turėti įvairūs veiksniai, tokie kaip citokinai, augimo veiksniai, bakterijų endotoksinais, hormonai ir kt. Kiekvienas iš šių veiksnių gali aktyvinti specifines signalines kaskadas, kurios gali tiek teigiamai (didesnė raiška), tiek neigiamai (mažesnė raiška) veikti MMP genų promotorinėse sekose esančius reguliacinius elementus, lemiančius genų raiškos pokyčius (73).

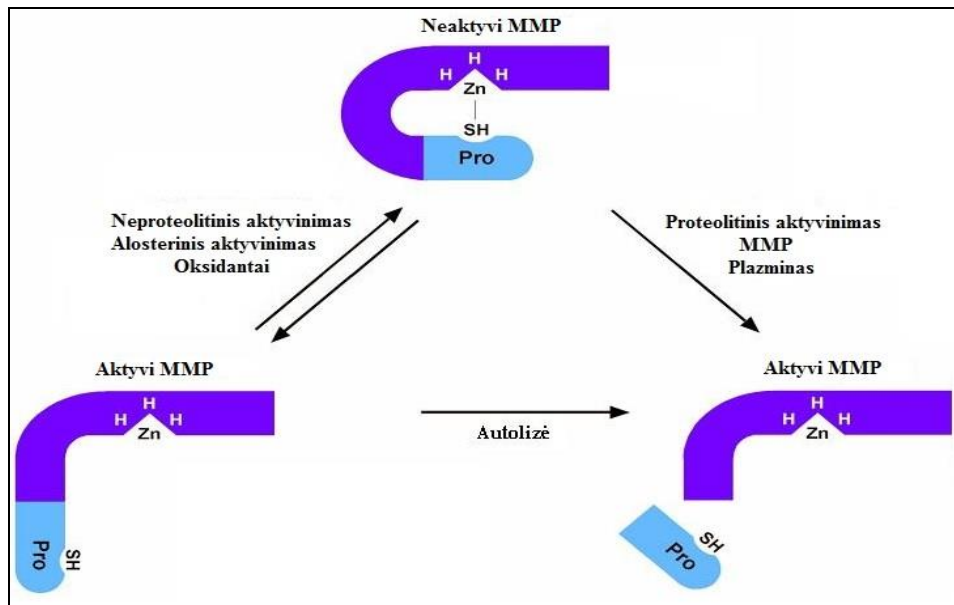
MMP aktyvumas yra reguliuojamas dviejų tipų pagrindinių endogeninių inhibitorių: α_2 -makroglobulino ir matrikso metaloproteinazių audininių inhibitorių (MMPAI). α_2 -makroglobulinas yra 725 kDa plazmos glikoproteinas, susidedantis iš keturių identiškų 180 kDa subvienetų. Šis

baltymas inhibuoja daugumą proteinazių, sudarydamas su jomis kompleksą, kuris greitai sunaikinamas endocitozės būdu (85). MMPAI reguliacinė įtaka MMP raiškai aprašyta 2.5. poskyryje.

Toliau detaliau apžvelgiamas neaktyvių MMP aktyvinimo procesas „cisteino atskyrimo“ mechanizmu.

„Cisteino atskyrimo“ mechanizmas

Neaktyvios MMP (dar vadinamos zimogenais) būna, kai cisteino tiolo grupė propeptidiniame domene sąveikauja su cinko (Zn) jonu, esančiu katalitiniame domene, taip išvengiama substrato prisijungimo ir MMP aktyvinimo (1 pav.) (70, 100).



1 pav. Neaktyvios MMP aktyvinimo mechanizmas, adaptuota pagal (100)
Pro - propeptidas; SH – tiolo grupė ; Zn – cinkas.

Ši sąveika turi būti suardyta, kad MMP taptų aktyviu fermentu. 1990 metais šį MMP aktyvinimo mechanizmą aprašė *H. E. Van Wart* ir *H. Birkedal-Hansen* bei pavadino jį „cisteino atskyrimo“ mechanizmu (*angl. cysteine switch*) (131).

Sąveikai tarp cisteino ir cinko jono suardyti galimi trys keliai:

1) proteolitinis aktyvinimas – tiesioginis sąveikos suardymas kita proteinaze (pvz. MMP, serino proteinazės);

2) neproteolitinis aktyvinimas – tiolo grupės pašalinimas veikiant oksidantams arba nefiziologiniams reagentams (pvz. alkilinatingieji junginiai, sunkieji metalo jonai);

3) alosterinis aktyvinimas – vyksta konformaciniai domenų pokyčiai (100).

Vykstant sąveikos suardymui antruoju ir trečiuoju keliais, propeptidinis domenas atskiriamas autokatalitinio skaidymo būdu. Svarbu tai, kad neaktyvi MMP gali būti iš dalies aktyvi ir turėdama propeptidinį domeną, tačiau būtina nutraukti jungtį tarp cisteino ir cinko jono (100).

Reikia pažymėti, kad oksidantai, kuriuos išskiria leukocitai ar kitos ląstelės, gali ir aktyvinti (tiolo grupės oksidacija), o vėliau ir inaktyvinti (aminorūgščių, reikalingų katalitiniam aktyvumui, modifikacija) MMP (100). Naviko susiformavimo vietoje, vykstant organizmo uždegiminiam atsakui, susidaro gana dideli kiekiai reaktyviųjų deguonies formų (*angl. reactive oxygen species*), kurias išskiria suaktyvinti neutrofilai ir makrofagai. Šie oksidantai gali aktyvinti MMP (60).

2.4. Matrikso metaloproteinazių fiziologinės funkcijos

MMP dalyvauja daugelyje normalių fiziologinių procesų, tokių kaip embriogenezė, organų morfogenezė, gimdos endometriumo ciklas, žaizdų gijimas, angiogenezė, apoptozė, kaulų rezorbcija ir kt. Keletas biologinių procesų, kuriuose dalyvauja MMP skaidydamos substratus ir taip skatindamos įvairių fiziologinių procesų iniciaciją, yra pateikti 2 lentelėje (85). Paminėti biologiniai procesai dažnai vyksta ULU.

2 lentelė. Biologiniai procesai, kuriuos gali skatinti MMP

Biologinis proceso aktyvinimas	MMP
Keratinocitų migracija	MMP-1
Osteoklastų aktyvinimas	MMP-13
Adipocitų diferenciacija	MMP-7
Ląstelių migracija	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MT1-MMP
Trombocitų agregacija	MMP-1
Epitelinų ląstelių migracija	MMP-2, MT1-MMP, MMP-19
Nutraukta ląstelių agregacija ir padidėjusi ląstelių invazija	MMP-3, MMP-7
<i>Fas</i> receptoriaus sukelta apoptozė	MMP-7
Čiobrialiaukės neovaskuliarizacija	MMP-9
Žaizdų gijimas	MMP-1

MMP – matrikso metaloproteinazė, Fas receptorius – apoptozės inicijavimo receptorius (CD95)

ULU – tai tarpląstelinė medžiaga, sudaryta iš baltyminių makromolekulių, glikozaminoglikanų, proteoglikanų, kolageno, glikoproteinų ir kitų komponentų, susijungusių į netirpius kompleksus. Visų pirma ši erdvė yra migruojančių ląstelių „takas“, kuriame susidaro koncentracijos gradientas, reikalingas migracijai. ULU apibrėžia audinių ribas bei suteikia vientisą ir elastingą erdvę besiformuojantiems organams. ULU taip pat izoluoja ir „kaupia“ augimo veiksnius bei reguliuoja jų išsiskyrimą, kai jų reikia ląstelėms ar vykstant proteolitinei degradacijai (106). Vienos ląstelės prisijungdamos prie ULU receptorių (pvz., integrinų) reguliuoja kitų ląstelių viduląstelinis procesus, susijusius su ląstelių poliarizacijos, diferenciacijos, išgyvenimo ir proliferacijos procesais (14). Įvairios proteinazės gali skaidyti ULU, tačiau manoma, kad pagrindiniai fermentai šiame procese yra MMP, galinčios skaidyti visus ULU komponentus. Kiekvienas ULU komponentas gali būti suskaidytas vienos kurios nors MMP arba grupės MMP (30). Nuolatinis ULU ardymas yra svarbus vystymosi, morfogenezės, audinių atstatymo procesuose (2, 65, 85). Be to, MMP gali skaidyti ne tik ULU komponentus, bet ir kitus ne-ląstelinis substratus, taip darydamos įtaką kitiems organizmui svarbiems procesams.

Akivaizdu, kad ULU yra barjeras migruojančioms ląstelėms. Prisijungusios prie ULU ląstelės pradėdamos migruoti turi pakeisti adhezinį fenotipą į migracinį fenotipą. Ląstelių migraciją sąlygoja citoskeleto motorinė

funkcija, adhezinių sričių modifikacija, paviršinių adhezinių molekulių aktyvumas. MMP potencialiai gali reguliuoti bet kurį iš šių procesų. Ląstelės atsaką reguliuoja sąveikos tarp ULU komponentų ir ląstelės paviršiaus molekulių. Kadangi ląstelės turi receptorius (pvz., integrinai), atpažįstančius ULU komponentus, dėl to MMP gali keisti ląstelines funkcijas, t.y. reguliuoti ULU komponentų aktyvumą (92). Pakitus aplinkai, ląstelių sugebėjimas proliferuoti, išgyventi ar diferencijuotis taip pat keičiasi. Tyrimai, atlikti naudojant ląstelių kultūras, parodė, kad MMP gali turėti įtakos ląstelių proliferacijai, jų išgyvenimui, apoptozei, diferenciacijai ir organizacijai. Tai pagrindiniai vystymosi procesai. MMP, dalyvaudamos signalų perdavimo keliuose, gali paveikti ląstelių išgyvenimą tiek teigiamai, tiek neigiamai (52, 126). Pavyzdžiui, dideli MMP raiškos pokyčiai nustatomi sergantiesiems tokiomis ligomis kaip vėžys, reumatoidinis artritas, osteoartritas, plaučių emfizema, aterosklerozė, aortos aneurizma (76, 85).

2.5. Matrikso metaloproteinazių inhibitoriai

Paprastai, esant normalioms fiziologinėms sąlygoms MMP ekspresuojama mažai, o jų per didelė raiška užląstelinėje erdvėje slopinama specifinių matrikso metaloproteinazių audininių inhibitorių (MMPAI) (16, 68, 128).

MMP audininiai inhibitoriai (MMPAI). Užląstelinėje erdvėje MMPAI jungiasi prie konservatyviosios cinko jungimosi vietos MMP katalitiniame domene. Taip susidaro nekovalentinis stochiometrinis kompleksas, kuris yra atsparus denatūracijos ir proteolitinio skaidymo procesams (16, 68, 128).

MMPAI grupę sudaro keturi struktūriškai panašūs atstovai: MMPAI-1, MMPAI-2, MMPAI-3, MMPAI-4. Nuo 37 iki 51 proc. MMPAI struktūra yra identiška ir turi 12 cisteino liekanų, sudarančių šešis disulfidinius tiltelius. MMPAI yra nedideli baltymai, sudaryti iš dviejų domenų. Kiekvienas domenas turi tris disulfidinius tiltelius, kurie užtikrina MMPAI stabilumą (2, 14, 68).

MMPAI-1 yra 28,5 kDa glikoproteinas, turintis 41 proc. homologinių sekų, tokių kaip ir MMPAI-2. MMPAI-1 gali slopinti visas aktyvias MMP formas bei jungtis su proMMP-9. MMPAI-1 koduojančio geno mutacijų tyrimais parodyta, kad šio fermento inhibicinis aktyvumas priklauso nuo N-galinio domeno. MMPAI-1, turintis tik N-galinį domeną, jungiasi su MMP taip pat efektyviai, kaip ir MMPAI-1, turintis abu domenų (144).

MMPAI-2 yra 21 kDa baltymas, turintis 44 proc. homologinių sekų, tokių kaip ir MMPAI-3. MMPAI-2 slopina visas aktyvias MMP. Be to, prisijungdamas ląstelės paviršiuje prie MT1-MMP, kartu su ja suformuoja receptorių, padedantį aktyvinti MMP-2 (14, 127).

MMPAI-3 yra 27 kDa glikoproteinas, galintis jungtis tiek su aktyviomis, tiek su neaktyviomis MMP. MMPAI-3 yra unikalus tarp MMPAI atstovų ir pasižymi tuo, kad, specifiskai sąveikauja su sulfatintais glikozaminoglikanais ir lieka prisijungęs prie ULU; kiti trys MMPAI atstovai yra tirpūs ir laisvai migruoja. Patebėta, kad, kitaip nei MMPAI-1, kuris slopina apoptozę, MMPAI-3 šį procesą skatina (2, 68, 127).

Vėliausiai identifikuotas ir mažiausiai ištirtas yra MMPAI-4. Tai 22 kDa baltymas, kurio didelė raiška nustatyta širdies, inkstų, kasos, žarnų, sėklidžių, smegenų ir riebaliniame audiniuose. MMPAI-4 turi 51 proc. homologinių sekų, tokių kaip ir MMPAI-2 (79). Manoma, kad dideli MMPAI-4 kiekiai gali apsaugoti širdies audinį nuo navikinių ląstelių invazijos. MMPAI-4 jungiasi su proMMP-2, tačiau jo funkcija šiame komplekse nežinoma. Nustatyta didesnė šio inhibitoriaus raiška odos žaizdose (2).

Pastaraisiais metais atlikti tyrimai parodė, kad MMPAI šeimos nariai gali taip pat kontroliuoti svarbius, susijusius su kancerogeneze bei naviko augimu procesų etapus, kuriuose nedalyvauja MMP (9, 79, 112).

Atsižvelgiant į tai, kad daugelio navikų ląstelės ekspresuoja MMP ir kad jų aktyvumas yra slopinamas MMPAI, šių fermentų funkcijų slopinimas tapo naujų vaistinių preparatų nuo vėžio taikiniu. Ieškoma sintetinių MMP

inhibitorių (MMPSI), kuriais būtų galima gydyti sergančiuosius vėžiu bei kitomis ligomis.

MMP sintetiniai inhibitoriai (MMPSI). Eksperimentinių tyrimų rezultatai rodo, kad daugumos MMP raiška tiek pirminiuose navikuose, tiek jų metastazėse tiesiogiai susijusi su naviko progresavimu, t.y. blogesne ligos prognoze, metastazėmis kituose organuose bei trumpesne pacientų išgyvenimo trukme. Kadangi MMP raiškos slopinimas susijęs su naviko progresavimo stabdymu, todėl siekiant slopinti pastarąjį procesą buvo sukurti MMPSI (24).

Pirmasis plačiai tirtas MMPSI buvo batimastatas (BB94). Tai peptidinis, tokios pat kaip kolageno struktūros, darinys. *In vitro* gauti tyrimų rezultatai neparodė preparato citotoksiškumo, o įskiepijus navikinių ląstelių pelėms ir pradėjus gydymą batimastatu, buvo slopinamas pirminio naviko augimas bei pailgėjo gydomų gyvūnų gyvenimo trukmė. Pelėms, kurioms buvo įskiepytos krūties vėžio ląstelės, suleidus batimastato ženkliai sulėtėjo recidyvavimo procesas, sumažėjo metastazių skaičius plaučiuose ir pailgėjo gyvūnų gyvenimo trukmė. Pažymėtina, kad batimastato poveikis navikiniam procesui priklauso nuo gydymo kurso trukmės: teigiamas batimastato poveikis konstatuotas esant ilgam gydymo kursui juo (44). Tačiau klinikiniai tyrimai dėl nepageidaujamo šio preparato poveikio, buvo nutraukti (107).

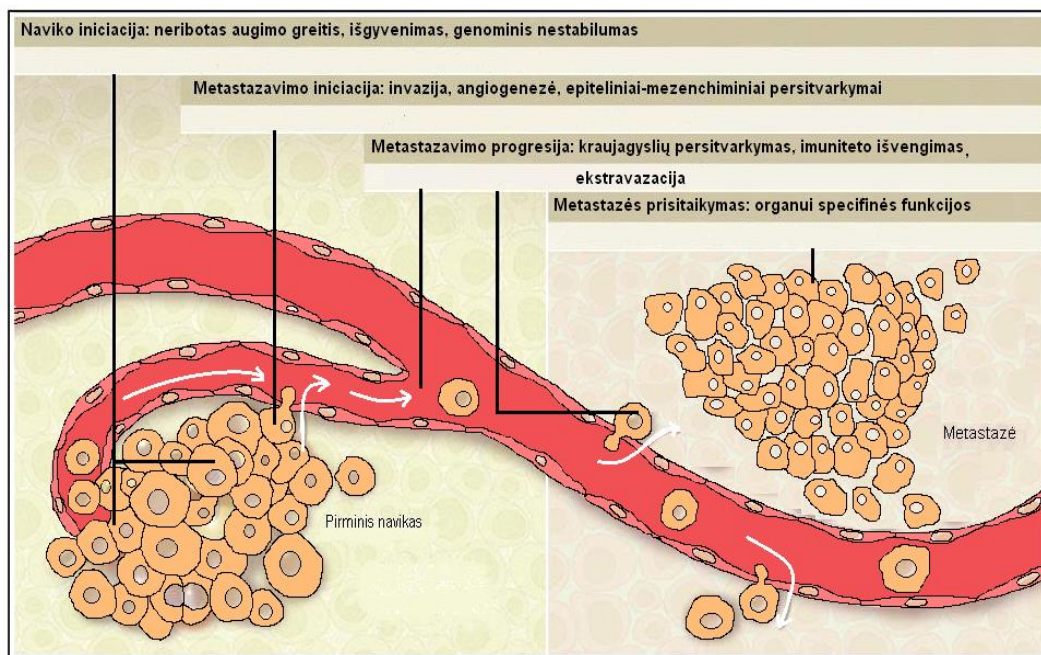
Plačiausiai tirtas MMPSI buvo marimastatas (BB 2516). Tai sintetinis, mažos molekulinės masės, plataus veikimo spektro hidroksamo rūgštis, tokios pat kaip kolageno struktūros, darinys. Slopina MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 ir MMP-9 fermentinį aktyvumą. Tačiau III fazės klinikinio tyrimo rezultatai, gydant marimastatu 114 pacientų, sergančių metastaziniu krūties vėžiu, teigiamo marimastato poveikio, palyginti su placebo gydytų pacienčių grupės rezultatais, neparodė (122).

Pirmieji klinikiniai tyrimai, vertinant MMPSI efektyvumą, buvo inicijuoti tuo metu, kai dar buvo mažai žinių apie įvairių MMP vaidmenį sergant skirtingų lokalizacijų navikais. Tačiau ir dabar, praėjus dešimtmečiui, matyti, kad teorinės žinios apie MMP raišką, sergant įvairių lokalizacijų

piktybiniais navikais ir šios raiškos sąsają su piktybiniu procesu yra nepakankamos. Akivaizdu, kad ULU skaidymo kontrolė – sudėtingas procesas ir atskirų MMP aktyvumo slopinimas, matyt, neturi įtakos naviko augimui, ypač sergant vėlyvųjų stadijų vėžiu. Siekiant suprasti, kodėl klinikinių tyrimų rezultatai, taikant MMPSI onkologijos klinikoje, nepateisino laukiamų lūkesčių, būtina toliau tyrinėti MMP vaidmenį progresuojant piktybiniais navikams.

2.6. Matrikso metaloproteinazių vaidmuo naviko augimo, invazijos ir metastazavimo procesuose

Naviko augimas ir progresija yra kompleksinis ir daugiapakopis procesas, kurio metu vyksta navikinių ląstelių vystymasis, migracija, invazija, metastazavimas ir angiogenezė. Kiekvienas etapas šiame procese yra svarbus, jo metu sveika ląstelė gali išsivystyti iki navikinės, o naviko ląstelės gali plisti į greta esančius sveikus audinius ir organus. Šie visi žingsniai yra reguliuojami daugelio fermentų ir baltymų, tarp jų ir MMP (76). Navikinių ląstelių invazijos ir metastazavimo procesai prasideda nuo navikinių ląstelių migravimo link kraujagyslių ar limfagyslių ir įsiskverbimo į jas. Šių procesų pagrindą sudaro proteolitinis ULU ir BM komponentų skaidymas, todėl MMP yra vienos svarbiausių fermentų šiame etape. Iš pradžių pirminio naviko ląstelėse atsiranda mutacijų, kurios turi įtakos neribotam ląstelių proliferacijos procesui, sutrikdo ląstelių apoptozę (savalaikė ląstelės žūtis) sukeliančius mechanizmus ir paspartina genominį nestabilumą. Kitame naviko progresavimo etape pakinta ląstelių poliariškumas ir jos atsiskiria nuo BM. Šie pokyčiai indukuojami ląstelių sąveikų tarp navikinių ląstelių bei ULU. Navikinės ląstelės išskiria MMP; šie fermentai gali būti aktyvinami ląstelių paviršiuje ir taip susidaro pakankamas kiekis MMP, kurios skaidydamos ULU komponentus padaro kelią navikinėms ląstelėms iš pirminio židinio patekti į kraują ar limfą bei keliauti į atokiais organizmo vietas, kuriose prasiskverbia į sveiką audinį, taip suformuodamos metastazę (2 pav.) (13, 72, 125).



2 pav. Naviko iniciacija ir metastazės susiformavimas, adaptuota pagal (13)

Iš pradžių buvo manoma, kad MMP yra išskiriamos išimtinai tik navikinių ląstelių, tačiau tai pasikeitė *in vitro* ir *in vivo* tyrimais įrodžius, kad dažnai, MMP, reikalingas ligai progresuoti, pateikia, būtent strominės ląstelės. Strominiai fibroblastai gali sukelti navikines epitelinių ląstelių transformacijas. Navikinės ląstelės stimuliuoja stromines ląsteles išskirti MMP, sekretuodamos interleukinus, interferonus ir augimo veiksnius (25, 76). Naviko mikroaplinkoje yra ląstelių (fibroblastai, makrofagai, neutrofilai, adipocitai), kurios vaidina svarbų vaidmenį pirminio naviko augimo ir metastazių formavimosi procesuose. Pavyzdžiui, navikinės ląstelės gali stimuliuoti fibroblastus parakrininiu būdu per interleukinų, interferonų, augimo veiksnių sekreciją, dėl to fibroblastai išskiria daugiau MMP. Fibroblastai išskiria MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-11, MMP-13 ir MT1-MMP. Adipocitai yra labai aktyvios endokrininės ląstelės, kurios sekretuoja augimo veiksnius, citokinus, ULU baltymus ir MMP. Adipocitai, išskirdami MMP-11, padeda navikinėms ląstelėms išgyventi jungiamajame audinyje (88). MMP gali prisidėti prie naviko vystymosi tiesiogiai ir netiesiogiai, veikdamos augimo veiksnius, tokius kaip fibroblastų augimo veiksny (FGF; angl. *Fibroblast*

growth factor) ir transformuojantis augimo veiksnys β (TGF- β ; angl. *Transforming growth factor β*). Be to, MMP gali netiesiogiai reguliuoti proliferaciją per integrinus (76).

Tyrimų rezultatai rodo, kad MMP dalyvauja metastazių formavimosi procese, prisidėdamos prie vadinamosios „ikimetastazinės nišos“ (angl. *pre-metastatic niche*) formavimosi. Ekologinėse sistemose, terminas „niša“ apibūdina rūšies ar populiacijos santykį su ekosistema. Vieną nišą gali užimti tik viena rūšis ar populiacija. Nišoje rūšiai užtenka turimų išteklių ir ji savo mikroaplinkos biologinius ir fizikinius komponentus naudoja taip, kad jie nėra prieinami kitoms rūšims ar populiacijoms. Tokiu būdu susidaro optimalios sąlygos rūšiai gyventi ir daugintis (98). Pagal šią naują teoriją, pirminio naviko ląstelės išskiria tirpius veiksnius, sužadinančius specifinę nepiktybinių kraujodaros ląstelių grupę, kuri įsiskverbia į tolimesnius audinius, sukurdamą „ikimetastazinę nišą“. Šio proceso metu vyksta proteolitinis užpildo ardymas bei tirpių augimo veiksnių ir chemokinių išsiskyrimas; taip sukuriama atkeliaujančioms navikinėms ląstelėms reikalinga mikroaplinka. Pavyzdžiui, pirminio naviko ląstelės išskiria tokius veiksnius kaip TGF- α ir TGF- β , kurie toliau savo ruožtu sužadina chemoatraktantų raišką plaučių endotelio ir mieloidinėse ląstelėse, taip palengvindami navikinių ląstelių įsitvirtinimą „ikimetastazinėje nišoje“, susiformavusioje plaučių parenchimoje. Toliau pirminio naviko ląstelės netrukdomos dauginasi ir plaučiuose formuojasi mikrometastazė, o vėliau ir makrometastazė. Šio proceso metu, MMP-9, kurią išskiria plaučių makrofagai ir endotelinės ląstelės, skaidydama kraujagyslių sienelės, prisideda prie navikinių ląstelių įsiskverbimo į plaučių audinį (60, 72, 88).

Tyrinėjama sąsaja tarp vėžio ligos eigos ir MMP raiškos. Remiantis gautais rezultatais, įvairių MMP raiška gali būti predikcinis ir/ar prognozinis žymuo, padedantis nustatyti adekvačią gydymo taktiką ar numatyti ligos prognozę. Pavyzdžiui, buvo tirta MMP-9 koncentracija 300 pacientų, kuriems buvo įtariamas kolorektalinis vėžys, kraujo serume. Visiems pacientams buvo atliktas kolonoskopinis ištyrimas. Pastebėta, kad MMP-9 koncentracija

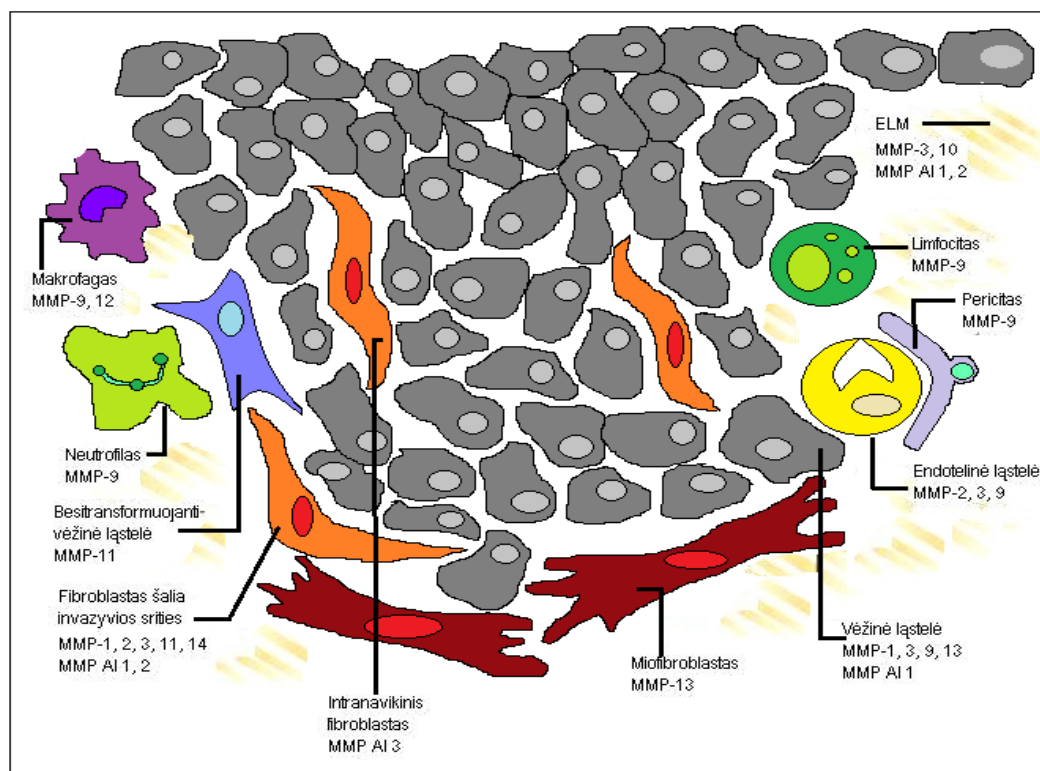
ženkliai didesnė tų pacientų, kuriems buvo patvirtinti piktybiniai bei ikivėžiniai pokyčiai, palyginti su MMP-9 koncentracija tų pacientų, kuriems nustatyti nepiktybiniai pokyčiai žarnyne. Atliekamas didesnės apimties tyrimas, kuriuo siekiama patvirtinti gautus rezultatus. Patvirtinantys tyrimo rezultatai leistų sutaupyti laiko ir lėšų diagnozuojant pokyčius žarnyne, nes, nustatčius MMP-9 koncentraciją serume, ne visiems pacientams reiktų atlikti kolonoskopinį ištyrimą (39). Vis detalesni tyrimai rodo, kad MMP yra vieni svarbiausių fermentų naviko progresavimo procese.

Krūties vėžys yra dažniausiai nustatoma vėžio lokalizacija moterims, o priešinės liaukos vėžys – vyrams. Nepaisant to, kad šių dviejų skirtingų lokalizacijų navikai formuojasi skirtingos anatomijos ir fiziologinių funkcijų organuose, juose išsivystantys navikai yra nuo hormonų priklausomi bei panašūs biologiniu atžvilgiu. Kuriant naujas gydymo strategijas svarbu charakterizuoti šiuos navikus detaliau (105). Toliau bus aptariama MMP raiška sergant krūties ir priešinės liaukos vėžiu.

2.7. Krūties vėžys ir matrikso metaloproteinazės

Krūties vėžys yra dažniausiai diagnozuojama onkologinė liga moterims visame pasaulyje, t.y. viena iš devynių moterų suserga šia liga. Europoje nuo krūties vėžio kasmet miršta apie 140 000 moterų (50). Tolimosios metastazės plaučiuose, kepenyse, kauluose, o ne pirminis navikas, dažniausiai yra pagrindinė sergančių moterų mirties priežastis. Mirtingumo procentui sumažinti labai svarbu anksti diagnozuoti naviką ir metastazes, nes kuo ankstyvesnės stadijos krūties vėžys aptinkamas, tuo geresni jo gydymo rezultatai. Tokie parametrai kaip naviko dydis, diferenciacijos laipsnis, limfmazgių būklė, taip pat estrogenų ir progesterono receptorių, žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriaus 2 (HER2; angl. *human epidermal growth factor receptor 2*) raiška yra svarbūs vertinant atsaką į gydymą bei prognozuojant ligos eigą (56, 62).

Krūties audinyje susiformavę navikai susideda iš navikinių ir kitokio tipo ląstelių, tokių kaip strominės ląstelės, fibroblastai, miofibroblastai, endotelinės ląstelės, pericitai, makrofagai, neutrofilai ir limfocitai. Ir visos šios ląstelės – strominės, navikinės ir virstančios navikinėmis, gali išskirti MMP ir MMPAI (3 pav.) (25, 38).



3 pav. MMP ir MMPAI raiška krūties navikinėse ir naviką supančiose ląstelėse, adaptuota pagal (25)

Daugumos mokslinių tyrimų rezultatai rodo būtent želatinazių (MMP-2 ir MMP-9) raiškos tyrimo svarbą, kadangi šie fermentai skaido IV tipo kolageną, kuris yra pagrindinis BM, atskiriančios epitelines ląsteles nuo stromos, komponentas. Padidėjusi šių fermentų raiška siejama su greitesniu kolageno skaidymu, o tai sąlygoja greitesnį navikinių ląstelių metastazavimo procesą, nes greičiau šalinami navikinėms ląstelėms migruoti į atokias organizmo vietas trukdantys barjerai. Manoma, kad MMP-2 ir MMP-9 galima būtų vertinti kaip prognozinius krūties vėžio žymenis, susijusius su blogesne

ligos eiga, ir kad yra ryšys tarp didelės MMP-2 bei MMP-9 raiškos ir trumpesnio sergančiųjų krūties vėžiu išgyvenimo laiko, taip pat yra sąsaja tarp padidėjusios MMP-9 raiškos krūties navikuose ir vėlyvųjų ligos stadijų (38, 62).

Tarp kitų paminėtų MMP, kurios tiriamos esant krūties navikui, galima būtų išskirti MMP-1 ir MMP-13. MMP-1 raiška siejama su blogesne sergančiųjų krūties vėžiu ligos prognoze. Tyrimų rezultatai rodo, kad didesnė MMP-1 raiška strominiuose fibroblastuose susijusi su greitesne gerybinio krūties naviko transformacija į invazinį krūties naviką (74), o MMP-13 raiška dažniau nustatoma agresyvesnio fenotipo krūties navikuose (136). Taip pat šio fermento raiška miofibroblastuose yra siejama su mikroinvaziniais krūties vėžio procesais ir manoma, kad MMP-13 dalyvauja procesuose, kai duktalinė *in situ* karcinoma transformuojasi į invazinę duktalinę karcinomą (38).

Sekvenavus žmogaus genomą ir sukūrus mikrogardelių technologijas buvo naujai pažvelgta į krūties vėžio biologiją ir šios ligos prognozę. Kelios mokslininkų grupės, visapusiškai ištyrusios ir įvertinusios viso genomo genų raišką, nustatė genus, kurių raiška daro įtaką krūties vėžio ligos eigai (75). Genų raiškos tyrimai buvo panaudoti siekiant sukurti genominius testus, kurie prognozuoti ligos eigą turėtų padėti lengviau, nei tradiciniai klinikiniai ir patologiniai standartiniai rodikliai (120). *MMP-9* genas yra vienas iš 70 genų, kurių raiška tiriama „MammaPrint“ testu (*Agendia*, JAV). Pacientės suskirstomos į grupes apskaičiavus koreliacijos koeficientą tarp tiriamos 70 genų raiškos ir nustatytos geros prognozės genų raiškos. Jei koreliacijos koeficientas yra 0,4 ir daugiau – pacientė priskiriama geros prognozės grupei, jei koeficientas mažesnis – blogos prognozės grupei. „MammaPrint“ testas 2007 metais patvirtintas JAV maisto ir vaistų valdybos (angl. *U. S. Food and Drug Administration*). Geros prognozės grupės moterims tikimybė, kad liga atsinaujins per 10 metų be adjuvantinio gydymo, yra 13 proc., o blogos prognozės grupės – 56 proc. Jei krūties vėžio atsinaujinimo rizika maža, galima neskirti papildomo gydymo ir išvengti jo sukeltų šalutinių poveikių.

Teigiama, kad atlikus „MammaPrint“ testą, viena iš trijų pacienčių gali išvengti chemoterapijos (75).

MMP-11 genas yra vienas iš 21 tiriamojo geno, kurie nustatinėjami „OncotypeDX“ testu (*Genomic Health, JAV*). Tai testas, leidžiantis identifikuoti krūties navikus, kurie bus jautrūs adjuvantinei chemoterapijai, derinamai su preparatu tamoksifenu. Šis testas yra patvirtintas JAV maisto ir vaistų valdybos bei pripažintas Amerikos klinikinės onkologijos asociacijos (angl. *ASCO*) (120).

2.7.1. Estrogenų ir progesterono receptoriai

Estrogenų receptoriai (ER) ir progesterono receptoriai (PR) yra krūties vėžio molekuliniai žymenys, kurių padidėjusi raiška siejama su palankia krūties vėžio prognoze. ER – tokie ląstelių receptoriai, kurie yra jautrūs hormonui estrogenui, darančiam įtaką ląstelės augimui ir dauginimuisi. PR yra jautrūs hormonui progesteronui, turinčiam įtakos ląstelės augimui ir dauginimuisi taip pat kaip ir estrogenas, be to ir balansuojančiam estrogeno poveikį organizme.

Abiejų tipų receptoriai, tiek ER, tiek PR yra prognoziniai krūties vėžio žymenys. Dažniausiai nustatomi ER ir PR teigiami krūties navikai. Navikai, turintys PR, bet neturintys ER nustatomi gana retai. Svarbu pažymėti, kad ER-teigiami/PR-neigiami metastazuojantys navikai yra ženkliai agresyvesni ir pacientės, kurioms diagnozuotas tokio tipo navikas, išgyvena trumpiau (17, 141). Visų keturių hormoninių tipų krūties navikų (ER-teigiami/PR-teigiami, ER-teigiami/PR-neigiami, ER-neigiami/PR-teigiami, ER-neigiami/PR-neigiami) nustatymo dažnis skiriasi ir priklauso nuo amžiaus, menopauzės metu naudojamų hormoninių preparatų ir kūno masės indekso po menopauzės (17).

ER buvo nustatyti 1960 metais (55). Yra dviejų tipų ER, koduojami skirtingų genų skirtingose chromosomose: ER- α ir ER- β . ER- α genas yra 6 chromosomos q25.1 srityje, o ER- β – 14 chromosomos q22-24 srityje. ER- α ir

ER- β sekos gana homologiškos, ypač tuose domenuose, kurie atsakingi už specifinę sąveiką su DNR ir ligandais. Vykstant aktyvinimui, ER- β gali formuoti homodimerus bei heterodimerus su ER- α (64). ER- β buvo atrasti tik 1996 metais ir buvo pastebėta, kad 50 proc. ER- α neigiamuose krūties navikuose nustatoma ER- β raiška. ER- α vaidmuo seniai tiriamas ir jų funkcija maždaug aiški, o dėl ER- β funkcijos vis dar nėra aiškios apibrėžtos nuomonės (141).

Didelė ER- α raiška gerybiniame krūties navike siejama su padidėjusia rizika susirgti krūties vėžiu. Manoma, kad ER- α dalyvauja krūties vėžio vystymosi ir progresavimo procesuose, tokiuose kaip iniciacija, promocija ir progresija, todėl ER- α yra vaistinių preparatų nuo vėžio taikiny (64). Jau daugiau kaip 35 metus ER raiška krūties navikinėse ląstelėse yra žymuo, nusakantis koks bus naviko atsakas į hormonų terapiją. ER- α raiška nustatoma apie 70 proc. pirminių krūties navikų, taip pat daugiau nei pusėje šių navikų nustatoma ir PR raiška. Dideli atsitiktinės atrankos klinikiniai tyrimai parodė, kad hormonų terapija nėra efektyvi sergančiosioms invaziniu krūties vėžiu, kai nenustatoma ER raiškos (90, 141). ER raiška gali būti susijusi su signaliniais keliais, kurie skatina ląstelių proliferaciją ir veikia ULU baltymų ar fermentų, tokių kaip MMP, raišką. MMP raiškos pokyčiai savo ruožtu daro įtaką krūties vėžio progresavimui. Parodyta, kad padidėjęs estradiolio (E2) aktyvumas mažina MMP-2, MMP-9, MMPAI-1 ir MMPAI-2 baltymų aktyvumą ER ir PR teigiamoje krūties vėžio ląstelių linijoje MCF-7 (64, 86).

PR raiška dažniausiai nurodo, kad estrogeno–ER kelias veikia funkcionaliai. PR priklauso steroidinių receptorių šeimai ir padeda progesteronui veikti tuose audiniuose, kur to reikia. Progesteronas skatina epitelinių ląstelių proliferaciją kiekvieno menstruacinio ciklo ir nėštumo metu. Esant normalioms fiziologinėms sąlygoms, PR raišką pieno liaukose kontroliuoja latakų epitelinės ląstelės. PR išskiriamos dvi formos, A forma ir B forma, kurias koduoja vienas genas, lokalizuotas 11 chromosomos q22-23 srityje. Šių dviejų formų raiškos sutrikimas trikdo normalų pieno liaukų vystymąsi (69, 113). Manoma, kad PR raiška gali būti susijusi su MMPAI-1

raiška piktybiniuose krūties navikuose. *D. C. Jinga* ir bendraautorai (57) nustatė, kad didelė PR raiška pasižymintys krūties navikai išskiria mažiau MMPAI-1, o maža PR raiška pasižymintys – daugiau MMPAI-1.

2.8. Priešinės liaukos vėžys ir matrikso metaloproteinazės

Pasaulyje ir daugelyje Europos valstybių priešinės liaukos vėžys yra pirmaujanti onkologinė liga tarp vyrų (50). Nepaisant diagnostinių ir terapinių galimybių tobulėjimo, sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų išgyvenamumas išlieka vis dar mažas dėl dažno ligos atsinaujinimo, kuris nepastebimas arba pastebimas per vėlai, todėl yra svarbu nustatyti ligos progresavimo riziką. 1970 metais atrastas ir pasiūlytas priešinės liaukos specifinis antigenas (PSA; angl. *prostate specific antigen*) iki šiol išlieka svarbiausias testas, diagnozuojant priešinės liaukos vėžį bei stebint ligos eigą. Ir nors PSA yra specifinis priešinės liaukos žymuo, tačiau jis nėra specifinis navikui, todėl gana dažnai PSA koncentracijos padidėjimo susieti su priešinės liaukos vėžiu negalima, nes šis rodiklis gali būti ir nepiktybinės priešinės liaukos ligos rodiklis (102). Taip yra dėl to, kad nėra pakankamai žinomi molekuliniai mechanizmai, kurie daro įtaką priešinės liaukos vėžio progresavimui ir metastazavimui. Pažymėtina, kad šiuo metu, be PSA, labiausiai ištirtas ir daugiausia vilčių teikiantis žymuo yra priešinės liaukos vėžio antigenas 3 (PCA3; angl. *Prostate cancer antigen 3*). PCA3 raiška nustatoma tiek sveikame, tiek pažeistame priešinės liaukos audinyje. PCA3 raiška sveikame bei gerybinės hiperplazijos pažeistame priešinės liaukos audinyje yra nedidelė, o kai pacientai serga priešinės liaukos vėžiu, PCA3 raiška padidėja iki 100 kartų. PCA3 raiška identifikuojama apie 95 proc. priešinės liaukos vėžio atvejų, įskaitant gerai, vidutiniškai ar blogai diferencijuotus navikus bei priešinės liaukos vėžio metastazes (41, 135).

Gana sudėtinga nustatyti, kuris priešinės liaukos navikas vystysis agresyviau, o kuris progresuos lėčiau. Be to, gana dažnai pacientai, sergantys priešinės liaukos vėžiu, gydomi tada, kai gydyti visai nereikia, o pakanka tik

stebėti. Todėl tyrinėtojų dėmesys nukreiptas į molekulinį žymenų, galinčių padėti prognozuoti ligos eigą, paieškas. Tarp tokių molekulinį žymenų yra MMP.

Negausūs tyrimai rodo, kad MMP galėtų būti informatyvūs priešinės liaukos vėžio žymenys. MMP-1 raiška nustatyta DU145 ir PC3 priešinės liaukos vėžio ląstelių linijose. Teigiama, kad MMP-1 galėtų būti priešinės liaukos vėžio terapinio gydymo molekulinis taikynys (99). Didelė MMP raiška siejama su greitesniu priešinės liaukos naviko augimu ir metastazių formavimusi. Todėl kliniškai skirtingas priešinės liaukos navikų vystymasis gali priklausyti nuo MMP raiškos navike (26). Pavyzdžiui, padidėjusi MMP-2 raiška identifikuojama esant invaziniam priešinės liaukos navikui bei vykstant metastazavimo procesui (20).

MMP-7 raiška kraujo serume ir priešinės liaukos navikinėse ląstelėse siejama su blogesne sergančiųjų ligos prognoze. Manoma, kad tai susiję su invaziniu naviko fenotipu, kuris lemia didesnę MMP-7 raišką, nes šio fermento aktyvumas serume taip pat didesnis tų pacientų, kurie serga priešinės liaukos vėžiu ir kuriems nustatytos tolimosios metastazės (20).

Dar viena svarbi matrikso metaloproteinazė yra MMP-9. Tyrimai rodo, kad MMP-9 raiška didesnė tiek priešinės liaukos audinyje, tiek kraujo serume pacientų, sergančių priešinės liaukos vėžiu, palyginti su MMP-9 raiška esant nepiktybinei priešinės liaukos hiperplazijai. Be to, didesnė MMP-9 geno raiška siejama su didesniu Glisono laipsniu (20, 130).

S. Escaff ir bendraautorai (26) tyrė galimą sąsają tarp MMP bei MMP AI raiškos ir klinikinės priešinės liaukos vėžio ligos baigties. Jų tyrimuose MMP-11 ir MMP-13 raiška yra susijusi su ligos atsinaujinimu ir teigiama, kad šie fermentai kartu su kitais veiksniais galėtų suteikti naudingos prognozės informacijos stebint pacientus ir taikant gydymą. Autoriai teigia, kad MMP-13 raiška priklauso nuo priešinės liaukos ląstelių supiktybėjimo laipsnio. Pacientams, kurie serga priešinės liaukos vėžiu ir kuriems identifikuotos metastazės, nustatyta didelė MMP-13 koncentracija kraujo plazmoje pradeda mažėti pradėjus gydymą (26).

2.9. Matrikso metaloproteinazių genų mutacijos ir vėžys

Besivystančiam navikui būdingas bruožas yra nekontroliuojamas ląstelių dauginimasis. Pokyčiai, lemiantys ląstelės supiktybėjimą, gali būti įvairių genų mutacijų padarinys. Daugumos genų sekose atsiradusios įvairios mutacijos gali veikti genus dviem būdais: keisdamos ekspresuojamo baltymo ar fermento kokybę arba kiekį. Vieno nukleotido pakaitos (VNP) (dar vadinamos vieno nukleotido polimorfizmu) yra dažniausiai pasitaikančios mutacijos žmogaus genome. Tokio tipo pakaitos vidutiniškai pasitaiko kas keli šimtai bazių porų, o tai sudaro apie 10 milijonų VNP visame žmogaus genome. Tačiau panašu, kad tik mažas procentas vieno nukleotido pakaitų yra funkciškai svarbios (22). Pastaraisiais metais atsiranda vis daugiau tyrimų, susijusių su MMP genų mutacijomis, kurios, matyt, kartu su kitų genų mutacijomis gali lemti navikinio proceso raidą (3 lent.).

3 lentelė. MMP genuose nustatomas polimorfizmas įvairių lokalizacijų navikuose

Genas	Polimorfizmo vieta	Polimorfizmo prigimtis	Lokalizacija
<i>MMP-1</i>	-1607	+/- G	Glioblastoma (78); Krūties vėžys (97); Plaučių vėžys (37); Gimdos kaklelio vėžys (87); Kiaušidžių vėžys (115); Inkstų vėžys (43); Kolorektalinis vėžys (42, 140);
<i>MMP-2</i>	-1306	C/T	Krūties vėžys (138); Plaučių vėžys (54); Skrandžio ir stemplės vėžys (80);
<i>MMP-3</i>	-1171	5A/6A	Krūties vėžys (66); Plaučių vėžys (29);
<i>MMP-7</i>	-181	A/G	Astrocitoma (71); Gimdos kaklelio vėžys (114); Skrandžio vėžys (67);
<i>MMP-8</i>	17	C/G	Plaučių vėžys (37)
<i>MMP-9</i>	-1562	C/T	Krūties vėžys (22); Plaučių vėžys (47); Priešinės liaukos vėžys (110) Kolorektalinis vėžys (145);
<i>MMP-12</i>	-82	A/G	Krūties vėžys (111); Plaučių vėžys (58); Šlapimo pūslės vėžys (59);
	1082	A/G	Krūties vėžys (111).

MMP koduojantys genai yra 8, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 20 ir 22 chromosomose. Dauguma jų sudaro sankaupą 11 chromosomos ilgajame petyje (4 lent.).

4 lentelė. MMP genų vieta chromosomose

Fermentas	Geno vieta chromosomoje	Fermentas	Geno vieta chromosomoje	Fermentas	Geno vieta chromosomoje
MMP-1	11q22-q23	MMP-11	22q11.2	MMP-19	12q14
MMP-2	16q13	MMP-12	11q22.2-q22.3	MMP-20	11q22.3
MMP-3	11q23	MMP-13	11q22.3	MMP-24	20q11.2
MMP-7	11q21-q22	MMP-14	14q11-q12	MMP-25	16p13.3
MMP-8	11q22.3	MMP-15	15q13-q21	MMP-26	11p15
MMP-9	20q11.2-q13.1	MMP-16	8q21	MMP-27	11q24
MMP-10	11q22.3-q23	MMP-17	12q24.3	MMP-28	17q21.1

MMP-1 genas yra 11 chromosomos ilgajame petyje. Šio geno promotorinėje sekoje galima mutacija -1607 pozicijoje, kurioje yra guaninas

(G). Šioje pozicijoje vienas alelis gali turėti vieną guaniną (1G), o kitas – du guaninus (2G). Paprastai 1G turinčių alelių promotorinėse sekose -1602 pozicijoje yra transkripcijos veiksnio AP-1 jungimosi sritis. Įvykus mutacijai ir sekoje atsiradus dar vienam G, papildomai susidaro dar viena, kito transkripcijos veiksnio *Ets* jungimosi sritis, kuri kartu su AP-1 padidina promotorinės sekos aktyvumą. Todėl *MMP-1* raiška didėja ir taip daro įtaką piktybinių navikų progresavimui. Šis polimorfizmas *MMP-1* gene siejamas su plaučių, inkstų, kiaušidžių, gimdos kaklelio ir gaubtinės žarnos vėžiu (140).

MMP-2 koduojančio geno promotorinėje sekoje -1306 pozicijoje galima citozino (C) pakaita į timidiną (T). Nustatyta, kad -1306 C/T pakaita yra lokalizuota transkripcijos veiksnio Sp-1 atpažinimo sekoje. Įvykus pakaitai, Sp-1 jungimosi vieta išnyksta, todėl sumažėja geno promotorinės sekos aktyvumas (C/T ir C/C genotipai), taip pat ir *MMP-2* raiška (54). *MMP-2* raiška bus didesnė esant C/C genotipui, negu esant C/T ar T/T genotipams. Sergantiesiems krūties, plaučių, skrandžio ar stemplės vėžiu dažniausiai nustatomas C/C genotipas, todėl iškelta hipotezė, kad asmenų, kuriems nustatomas šis genotipas, rizika susirgti minėtų lokalizacijų vėžiu didesnė (54, 138).

MMP-3 koduojantis genas yra 11 chromosomos ilgajame petyje šalia *MMP-1* koduojančio geno ir suformuoja genų sankibą. *MMP-3* koduojančio geno promotorinėje sekoje -1171 pozicijoje gali būti 5 arba 6 adeninai (A). *In vitro* tyrimais nustatyta, kad 5A geno aktyvumas yra nuo dviejų iki keturių kartų didesnis nei 6A. Todėl 5A/5A genotipas siejamas su didesne rizika susirgti krūties vėžiu bei blogesne ligos prognoze. Šiai hipotezei patvirtinti reikalingi išsamesni tyrimai (66, 116, 126).

MMP-7 gene, esančiame 11 chromosomoje, promotorinės sekos -181 pozicijoje galima A pakaita į guaniną G. Funkcinė analizė *in vitro* parodė, kad esant G aleliui *MMP-7* geno promotorinės sekos aktyvumas du ar tris kartus didesnis negu esant A aleliui. Tyrimais nustatyta sąsaja tarp šio polimorfizmo ir rizikos susirgti skrandžio vėžiu (67, 94).

MMP-8 koduojantis genas taip pat lokalizuotas 11 chromosomoje. Šio geno 17 pozicijoje gali būti C pakaita į G. G alelis siejamas su mažesne plaučių vėžio vystymosi rizika, manoma, kad *MMP-8* dalyvauja slopinant metastazių formavimąsi (37).

MMP-9 koduojantis genas yra 20 chromosomoje. Šio geno promotorinėje sekoje -1562 pozicijoje galima C pakaita į T. *MMP-9* (-1562 C/T) polimorfizmas, siejamas su plaučių vėžiu bei širdies ir kraujagyslių ligomis. -1562 pozicijoje esant timidinui, promotorinės sekos aktyvumas didėja, todėl *MMP-9* raiška išauga. -1562 pozicijoje esanti C/T pakaita yra transkripcijos veiksnio Ets-1 jungimosi srityje, todėl šis polimorfizmas daro įtaką promotorinės sekos aktyvumui. Esant C/T ir T/T genotipui *MMP-9* ekspresuojama žymiai gausiau, nei esant C/C genotipui (94).

MMP-12 genui būdingi du skirtingi polimorfizmo tipai, dėl kurių gali kisti geno aktyvumas. Tai -82 ir 1082 pozicijose A pakaita į G. Šie polimorfizmo tipai siejami su rizika susirgti krūties ar plaučių vėžiu (111).

Iš aprašytų tyrimų matyti, kad *MMP* genuose atsirandančios mutacijos yra susijusios su vėžiu. Labai svarbu suprasti molekulinis pokyčius, kurie atsiranda vystantis navikui, nes tai padėtų racionaliau kurti diagnostikos bei gydymo strategijas. *MMP* genetinių, funkcinių ir struktūrinių savybių supratimas padėtų atskirti, kurios proteinazės skatina vėžio vystymąsi, o kurios – jį slopina. Todėl pagrįstai tikimasi, kad genetiškai pakitusių *MMP* savybių supratimas leistų sukurti naujus inhibitorius, kurie būtų specifiški tik proteinazėms, o tai būtų didelis žingsnis individualizuotos medicinos link.

3. TIRIAMOJI MEDŽIAGA IR METODAI

3.1. Tyrimo objektas

Perspektyvinis tyrimas atliktas 2005-2012 metais Vilniaus universiteto Onkologijos institute (dabar Nacionalinis vėžio institutas). Biomedicininio tyrimo protokolas buvo apsvarstytas Lietuvos bioetikos komiteto posėdyje ir išduotas leidimas šį tyrimą atlikti (2005-04-22, Nr. 16) (1 priedas). Visi tiriamieji asmenys buvo supažindinti su tyrimu ir patvirtino parašu savo sutikimą dalyvauti jame. Asmens informavimo forma ir Informuoto asmens sutikimo forma pateikiamos prieduose (2 ir 3 priedai). Buvo tiriamas sergančiųjų pacientų kraujas, paimtas prieš operaciją, bei navikai, paimti operacijos metu.

Pacientų įtraukimo į tyrimą kriterijai:

1. Pagal klinikinę piktybinių navikų išplitimo vertinimo sistemos (TNM) klasifikaciją pacientėms patvirtintas pirminis krūties vėžys (I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IV stadijos);
2. Pagal klinikinę TNM klasifikaciją pacientams patvirtintas pirminis priešinės liaukos vėžys (I, II, III stadijos);
3. Pacientams nebuvo taikytas joks kitas papildomas vėžio gydymas;
4. Pacientai yra pasirašę Informuoto asmens sutikimo formą (Informuoto asmens sutikimo formą pateikia ir pasirašo gydantys gydytojai).

Pacientų neįtraukimo kriterijai suformuluoti atsižvelgiant į veiksnius, kurie gali pakeisti atliekamų tyrimų rezultatus. Tyrime negalėjo dalyvauti pacientai, kurie atitiko bent vieną žemiau išvardytų kriterijų:

1. Sergantys centrinės nervų sistemos ir psichinėmis ligomis;
2. Turintys protinį atsilikimą ar kalbos sutrikimų, trukdančių laisvai bendrauti su tyrėjais ir suprasti atliekamų tyrimų esmę;
3. Sergantys nestabiliomis, gyvybei pavojingomis širdies ir kraujagyslių, virškinimo, endokrininės sistemos, metabolinėmis ir hematologinėmis

- ligomis, kurios gali turėti įtakos paciento išgyvenamumui (pvz., nestabili krūtinės angina, inkstų ūminis ir lėtinis nepakankamumas);
4. Sergantys ūmiomis sunkiomis infekcinėmis ligomis;
 5. Sergantys kitos lokalizacijos piktybiniu naviku;
 6. Sergantys autoimuninėmis ligomis (reumatinis artritu, sisteminė raudonąja vilklige, dermatomiozitu, sisteminė sklerodermija, membranoproliferaciniu glomerulonefritu);
 7. Atsisakę dalyvauti tyrime.

Tiriamųjų pacientų imties dydis apskaičiuotas atsižvelgiant į tai, kad tyrimo pirmųjų dvejų metų laikotarpiu krūties ir priešinės liaukos vėžys tuometiniame Vilniaus universiteto Onkologijos institute bus nustatytas 100 vienos ir 100 kitos lokalizacijos pacientų. Šis skaičius nustatytas atsižvelgiant į pacientų įtraukimo kriterijus, kad pacientams tai bus pirminis vėžys; kad pacientams nebuvo taikytas joks kitas papildomas vėžio gydymas, kad nedidelė dalis pacientų gali atsisakyti dalyvauti tyrime.

Nustatytas pakankamas tiriamųjų pacientų skaičius – 79 atvejai, numatant, kad MMP raiška nustatoma apie 40 % atvejų, tikslumui esant – 0,05. Atsižvelgiant į tai, kad polimorfizmas MMP genuose nustatomas apie 30 % atvejų, nustatytas pakankamas tiriamųjų pacientų skaičius – 77 atvejai.

Tyrime imties dydžiui nustatyti naudota *EpiTools* programa (49).

3.2. Tyrime dalyvavusių pacientų charakteristika

3.2.1. Sergančiosios krūties vėžiu

Į tyrimą buvo įtrauktos 88 pacientės, sergančios krūties vėžiu ir gydytos buvusio Vilniaus universiteto Onkologijos instituto Krūties ligų chirurgijos ir onkologijos skyriuje. Vidutinis pacienčių amžius tyrimo metu buvo $57,69 \pm 11,99$ metų (jauniausia – 31 metai, vyriausia – 83 metai). Pacientės suskirstytos į dvi amžiaus grupes pagal medianą (31–56 metai, 57–83 metai). Pagal ligos stadiją pacientės buvo suskirstytos į tris grupes. Pirmąją grupę (n=21) sudarė pacientės, kurioms diagnozuotas pirmos stadijos krūties vėžys, antrąją grupę (n=57) – pacientės, kurioms diagnozuotas antros stadijos krūties vėžys, o trečiąją grupę (n=10) – pacientės, kurioms diagnozuotas vėlyvosios t.y. trečios ir ketvirtos stadijos krūties vėžys.

Įtrauktoms į tyrimą pacientėms dažniausiai buvo diagnozuota duktalinė karcinoma – 71 atvejis iš 88. Lobulinių karcinomų, palyginti su duktalinėmis karcinomomis, tarp tirtų pacienčių buvo identifikuota mažiau – 14 atvejų; kitų tipų karcinomų (mucininė ir medulinė) buvo nustatyti tik 3 atvejai. Ištyrus krūties navikus histologiškai, dauguma jų buvo vidutiniškai diferencijuoti (G2) (54,5 %). Pacienčių pasiskirstymas pagal pokyčius limfmazgiuose buvo panašus: pokyčių limfmazgiuose nebuvo nustatyta 51,1 % pacienčių, o nustatyta – 48,9 % pacienčių. Visoms pacientėms buvo tirta ER ir PR imuninė reakcija navikuose. Pagal receptorių raišką navike pacientės pasiskirstė į keturias grupes.

Pacienčių pasiskirstymas pagal amžių ir klinikines-patologines charakteristikas pateiktas 5 lentelėje.

5 lentelė. Sergančių krūties vėžiu pacienčių pasiskirstymas pagal amžių ir kliniines-patologines charakteristikas

Amžius ir klinikinės-patologinės charakteristikos	Pacientės, n (%)
Amžiaus grupė: 31–56 metai	41 (46,6)
57–83 metai	47 (53,4)
Stadija: I	21 (23,9)
II	57 (64,8)
III/IV	10 (11,3)
Naviko histologinis tipas: duktalinė karcinoma	71 (80,7)
lobulinė karcinoma	14 (15,9)
kito tipo karcinoma	3 (3,4)
Naviko diferenciacijos laipsnis: G1	17 (19,3)
G2	48 (54,5)
G3	23 (26,2)
Pokyčiai limfmazgiuose: N0	45 (51,1)
N1	36 (40,9)
N2	7 (8,0)
ER (balai): reakcijos nėra (0)	34 (38,6)
silpna reakcija (1-4)	12 (13,6)
vidutinė reakcija (5-9)	19 (21,6)
stipri reakcija (10-12)	23 (26,2)
PR (balai): reakcijos nėra (0)	33 (37,5)
silpna reakcija (1-4)	21 (23,9)
vidutinė reakcija (5-9)	25 (28,4)
stipri reakcija (10-12)	9 (10,2)

G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas; N0 – sritiniuose limfmazgiuose metastazių nėra; N1 – yra paslankių metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose; N2 – yra metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose, suaugusių tarpusavyje ir su kitomis struktūromis; ER – estrogenų receptoriai; PR – progesterono receptoriai

Sergančių krūties vėžiu pacienčių kraujyje buvo tirta *MMP-9* ir *MMP-11* genų raiška bei įvertintas *MMP-3* (-1171 5A/6A) ir *MMP-9* (-1562 C/T) polimorfizmas, o navikuose – *MT1-MMP*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-11*, *MMP-13* genų raiška. Krūties navikų audinių mėginiai buvo imami iš gydytojui-patologui pateiktos operacinės medžiagos, kurią gydytojas-

patologas buvo įvertinęs morfologiškai ir patvirtinęs galutinę diagnozę bei nustatęs joje ER ir PR imuninę reakciją.

3.2.2. Sergantieji priešinės liaukos vėžiu

Tyrime dalyvavo 82 vyrai, kuriems buvo diagnozuotas priešinės liaukos vėžys. Pacientai buvo gydyti tuometiniame Vilniaus universiteto Onkologijos instituto Onkourologijos skyriuje. Vidutinis pacientų amžius tyrimo metu buvo $64,61 \pm 7,47$ metų (jauniausias – 50 metų, vyriausias – 85 metų), pagal medianą pacientai suskirstyti į dvi amžiaus grupes (50-63 metai ir 64-85 metai). Priešinės liaukos vėžys pacientams buvo patvirtintas histologiškai, atlikus transrektalinę priešinės liaukos biopsiją arba ištyrus mėginį, gautą transuretrinės priešinės liaukos rezekcijos metu.

Pagal ligos stadiją pacientai buvo suskirstyti į tris grupes. Pirmąją grupę (n=8) sudarė pacientai, kuriems diagnozuotas pirmos stadijos priešinės liaukos vėžys, antrąją grupę (n=43) – pacientai, kuriems diagnozuotas antros stadijos vėžys, trečiąją grupę (n=31) – pacientai, kuriems diagnozuotas trečios stadijos vėžys. Tik vienam pacientui iš 82 tiriamųjų buvo nustatyta pokyčių sritiniuose limfmazgiuose (N1), visiems kitiems pacientams pokyčių limfmazgiuose nebuvo identifikuota, todėl sritinių limfmazgių būklės įvertinimas nebuvo įtrauktas į statistinę analizę. Didžiajai daliai pacientų – 55 (67,1 %) Glisono laipsnis biopsinėje medžiagoje buvo 6. Taip pat pacientams buvo nustatyta PSA koncentracija kraujo serume ir atsižvelgiant į PSA koncentraciją pacientai buvo suskirstyti į tris grupes (6 lent.).

Pagal TNM sistemos septinto leidimo rekomendacijas pacientai buvo suskirstyti į prognozes grupes (114). Pacientas gali būti priskirtas prognozei grupei tik tuo atveju, jei yra žinoma ligos stadija, Glisono laipsnis ir PSA koncentracija. Jei Glisono laipsnis ar PSA koncentracija nenustatoma, tuomet pacientas negali būti priskirtas jokiai prognozei grupei (6 lent.).

6 lentelė. Sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų pasiskirstymas pagal amžių ir klinikinės-patologines charakteristikas

Amžius ir klinikinės-patologinės charakteristikos	Pacientai, n (%)
Amžiaus grupė: 50-63 metai 64-85 metai	43 (52,4) 39 (47,6)
Stadija: I II III	8 (9,8) 43 (52,4) 31 (37,8)
Glisono laipsnis: 6 7 8–10	55 (67,1) 20 (24,4) 7 (8,5)
PSA koncentracija serume (ng/ml): 10 ir mažiau 10–20 daugiau kaip 20	65 (79,3) 11 (13,4) 6 (7,3)
Prognozinė grupė: I IIA+IIB III	8 (9,8) 44 (53,6) 30 (36,6)

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas

Kartu su naviku priešinėje liaukoje gali būti nustatoma ligą lydintis uždegimas ar gerybinė priešinės liaukos hiperplazija (GPH). Šiame tyrime 17 tiriamųjų pacientų kartu su naviku priešinėje liaukoje buvo nustatytas ligą lydintis uždegimas; 62 pacientams – GPH (7 lent.).

7 lentelė. Sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų pasiskirstymas pagal ligą lydintį uždegimą ir gerybinę priešinės liaukos hiperplaziją

Klinikinės-patologinės charakteristikos	Pacientai, n (%)
Uždegimas: nustatytas	17 (20,7)
nenustatytas	65 (79,3)
GPH: nustatyta	62 (75,6)
nenustatyta	20 (24,4)

GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija

Sergančiųjų pacientų kraujyje buvo tirta *MMP-9* ir *MMP-11* genų raiška bei *MMP-9* (-1562 C/T) polimorfizmas.

3.3. Tyrimo metodai

3.3.1. RNR gryninimas iš kraujo ir navikinio audinio

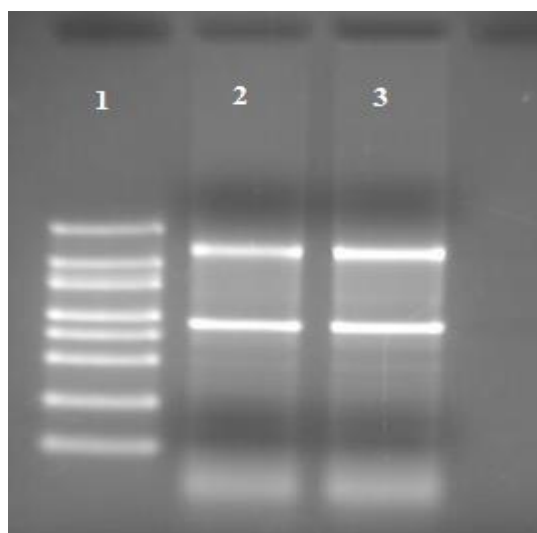
RNR gryninimas iš kraujo

RNR gryninti iš kraujo naudotas „QIAamp RNA Blood Mini Kit“ (Qiagen, Vokietija) rinkinys. Darbas atliktas pagal gamintojų instrukcijas. 1 ml kraujo praskiedžiamas 5 ml EL buferinio tirpalo. Laikoma 10-15 min. ledų vonioje. Centrifuguojama 400×g 10 min. esant 4°C temperatūrai. Tirpalas nupilamas. Nuosėdos tirpinamos 2 ml EL buferinio tirpalo. Centrifuguojama 400×g 10 min. esant 4°C temperatūrai. Nuosėdos tirpinamos RLT buferiniame tirpale ir perkeliama į kolonėlę. Centrifuguojama 2 min. maksimaliu greičiu. Kolonėlė išmetama. Į tirpalą supilamas 1 ml 70% etanolio tirpalo. Gautas mišinys perkeliama į naują kolonėlę. Centrifuguojama 8000×g 15 s. Kolonėlė perkeliama į naują mikromėgintuvėlį, pripilama 700 μl RW1 buferinio tirpalo. Centrifuguojama 8000×g 15 s. Kolonėlė perkeliama į naują mikromėgintuvėlį, pripilama 500 μl RPE buferinio tirpalo. Centrifuguojama 20000×g 3 min. Kolonėlė perkeliama į naują mikromėgintuvėlį, pridedama 40 μl vandens be

ribonukleazių. Centrifuguojama 8000×g 1 min. Išgrynintos RNR kokybė ir koncentracija nustatoma 1,0% agarozės gelyje. Fotografuojama UV šviesoje.

RNR gryninimas iš navikinio audinio

30 mg sušaldyto krūties naviko audinio sutrinama homogenizatoriumi („Mikro-dismembrator S“, Prancūzija) į miltelius, kurie suberiami į mikromėgintuvėlį, supilama 1 ml lizuojančio buferinio tirpalo ir sumaišoma. Į mišinį įpilama fenolio, chloroformo ir izoamilio alkoholio tirpalo mišinio (mišinio komponentų santykis tirpale 25:24:1). Laikoma 5 min. ledų vonioje. Centrifuguojama 12000-14000×g 5 min. esant 4°C temperatūrai. Po centrifugavimo viršutinis sluoksnis perkeliamas į naują mikromėgintuvėlį. Pripilama natrio acetato (pH 4,7) tirpalo bei fenolio ir chloroformo tirpalo mišinio (pH 4,7). Laikoma 15 min. ledų vonioje. Centrifuguojama 12000-14000×g 15 min. esant 4°C temperatūrai. Viršutinis sluoksnis perkeliamas į naują mikromėgintuvėlį, pripilama izopropanolio tirpalo ir paliekama -20°C temperatūroje 30-60 min. Centrifuguojama 12000-14000×g 15 min. esant 4°C temperatūrai. Nuosėdos praplaunamos 1 ml 75% etanolio tirpalu. Centrifuguojama 12000-14000×g 5 min. esant 4°C temperatūrai. Tirpalas nupilamas. Nuosėdos tirpinamos 30-60μl vandenyje be ribonukleazių. Genominės DNR priemaišos pašalinamos veikiant fermentu DNaze I. Inkubuojama 37°C temperatūroje vandens vonioje 15 min. Išgrynintos RNR kokybė ir koncentracija nustatoma 1,0% agarozės gelyje. Fotografuojama UV šviesoje (4 pav.).



4 pav. Išgryninta RNR iš krūties navikinio audinio

1 takelyje – RNR ilgio standartas „RNA Ladder High Range”. 2-3 takeliuose – išgryninta naviko RNR.

3.3.2. Genų raiškos tyrimas

Kopijinės DNR (cDNR) sintezei buvo naudotas kopijinės DNR (kDNR) pirmos grandinės sintezės rinkinys „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Fermentas, Lietuva). Taip pat buvo atliekama kiekvieno RNR mėginio neigiama kontrolė (be atvirkštinės transkriptazės).

Paruoštas reakcijos mišinys iš 0,1-1 µg RNR, 1µl statistinės sekos pradmens ir 12 µl vandens be ribonukleazių inkubuojamas 70°C temperatūroje 5 min. Į mišinį pridedama 4 µl 5x reakcijos buferinio tirpalo, 1 µl ribonukleazių inhibitoriaus, 1 µl atvirkštinės transkriptazės ir 2 µl 10mM dNTP mišinio. Reakcijos mišinys inkubuojamas 25°C temperatūroje 10 min ir 42°C temperatūroje 50 min.

Atvirkštinės transkriptazės polimerazės grandininė reakcija (AT PGR)

Kiekvienai pradmenų porai (*MT1-MMP*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-11*, *MMP-13*, *β-aktinui*) paruošiami PGR mišiniai: 2 µl kDNR; 5 µl 10× PGR buferinio tirpalo; 5 µl dNTP 2mM; 3 µl MgCl₂ 25mM; 25 pmol tiesioginio pradmens; 25 pmol atvirkštinio pradmens; 2,5 vnt. *Taq* DNR

polimerazės; vandens be ribonukleazių iki 50µl. Genų raiškai analizuoti naudoti pradmenys bei temperatūrinis režimas pateikti 8 lentelėje. AT PGR metodu gauti reakcijos produktai vizualizuojami 1,0% agarozės gelyje. Fotografuojama UV šviesoje.

8 lentelė. AT PGR atlikti naudoti pradmenys, sąlygos ir produkto dydis

Pradmenų sekos	PGR sąlygos				Produkto dydis
	denatūracija	prisijungimas	pratęsimas	ciklų skaičius	
<i>MT1-MMP</i> 5'-ctcctgctccccctgetcacg-3' 5'-ctcacccccataaagtgtctg-3'	95°–1 min	60°–1 min	72°–1 min	40	828 bp
<i>MMP-1</i> 5'-cgactctagaacacacaagagcaaga-3' 5'-aaggtagcttactgtcacacgctt-3'	95°–50 s	58°–50 s	72°–1 min	35	787 bp
<i>MMP-2</i> 5'-ggcaccatttacactacaccaa-3' 5'-gctccaaacttcacgctcttcag-3'	95°–50 s	62°–50 s	72°–1 min	40	694 bp
<i>MMP-3</i> 5'-gaacaatggacaaaggataca-3' 5'-ttcttcaaaaacagcatcaatctt-3'	95°–50 s	58°–50 s	72°–1 min	35	729 bp
<i>MMP-9</i> 5'-accgctatggttactactcgg-3' 5'-gcaggcagagtaggagcg-3'	95°–50 s	62°–50 s	72°–1 min	40	584 bp
<i>MMP-11</i> 5'-caggtggcagcccgaatt-3' 5'-gtactgagcaccttgaaga-3'	95°–50 s	58°–50 s	72°–1 min	35	456 bp
<i>MMP-13</i> 5'-ctatgtccaggagatgaag-3' 5'-agagtcttgcctgtatctc-3'	95°–50 s	62°–50 s	72°–1 min	40	390 bp
<i>β-aktinas</i> 5'-gtggggcgcgccaggacc-3' 5'-ctccttaatgtcacgcagattc-3'	95°–50s	62°–50s	72°–1 min	35	540 bp

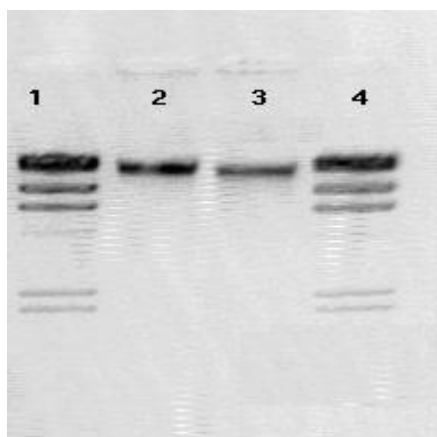
AT PGR – atvirkštinės transkriptazės polimerazės grandininė reakcija; bp – bazių poros.

3.3.3. DNR gryninimas iš kraujo

DNR gryninimas iš kraujo

DNR gryninti iš kraujo naudotas „Genomic DNA Purification Kit“ (Fermentas, Lietuva) rinkinys. Darbas atliktas pagal gamintojų instrukcijas. 200 µl kraujo užpilama lizuojančiu tirpalu, kuriame yra 20 µl proteinazės K tirpalo. Mišinys inkubuojamas 56°C temperatūroje 10 min. Į mišinį įpilama 200 µl 96% etanolio tirpalo, sumaišoma, perkeliama į mikromėgintuvėlį su kolonėle ir centrifuguojama 6000xg 1 min. Po centrifugavimo kolonėle perkeliama į naują mikromėgintuvėlį, pripilama 500 µl Wash Buffer I tirpalo ir

centrifuguojama 6000xg 1 min. Po centrifūgavimo į kolonėlę pripilama 500 µl Wash Buffer II tirpalo ir centrifuguojama 3 min. maksimaliu greičiu. Kolonėlė perkeliama į naują mikromėgintuvėlį, pripilama 100 µl Elution Buffer tirpalo, inkubuojama kambario temperatūroje 2 min. ir centrifuguojama 8000xg 1 min. Išgrynintos DNR kokybė ir koncentracija nustatoma 1,0% agarozės gelyje. Fotografuojama UV šviesoje (5 pav.).



5 pav. DNR išgryninta iš kraujo

1 ir 4 takeliuose – DNR ilgio standartas „Mass Ruler DNA Ladder Low Range“; 2-3 takeliuose iš kraujo išgryninta DNR.

3.3.4. Polimorfizmo tyrimas restrikcijos fragmento ilgio polimorfizmo metodu

Polimerazės grandininė reakcija (PCR)

MMP-3 (-1171 5A/6A) ir MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo analizei paruošti atskiri PGR mišiniai. PGR mišinį sudaro 2 µl DNR, 5 µl 10x PGR buferinio tirpalo, 5 µl 2mM dNTP, 3 µl MgCl₂, 25 pmol tiesioginio pradmens, 25 pmol atvirkštinio pradmens, 2,5 vnt. *Taq* DNR polimerazės ir vandens be ribonukleazių iki 50 µl. Polimorfizmo analizei naudoti pradmenys bei temperatūrinis režimas pateikti 9 lentelėje.

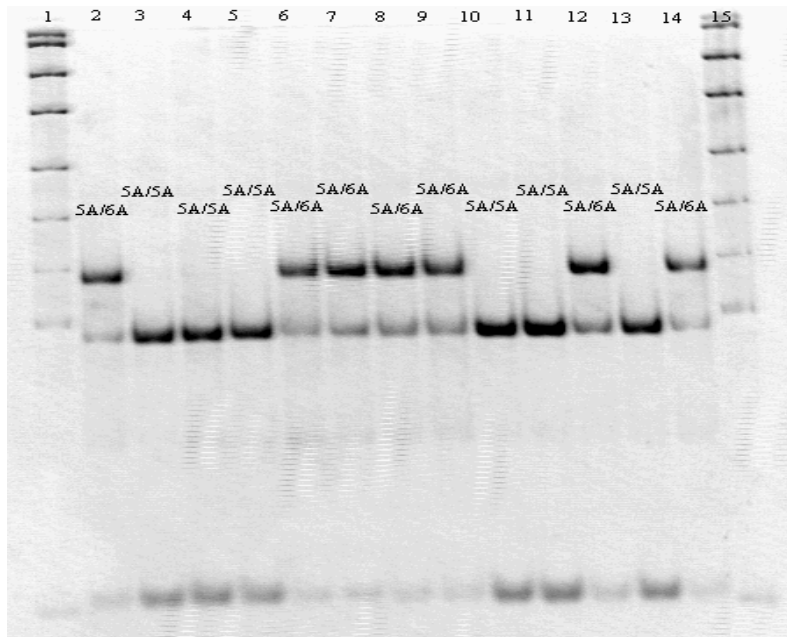
9 lentelė. PGR atlikti naudoti pradmenys ir sąlygos

Pradmenų sekos	PGR sąlygos			
	denatūracija	prisijungimas	pratęsimas	ciklų skaičius
MMP-3 (-1171 5A/6A) 5'-gggtctccattcctttgatggggggaaga-3' 5'-cttctggaattcacatcactgccaccact-3'	95° – 30 s	60° – 30 s	72° – 30 s	35
MMP-9 (-1562 C/T) 5'-gcctggcacatagtaggccc-3' 5'-cttctagccagccggcatc-3'	95° – 30 s	58° – 30 s	72° – 30 s	35

Restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo (RFIP) metodas

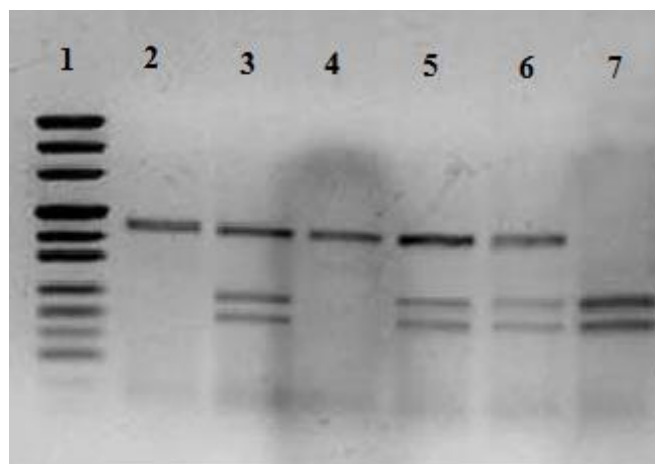
PGR metodu gauti produktai karpomi restrikcijos nukleazėmis. MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo analizei restrikcijos mišinį sudaro 10 µl PGR produkto, 2 µl 10× Buffer B tirpalo, 1 µl *Psy I* restrikcijos endonukleazės, 17 µl vandens be ribonuklezių. Restrikcijos reakcija vykdoma 2 valandas 37° C temperatūroje. RFIP metodu gauti reakcijos produktai analizuoti 8,0% poliakrilamido gelyje, UV šviesoje (6 pav.). Restrikcijos endonukleazė karmo PGR metodu gautą produktą tokiais fragmentais: esant 5A/5A variantui – 97 bp, 32 bp; 5A/6A variantui – 129 bp, 97 bp, 32 bp; 6A/6A variantui – 129 bp.

MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo analizei restrikcijos mišinį sudaro 10 µl PGR produkto, 2 µl 10× Buffer B tirpalo, 1 µl *Pae I* restrikcijos endonukleazės, 17 µl vandens be ribonuklezių. Restrikcijos reakcija vykdoma 90 min. 37° C temperatūroje. RFIP metodu gauti reakcijos produktai analizuoti 8,0% poliakrilamido gelyje, UV šviesoje (7 pav.). Restrikcijos endonukleazė karmo PGR metodu gautą produktą tokiais fragmentais: esant T/T variantui – 240 bp, 196 bp; C/T variantui – 436 bp, 240 bp, 196 bp; C/C variantui – 436 bp.



6 pav. *MMP-3* geno polimorfizmo analizė restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo (RFIP) metodu

1 ir 15 takeliuose DNR ilgio standartas „pUC Mix Marker 8“, 2, 6-9, 12 ir 14 takeliuose *MMP-3* -1171 5A/6A variantas, 3-5, 10-11 ir 13 takeliuose *MMP-3* -1171 5A/5A variantas.



7 pav. *MMP-9* geno polimorfizmo analizė restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo (RFIP) metodu

1 takelyje – DNR ilgio standartas „pUC Mix Marker 8“; 2 ir 4 takeliuose – *MMP-9* -1562 C/C variantas; 2, 5 ir 6 takeliuose – *MMP-9* -1562 C/T variantas; 7 takelyje – *MMP-9* -1562 T/T variantas.

3.3.5. Statistinė analizė

Kiekybiniams kintamiesiems vertinti buvo apskaičiuojami vidurkiai, standartiniai nuokrypiai, minimali bei maksimali reikšmės; kokybiniams – reikšmių dažniai ir santykinų dažnių procentai. Apskaičiuoti dvinarių kokybinių kintamųjų pasiskirsčiusių pagal binominį skirstinį, tikimybės pasikliautiniai intervalai. Kokybinių kintamųjų tarpusavio priklausomumui tikrinti taikytas *chi* kvadratu (χ^2) kriterijus, o esant mažam stebėjimų skaičiui – Fišerio (*angl. Fisher*) tikslusis testas. Statistiniam reikšmingumui įvertinti pasirinktas reikšmingumo lygmuo $\alpha=0,05$, kai $p<0,05$, H_0 hipotezė atmetama. Ryšio stiprumui tarp kokybinių kintamųjų nustatyti apskaičiuotas Spirmeno (*angl. Spearman*) koreliacijos koeficientas (*r*). Koreliacija vertinta kaip labai silpna, jei *r* buvo mažiau už 0,19; silpna – jei *r* reikšmė buvo 0,20-0,39 intervale; vidutinė – jei *r* reikšmė buvo 0,40-0,69 intervale; stipri – jei *r* reikšmė buvo 0,70-0,89 intervale, labai stipri – jei *r* reikšmė buvo 0,90-1,00 intervale.

Tyrime dalyvaujantys pacientai stebėti 6 metus, į tyrimą įtraukiant skirtingu laiku. Krūties vėžio atveju stebėjimo pradžios data buvo operacijos data, o priešinės liaukos vėžio atveju – diagnozės patvirtinimo data. Stebėjimo baigties įvykiu pasirinkta paciento mirtis. Stebėjimo duomenys buvo cenzūruoti, nes didžioji dauguma pacientų stebėjimo laikotarpį išgyveno. Išgyvenamumas analizuotas pritaikius Kaplano-Majerio (*angl. Kaplan-Meier*) metodą. Išgyvenamumo kreivėms palyginti naudotas *log-rank* testas. Išgyvenamumo veiksnių prognozinė analizė atlikta pritaikius Kokso proporcingų rizikų regresijos (*angl. Cox regression*) analizės modelį. Daugiaveiksniame pažingsniniame (*angl. multivariate stepwise*) modelyje buvo analizuoti tie veiksniai, kurių patikimumas vienaveiksniame (*angl. univariate*) modelyje buvo ne didesnis nei 0,2.

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant duomenų analizės programų paketą SPSS 20.0 (*Armonk, NY: IBM Corp., JAV, 2011*).

4. REZULTATAI

4.1. Krūties vėžys

Daugumos atliktų mokslinių darbų rezultatai liudija apie MMP raiškos tyrimo svarbą onkologiniu aspektu. Manoma, kad MMP galima būtų vertinti kaip prognozinis vėžio žymenis, susijusius su blogesne ligos eiga. Bet šių fermentų įvertinimas vis dar nėra taikomas klinikinėje praktikoje, nes trūksta susistemintų tyrimų rezultatų (39, 62, 74). Sergančių krūties vėžiu pacientų kraujyje buvo pasirinkta tirti *MMP-9* ir *MMP-11* genų raišką. *MMP-9* yra viena labiausiai tiriamų MMP sergant įvairiomis ligomis, įskaitant vėžį; *MMP-11* didelė raiška siejama su blogesne sergančiųjų krūties vėžiu ligos prognoze. Teigiama, kad navikiniame audinyje ekspresuojamos MMP yra „išmetamos“ į kraują didesniais kiekiais ir taip skatinamas ligos progresavimas (124). Įvairių šalių mokslininkų atlikti tyrimai, nustatant MMP raišką kraujyje, išlieka kontroversiški, tyrimų rezultatai nėra susisteminti, todėl MMP genų raiškos tyrimai aktualūs. Taip pat šiame tyrime sergančiosioms krūties vėžiu pacientėms buvo tiriama *MT1-MMP*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-11*, *MMP-13* genų raiška krūties navikuose ir *MMP-3* (-1171 5A/6A) (rs3025058) bei *MMP-9* (-1562 C/T) (rs3918242) genų polimorfizmas sergančiųjų krūties vėžiu kraujyje.

4.1.1. Matrikso metaloproteinazių genų raiška sergančiųjų krūties vėžiu kraujyje

Kaip jau minėta, į tyrimą buvo įtrauktos 88 pacientės, sergančios krūties vėžiu. Pagal amžiaus medianą pacientės buvo suskirstytos į dvi grupes; pagal ligos stadiją – į tris grupes; pagal naviko histologiją – į dvi grupes; pagal naviko diferenciacijos laipsnį – į tris grupes; pagal limfmazgių būklę – į tris grupes; pagal ER ir PR reakciją navikiniame audinyje – į dvi grupes.

Teigiama *MMP-9* geno raiška kraujyje nustatyta 40 pacientų (45,5%, 95% PI 40,15-50,76), o *MMP-11* geno raiška – 30 pacientų (34,1%, 95% PI

29,04-39,14). Vertinant tirtųjų MMP raišką priklausomai nuo amžiaus ir pacienčių klinikinių-patologinių charakteristikų, statistiškai reikšmingi skirtumai nustatyti tik tarp *MMP-9* geno raiškos kraujyje ir naviko diferenciacijos laipsnio ($p=0,02$) (10 lent.).

Sąsajų tarp kintamųjų įvertinimas pagal *chi* kvadratu (χ^2) kriterijų nėra pakankamas, todėl tiriamųjų parametrų (MMP genų raiškos ir klinikinių-patologinių parametrų) ryšių stiprumas buvo papildomai įvertintas atliekant koreliacinę analizę. Kuo tiriamųjų parametrų priklausomybė didesnė, tuo koreliacijos koeficiento r reikšmė arčiau -1 ir 1; kuo r reikšmė arčiau nulio – tuo požymių priklausomybė silpnesnė.

10 lentelė. MMP genų raiškos analizė kraujyje priklausomai nuo sergančių krūties vėžiu pacienčių amžiaus ir klinikinių-patologinių charakteristikų

Kintamieji	MMP-9 raiška		P	MMP-11 raiška		P
	teigiama,n (%)	neigiama,n (%)		teigiama,n (%)	neigiama,n (%)	
Amžiaus grupė: 31–56 metai 57–83 metai	22 (55,0) 18 (45,0)	19 (39,6) 29 (60,4)	0,10	17 (56,7) 13 (43,3)	24 (41,4) 34 (58,6)	0,12
Stadija: I II III/IV	5 (12,5) 30 (75,0) 5 (12,5)	16 (33,3) 27 (56,3) 5 (10,4)	0,07	7 (23,3) 19 (63,3) 4 (13,4)	14 (24,2) 38 (65,5) 6 (10,3)	0,91
Naviko histologinis tipas: duktalinė karcinoma lobulinė karcinoma	34 (87,2) 5 (12,8)	37 (80,4) 9 (19,6)	0,29	26 (86,7) 4 (13,3)	45 (81,8) 10 (18,2)	0,40
Naviko diferenciacijos laipsnis: G1 G2 G3	3 (7,5) 23 (57,5) 14 (35,0)	14 (29,1) 25 (52,1) 9 (18,8)	0,02	6 (20,0) 14 (46,7) 10 (33,3)	11 (19,0) 34 (58,6) 13 (22,4)	0,48
Limfmazgių būklė: N0 N1 N2	16 (40,0) 21 (52,0) 3 (8,0)	29 (60,4) 15 (31,3) 4 (8,3)	0,12	15 (50,0) 14 (46,7) 1 (3,3)	30 (51,8) 22 (37,9) 6 (10,3)	0,44
ER: neigiami teigiami	21 (52,5) 19 (47,5)	13 (27,1) 35 (72,9)	0,13	15 (50,0) 15 (50,0)	19 (32,8) 39 (67,2)	0,09
PR: neigiami teigiami	19 (47,5) 21 (52,5)	14 (29,2) 34 (70,8)	0,06	14 (46,7) 16 (53,3)	19 (32,8) 39 (67,2)	0,14

G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas; N0 – sritiniuose limfmazgiuose metastazių nėra; N1 – yra paslankių metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose; N2 – yra metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose, suaugusių tarpusavyje ir su kitomis struktūromis; ER – estrogenų receptoriai; PR – progesterono receptoriai.

Įvertinus tiriamųjų parametru ryšių stiprumą, nustatytas silpnas, tačiau statistiškai reikšmingas ryšys tarp *MMP-9* geno raiškos kraujyje ir naviko diferenciacijos laipsnio ($r=0,279$, $p=0,009$). Tikimybė nustatyti *MMP-9* raišką kraujyje didėja esant blogos diferenciacijos navikui. Taip pat nustatytas silpnas, tačiau statistiškai reikšmingas ryšys tarp *MMP-9* geno raiškos kraujyje ir ER būklės ($r=-0,260$, $p=0,01$). Tikimybė nustatyti *MMP-9* raišką kraujyje yra didesnė nesant ER raiškos navike. Statistiškai reikšmingų ryšių tarp *MMP-11* geno raiškos kraujyje ir tirtųjų klinikinių-patologinių parametru nustatyta nebuvo (11 lent.).

11 lentelė. MMP genų raiškos kraujyje ir sergančių krūties vėžiu pacienčių klinikinių-patologinių charakteristikų koreliacinė analizė

Kintamieji	<i>MMP-9</i>		<i>MMP-11</i>	
	r	p	r	p
Amžius	-0,154	0,15	-0,145	0,17
Stadija	0,205	0,05	0,029	0,78
Naviko histologinis tipas	0,100	0,35	0,109	0,31
Naviko diferenciacijos laipsnis	0,279	0,009	0,073	0,49
Limfmazgių būklė	0,178	0,09	-0,017	0,87
ER raiška	-0,260	0,01	-0,168	0,11
PR raiška	-0,189	0,07	-0,136	0,20

r – koreliacijos koeficientas, ER – estrogenų receptoriai; PR – progesterono receptoriai

Tyrimė dalyvavusių 88 pacienčių, sergančių krūties vėžiu, išgyvenamumo tikimybė buvo įvertinta priklausomai nuo nustatytos MMP genų raiškos kraujyje.

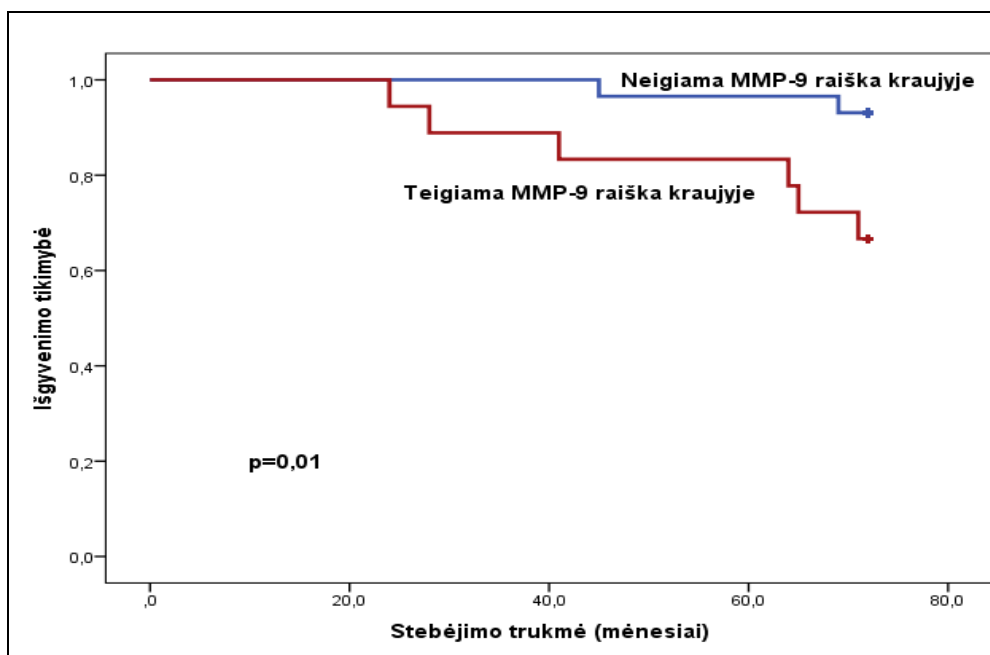
Atlikta išgyvenamumo analizė Kaplano-Majerio metodu parodė, kad *MMP-9* geno raiška susijusi su pacienčių išgyvenamumu priklausomai nuo amžiaus, ligos stadijos ir PR raiškos navike (12 lent.).

12 lentelė. Sergančių krūties vėžiu pacientų išgyvenamumo tikimybės analizė pagal *MMP-9* ir *MMP-11* genų raišką kraujyje

Kintamieji	<i>MMP-9</i>	<i>MMP-11</i>
	p (<i>log-rank</i>)	
Amžiaus grupė: 31–56 metai 57–83 metai	0,49 0,01	0,90 0,46
Stadija: I II III/IV	0,57 0,26 <0,001	0,48 0,57 0,81
Naviko histologinis tipas: duktalinė karcinoma lobulinė karcinoma	0,08 0,66	0,49 0,90
Naviko diferenciacijos laipsnis: G1 G2 G3	0,50 0,34 0,63	0,68 0,81 0,90
Limfmazgių būklė: N0 N1 N2	0,80 0,65 0,24	0,16 0,70 0,68
ER: neigiami teigiami	0,46 0,65	0,22 0,39
PR: neigiami teigiami	0,02 0,71	0,16 0,64

G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas; N0 – sritiniuose limfmazgiuose metastazių nėra; N1 – yra paslankių metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose; N2 – yra metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose, suaugusių tarpusavyje ir su kitomis struktūromis; ER – estrogenų receptoriai; PR – progesterono receptoriai.

Vyresnės pacientės (57–83 metų), kurioms nebuvo nustatyta *MMP-9* geno raiškos kraujyje, išgyveno ilgiau, palyginti su tomis to paties amžiaus pacientėmis, kurioms *MMP-9* raiška kraujyje buvo nustatyta (*log-rank* p=0,01) (8 pav.).



8 pav. Sergančių krūties vėžiu vyresnio amžiaus (57–83 m.) pacientų išgyvenamumo kreivės pagal *MMP-9* geno raišką kraujyje

Tiriamajoje grupėje, suskirsčius pacientės pagal ligos stadijas, pacientės, kurioms buvo diagnozuota vėlyvosios stadijos (III/IV) liga ir kraujyje nenustatyta *MMP-9* geno raiškos, išgyveno ilgiau nei tos vėlyvų stadijų liga sergančios pacientės, kurioms *MMP-9* raiška buvo nustatyta ($p < 0,001$). Panašūs rezultatai gauti ir suskirsčius pacientės pagal PR raišką navikuose. Pacientės, kurioms PR raiškos navikuose ir *MMP-9* raiškos kraujyje nebuvo nustatyta, išgyveno ilgiau, palyginti su tomis pacientėmis, kurioms *MMP-9* geno raiška kraujyje buvo identifikuota (*log-rank* $p = 0,02$) (12 lent.).

4.1.2. Matrikso metaloproteinazių genų polimorfizmas sergančiųjų krūties vėžiu kraujyje

Tyrimams buvo pasirinktas *MMP-3* (-1171 5A/6A) (rs3025058) geno polimorfizmas dėl to, kad tiriamoje, sergančiųjų krūties vėžiu grupėje nustatytos *MMP-3* raiškos krūties navike sąsajos su klinikiniais-patologiniais ligos parametrais (Žr. 4.1.3. poskyrį). *MMP-9* (-1562 C/T) (rs3918242) geno

polimorfizmas pasirinktas kaip labiausiai tyrinėjamas esant įvairioms ligoms, įskaitant ir vėžį.

Visoms tyrime dalyvavusioms pacientėms buvo nustatytas MMP-3 (-1171 5A/6A) ir MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmas. *MMP-3* geno polimorfizmo 5A/5A, 5A/6A ir 6A/6A variantai nustatyti atitinkamai 15 (17,0%, 95% PI 13,04-21,05) atvejų, 57 (64,8 %, 95% PI 59,68-69,86) atvejais ir 16 (18,2 %, 95% PI 14,07-22,29) atvejų. *MMP-9* geno polimorfizmo C/C, C/T ir T/T variantai nustatyti 39 (44,3 %, 95% PI 39,02-49,61) atvejais, 38 (43,2 %, 95% PI 37,90-48,46) atvejais ir 11 (12,5 %, 95% PI 8,97-16,03) atvejų. Išanalizavus variantų pasiskirstymą priklausomai nuo amžiaus ir klinikinių-patologinių parametrų, MMP-3 (-1171 5A/6A) geno polimorfizmo variantų pasiskirstymas grupėse statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Statistiškai reikšmingi pasiskirstymai nustatyti tarp MMP-9 (-1562 C/T) geno polimorfizmo variantų ir ligos stadijos ($p=0,02$), naviko histologinio tipo ($p=0,05$) bei sritinių limfmazgių būklės ($p=0,002$) (13 lent.).

13 lentelė. MMP genų polimorfizmo analizė sergančių krūties vėžiu pacientų kraujyje priklausomai nuo amžiaus ir klinikinių-patologinių charakteristikų

Kintamieji	MMP-3 -1171 polimorfizmas			P	MMP-9 -1562 polimorfizmas			P
	5A/5A, n (%)	5A/6A, n (%)	6A/6A, n (%)		C/C, n (%)	C/T, n (%)	T/T, n (%)	
Amžiaus grupė: 31–56 metai 57–83 metai	7 (46,7) 8 (53,3)	26 (45,6) 31 (54,4)	8 (50,0) 8 (50,0)	0,95	20 (51,3) 19 (48,7)	15 (39,5) 23 (60,5)	6 (54,5) 5 (45,5)	0,49
Stadija: I II III/IV	1 (6,7) 10 (66,7) 4 (26,7)	14 (24,6) 39 (68,4) 4 (7,0)	6 (37,5) 8 (50,0) 2 (12,5)	0,09	12 (30,8) 25 (64,1) 2 (5,1)	9 (23,7) 25 (65,8) 4 (10,5)	0 7 (63,6) 4 (36,4)	0,02
Naviko histologinis tipas: duktalinė karcinoma lobulinė karcinoma	13 (86,7) 2 (13,3)	47 (85,5) 8 (14,5)	11 (73,3) 4 (26,7)	0,49	34 (94,4) 2 (5,6)	28 (73,7) 10 (26,3)	9 (81,8) 2 (18,2)	0,05
Naviko diferenciacijos laipsnis: G1 G2 G3	3 (20,0) 7 (46,7) 5 (5,7)	11 (19,3) 32 (56,1) 14 (24,6)	3 (18,8) 9 (56,2) 4 (25,0)	0,96	11 (28,2) 18 (46,2) 10 (25,6)	5 (13,2) 22 (57,9) 11 (28,9)	1 (9,1) 8 (72,7) 2 (18,2)	0,33
Limfmazgių būklė: N0 N1 N2	7 (46,7) 6 (40,0) 2 (13,3)	29 (50,9) 24 (42,1) 4 (7,0)	9 (56,3) 6 (37,5) 1 (6,2)	0,92	24 (61,5) 14 (35,9) 1 (2,6)	19 (50,0) 17 (44,7) 2 (5,3)	2 (18,2) 5 (45,5) 4 (36,4)	0,002
ER: neigiami teigiami	7 (46,7) 8 (53,3)	23 (40,4) 34 (59,6)	4 (25,0) 12 (75,0)	0,42	14 (35,9) 25 (64,1)	13 (34,2) 25 (65,8)	7 (63,6) 4 (36,4)	0,18
PR: neigiami teigiami	6 (40,0) 9 (60,0)	21 (36,8) 36 (63,2)	6 (37,5) 10 (62,5)	0,97	13 (33,3) 26 (66,7)	14 (36,8) 24 (63,2)	6 (54,5) 5 (45,5)	0,43

G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas; N0 – sritiniuose limfmazgiuose metastazių nėra; N1 – yra paslankių metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose; N2 – yra metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose, suaugusių tarpusavyje ir su kitomis struktūromis; ER – estrogenų receptoriai; PR – progesterono receptoriai.

Kitoje analizės dalyje, panaudojus koreliacinės analizės metodą, įvertintas tiriamųjų parametrų ryšių stiprumas. 14 lentelėje pateikti koreliacinės analizės rezultatai tarp tirtųjų MMP genų polimorfizmo sergančiųjų krūties vėžiu kraujyje ir klinikinių-patologinių charakteristikų.

14 lentelė. MMP genų polimorfizmo ir sergančiųjų krūties vėžiu pacienčių klinikinių-patologinių charakteristikų koreliacinė analizė

Kintamieji	MMP genų polimorfizmas			
	MMP-3 (-1171 5A/6A)		MMP-9 (-1562 C/T)	
	r	p	r	p
Amžius	-0,021	0,84	0,048	0,65
Stadija	0,228	0,03	0,273	0,01
Naviko histologinis tipas	0,140	0,19	0,096	0,37
Naviko diferenciacijos laipsnis	-0,032	0,76	0,102	0,34
Limfmazgių būklė	0,070	0,51	0,288	0,007
ER raiška	0,133	0,21	-0,109	0,31
PR raiška	0,015	0,89	-0,110	0,30

r – koreliacijos koeficientas, ER – estrogenų receptoriai; PR – progesterono receptoriai.

Iš 14 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad nustatytas silpnas, tačiau statistiškai reikšmingas ryšys tarp MMP-3 (-1171 5A/6A) geno polimorfizmo ir ligos stadijos. Esant vėlyvosioms ligos stadijoms dažniau nustatyti 5A/5A ar 5A/6A variantai kraujyje, t.y. tie polimorfizmo variantai, kurie siejami su blogesne ligos prognoze. Panašiai ir MMP-9 (-1562 C/T) geno polimorfizmo atveju nustatytas silpnas, tačiau statistiškai reikšmingas ryšys tarp tiriamo polimorfizmo ir ligos stadijos bei limfmazgių būklės. Esant vėlyvosioms ligos stadijoms ar esant pokyčių limfmazgiuose, dažniau nustatytas T/T variantas, kuris siejamas su blogesne ligos eiga.

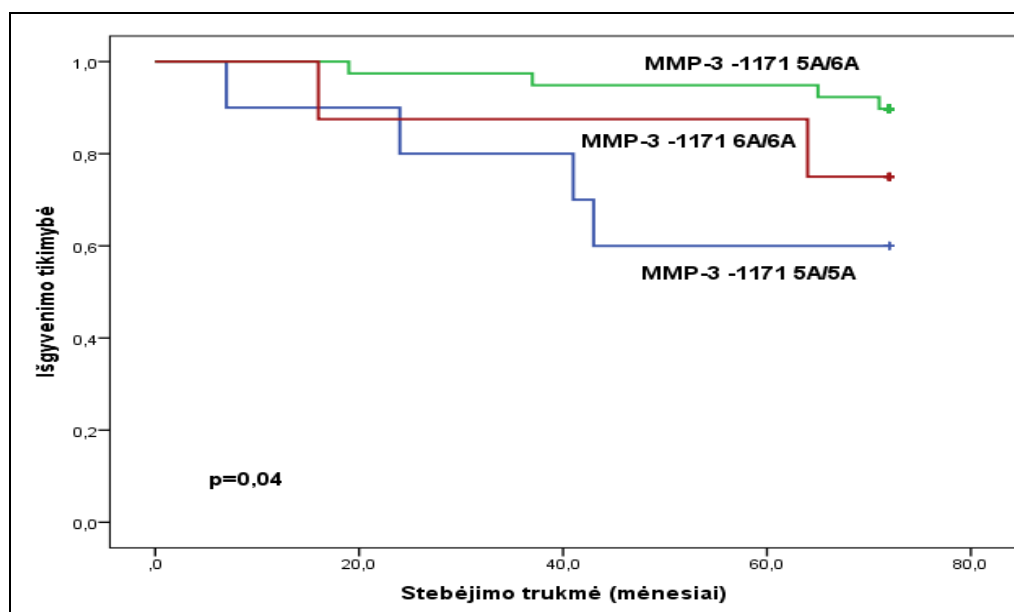
Atlikta išgyvenamumo analizė Kaplano-Majerio metodu parodė, kad MMP-3 geno (-1171 5A/6A) polimorfizmas susijęs su pacienčių išgyvenamumu priklausomai nuo ligos stadijos, naviko histologinio tipo, diferenciacijos laipsnio, limfmazgių būklės ir PR raiškos navike (15 lent.).

15 lentelė. Sergančių krūties vėžiu pacienčių išgyvenamumo tikimybės analizė
pagal MMP-3 (-1171 5A/6A) geno polimorfizmą

Kintamieji	MMP-3 (-1171 5A/6A) geno polimorfizmas
	p (log-rank)
Amžiaus grupė: 31–56 metai 57–83 metai	0,13 0,14
Stadija: I II III/IV	0,77 0,04 0,49
Naviko histologinis tipas: duktalinė karcinoma lobulinė karcinoma	0,01 0,32
Naviko diferenciacijos laipsnis: G1 G2 G3	0,003 0,47 0,09
Limfmazgių būklė: N0 N1 N2	<0,001 0,68 0,68
ER: neigiami teigiami	0,29 0,06
PR: neigiami teigiami	0,49 0,02

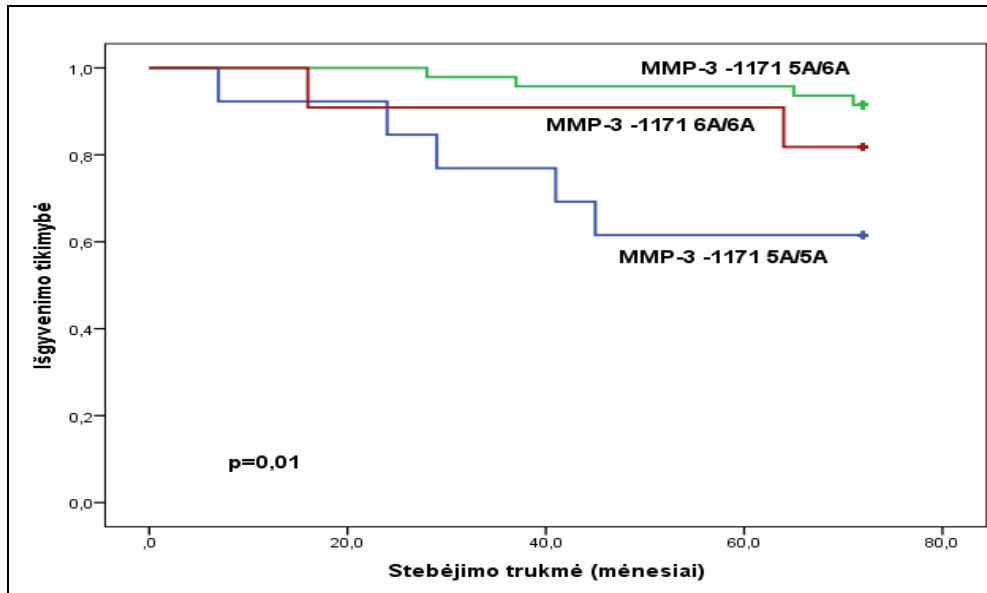
G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas; N0 – sritiniuose limfmazgiuose metastazių nėra; N1 – yra paslankių metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose; N2 – yra metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose, suaugusių tarpusavyje ir su kitomis struktūromis; ER – estrogenų receptoriai; PR – progesterono receptoriai

Pacientės, kurioms buvo diagnozuotas antros stadijos vėžys ir nustatyti MMP-3 -1171 5A/6A ar 6A/6A variantai kraujyje, išgyveno ilgiau, palyginti su tos pačios stadijos liga sergančiomis pacientėmis, kurioms buvo nustatytas 5A/5A variantas (*log-rank* $p=0,04$) (9 pav.).



9 pav. Antros stadijos krūties vėžiu sergančių pacienčių išgyvenamumo kreivės pagal MMP-3 (-1171 5A6A) polimorfizmą kraujyje

Histologiškai identifikavus naviką kaip duktalinę karcinomą, tos pacientės, kurioms kraujyje buvo nustatyti MMP-3 -1171 5A/6A ar 6A/6A variantai, taip pat išgyveno ilgiau nei tos pacientės, kurių kraujyje buvo nustatytas 5A/5A variantas (*log-rank* $p=0,01$) (10 pav.).



10 pav. Krūties vėžiu sergančių pacientėlių, kurioms diagnozuota duktalinė karcinoma, išgyvenamumo kreivės pagal MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmą kraujyje

Panašūs rezultatai gauti įvertinus ir kitus klinikinius patologinius parametrus pagal tiriamąjį *MMP-3* geno polimorfizmą. Skirtingose pacientėlių grupėse histologiškai identifikavus naviką kaip gerai diferencijuotą, nesant pokyčių limfmazgiuose ar esant teigiamai PR raiškai navike, tos pacientės, kurioms nustatyti MMP-3 -1171 5A/6A ar 6A/6A variantai išgyveno ilgiau nei tos pacientės, kurioms identifiкуotas 5A/5A variantas (atitinkamai, *log-rank* $p=0,003$, $p<0,001$, $p=0,02$) (15 lent.).

Tolesnio tyrimo etapo metu, įvertinus tirtojo *MMP-9* geno polimorfizmą (-1562 C/T) ir atlikus išgyvenamumo analizę Kaplano-Majerio metodu, nustatyta, kad MMP-9 (-1562 C/T) geno polimorfizmas susijęs su pacientėlių išgyvenamumu priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio ir pokyčių limfmazgiuose (16 lent.).

16 lentelė. Sergančių krūties vėžiu pacientų išgyvenamumo tikimybės analizė pagal MMP-9 (-1562 C/T) geno polimorfizmą kraujyje

Kintamieji	MMP-9 (-1562 C/T) geno polimorfizmas
	p (log-rank)
Amžiaus grupė: 31–56 metai 57–83 metai	0,33 0,78
Stadija: I II III/IV	0,24 0,24 0,15
Naviko histologinis tipas: duktalinė karcinoma lobulinė karcinoma	0,16 0,50
Naviko diferenciacijos laipsnis: G1 G2 G3	0,80 0,95 0,001
Limfmazgių būklė: N0 N1 N2	<0,001 0,61 0,28
ER: neigiami teigiami	0,29 0,67
PR: neigiami teigiami	0,29 0,62

G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas; N0 – sritiniuose limfmazgiuose metastazių nėra; N1 – yra paslankių metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose; N2 – yra metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose, suaugusių tarpusavyje ir su kitomis struktūromis; ER – estrogenų receptoriai; PR – progesterono receptoriai.

Pacientės, kurioms buvo diagnozuotas blogai diferencijuotas (G3) krūties navikas ir nustatytas MMP-9 -1562 C/T ar C/C variantas, išgyveno ilgiau, nei tos pacientės, kurioms nustatytas TT variantas (*log-rank* p=0,001). Panašūs rezultatai gauti ir suskirsčius pacientes pagal pokyčius limfmazgiuose. Nesant pokyčių limfmazgiuose (N0) ilgiau išgyveno pacientės, kurioms nustatytas MMP-9 -1562 C/T ar C/C variantas nei tos pacientės, kurioms nustatytas T/T variantas (*log-rank* p<0,001).

4.1.3. Matrikso metaloproteinazių genų raiška krūties navikuose

Kaip jau minėta, buvo tiriama *MT1-MMP*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-11* ir *MMP-13* genų raiška krūties navikuose.

Sergančiųjų navikuose *MT1-MMP* geno raiška nustatyta 82 atvejais (93,2 %, 95% PI 90,49-95,87), *MMP-1* – 37 atvejais (42 %, 95% PI 36,78-47,31), *MMP-2* – 82 atvejais (93,2 %, 95% PI 90,49-95,87), *MMP-3* – 53 atvejais (60,2 %, 95% PI 55,01-65,44), *MMP-9* – 82 atvejais (93,2 %, 95% PI 90,49-95,87), *MMP-11* – 87 atvejais (98,8 %, 95% PI 97,73-99,99), *MMP-13* – 62 atvejais (70,5 %, 95% PI 65,59-75,32).

Sugrupavus pacientes pagal amžių ir įvertinus, ar tirtų MMP genų raišką galima sieti su pacienčių amžiumi, konstatuota, kad *MMP-3* geno raiška navike reikšmingai dažniau nustatyta jaunesnėms pacientėms (31–56 metai) ($p=0,04$) (17 lent.). Suskirsčius pacientes pagal ligos stadiją konstatuota, kad keturių tirtų MMP genų – *MT1-MMP* ($p=0,002$), *MMP-1* ($p=0,02$), *MMP-3* ($p=0,005$) ir *MMP-13* ($p=0,006$) (17 lent.), raiška susijusi su ligos stadija. Vertinant MMP genų raišką priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio ir limfmazgių būklės, statistiškai reikšmingi skirtumai nustatyti tarp *MMP-13* geno raiškos ir naviko diferenciacijos laipsnio ($p=0,02$) bei tarp *MT1-MMP* geno raiškos ir limfmazgių būklės ($p=0,04$) (17 lent.). Kitų statistiškai reikšmingų skirtumų tarp MMP genų raiškos ir klinikinių-patologinių charakteristikų (naviko histologinis tipas, ER, PR raiška) nenustatyta.

17 lentelė. MMP genų raiškos analizė krūties navikuose priklausomai nuo sergančių krūties vėžiu pacienčių amžiaus ir klinikinių-patologinių charakteristikų

Charakteristika MMP raiška	Amžius		p	Stadija			p	Naviko histologinis tipas		p	Naviko diferenciacijos laipsnis			p
	31–56 m.	57–83 m.		I	II	III/IV		DCa	LCa		G1	G2	G3	
MT1-MMP teigiama, n (proc.)	40 (48,8)	42 (51,2)	0,13	16 (19,5)	56 (68,3)	10 (12,2)	0,002	68 (84,0)	13 (16,0)	0,52	16 (19,5)	45 (54,9)	21 (25,6)	0,91
neigiama, n (proc.)	1 (16,7)	5 (83,3)		5 (83,3)	1 (16,7)	0		3 (75,0)	1 (25,0)		1 (16,7)	3 (50,0)	2 (33,3)	
MMP-1 teigiama, n (proc.)	20 (54,1)	17 (45,9)	0,16	5 (13,5)	30 (81,1)	2 (5,4)	0,02	31 (83,8)	6 (16,2)	0,59	7 (18,9)	16 (43,3)	14 (37,8)	0,08
neigiama, n (proc.)	21 (41,2)	30 (58,8)		16 (31,4)	27 (52,9)	8 (15,7)		40 (83,3)	8 (16,7)		10 (19,6)	32 (62,8)	9 (17,6)	
MMP-2 teigiama, n (proc.)	39 (47,6)	43 (52,4)	0,40	21 (25,6)	51 (62,2)	10 (12,2)	0,17	67 (84,8)	12 (15,2)	0,25	17 (20,7)	42 (51,2)	23 (28,1)	0,06
neigiama, n (proc.)	2 (33,3)	4 (66,7)		0	6 (100,0)	0		4 (66,7)	2 (33,3)		0	6 (100,0)	0	
MMP-3 teigiama, n (proc.)	29 (54,7)	24 (45,3)	0,04	7 (13,2)	37 (69,8)	9 (17,0)	0,005	44 (83,0)	9 (17,0)	0,56	9 (17,0)	28 (52,8)	16 (30,2)	0,52
neigiama, n (proc.)	12 (34,3)	23 (65,7)		14 (40,0)	20 (57,1)	1 (2,9)		27 (84,4)	5 (15,6)		8 (22,9)	20 (57,1)	7 (20,0)	
MMP-9 teigiama, n (proc.)	39 (47,6)	43 (52,4)	0,40	20 (23,9)	52 (64,7)	10 (11,4)	0,54	65 (82,3)	14 (17,7)	0,32	16 (19,5)	43 (52,4)	23 (28,1)	0,26
neigiama, n (proc.)	2 (33,3)	4 (66,7)		1 (16,7)	5 (83,3)	0		6 (100,0)	0		1 (16,7)	5 (83,3)	0	
MMP-11 teigiama, n (proc.)	40 (46,0)	47 (54,0)	0,46	20 (23,0)	57 (65,5)	10 (11,5)	0,19	71 (81,6)	16 (18,4)	0,19	16 (18,4)	48 (55,2)	23 (26,4)	0,12
neigiama, n (proc.)	1 (100,0)	0		1 (100,0)	0	0		0	1 (100,0)		1 (100,0)	0	0	
MMP-13 teigiama, n (proc.)	29 (46,8)	33 (53,2)	0,57	9 (14,5)	45 (72,6)	8 (12,9)	0,006	49 (80,3)	12 (19,7)	0,17	8 (12,9)	34 (54,8)	20 (32,3)	0,02
neigiama, n (proc.)	12 (46,2)	14 (53,8)		12 (46,2)	12 (46,2)	2 (7,6)		22 (91,7)	2 (8,3)		9 (34,6)	14 (53,9)	3 (11,5)	

DCa – duktalinė karcinoma; LCa – lobulinė karcinoma, G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas.

17 lentelės tęsinys. MMP genų raiškos analizė navikuose priklausomai nuo sergančių krūties vėžiu pacienčių klinikinių-patologinių charakteristikų

Charakteristika MMP raiška	Sritinių limfmazgių būklė			p	ER		p	PR		p
	N0	N1	N2		neigiami	teigiami		neigiami	teigiami	
MT1-MMP teigiama, n (proc.)	39 (47,6)	36 (43,9)	7 (8,5)	0,04	32 (39,0)	50 (61,0)	0,57	31 (37,8)	51 (62,2)	0,59
neigiama, n (proc.)	6 (100,0)	0	0		2 (33,3)	4 (66,7)		2 (33,3)	4 (66,7)	
MMP-1 teigiama, n (proc.)	17 (45,9)	19 (51,4)	1 (2,7)	0,11	16 (43,2)	21 (56,8)	0,29	16 (43,2)	21 (56,8)	0,23
neigiama, n (proc.)	28 (54,9)	17 (33,3)	6 (11,8)		18 (35,3)	33 (64,7)		17 (33,3)	34 (66,7)	
MMP-2 teigiama, n (proc.)	42 (51,2)	34 (41,5)	6 (7,3)	0,70	33 (40,2)	49 (59,8)	0,24	32 (39,0)	50 (61,0)	0,26
neigiama, n (proc.)	3 (50,0)	2 (33,3)	1 (16,7)		1 (16,7)	5 (83,3)		1 (16,7)	5 (83,3)	
MMP-3 teigiama, n (proc.)	22 (41,5)	25 (47,2)	6 (11,3)	0,06	22 (41,5)	31 (58,5)	0,32	19 (35,8)	34 (64,2)	0,43
neigiama, n (proc.)	23 (65,7)	11 (31,4)	1 (2,9)		12 (34,3)	23 (65,7)		14 (40,0)	21 (60,0)	
MMP-9 teigiama, n (proc.)	42 (51,3)	33 (40,2)	7 (8,5)	0,72	32 (39,0)	50 (61,0)	0,57	30 (36,6)	52 (63,4)	0,40
neigiama, n (proc.)	3 (50,0)	3 (50,0)	0		2 (33,3)	4 (66,7)		3 (50,0)	3 (50,0)	
MMP-11 teigiama, n (proc.)	44 (50,6)	36 (41,4)	7 (8,0)	0,61	33 (37,9)	54 (62,1)	0,38	32 (36,8)	55 (63,2)	0,37
neigiama, n (proc.)	1 (100,0)	0	0		1 (100,0)	0		1 (100,0)	0	
MMP-13 teigiama, n (proc.)	29 (46,8)	27 (43,5)	6 (9,7)	0,38	24 (38,7)	38 (61,3)	0,58	22 (35,5)	40 (64,5)	0,35
neigiama, n (proc.)	16 (61,6)	9 (34,6)	1 (3,8)		10 (38,5)	16 (61,5)		11 (42,3)	15 (57,7)	

N0 – sritiniuose limfmazgiuose metastazių nėra; N1 – yra paslankių metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose; N2 – yra metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose, suaugusių tarpusavyje ir su kitomis struktūromis; ER – estrogenų receptoriai; PR – progesterono receptoriai.

Panaudojus koreliacinės analizės metodą įvertintas tiriamųjų parametru ryšių stiprumas. Iš 18 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad nustatytas silpnas, tačiau statistiškai reikšmingas ryšys tarp *MT1-MMP*, *MMP-3* ir *MMP-13* genų raiškos navike ir ligos stadijos. Tikimybė nustatyti šių genų raišką navike didesnė esant vėlyvosioms ligos stadijoms. Tarp *MT1-MMP* ir *MMP-11* genų raiškos navike ir naviko histologinio tipo taip pat nustatytas silpnas, tačiau statistiškai reikšmingas ryšys. Tikimybė nustatyti *MMP-13* geno raišką navike didesnė esant blogai diferencijuotam navikui. Be to, esant pokyčių sritiniuose limfmazgiuose, didėja tikimybė nustatyti *MT1-MMP* ir *MMP-3* genų raišką krūties navike, nes tarp šių genų raiškos ir limfmazgių būklės nustatytas silpnas, tačiau statistiškai patikimas ryšys.

18 lentelė. MMP genų raiškos krūties navikuose ir pacienčių klinikinių-patologinių charakteristikų koreliacinė analizė

Kintamieji	<i>MMP-1</i>		<i>MMP-2</i>		<i>MMP-3</i>		<i>MMP-9</i>		<i>MMP-11</i>		<i>MMP-13</i>			
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p		
Amžius	-0,162	0,13	-0,127	0,23	-0,072	0,50	-0,200	0,06	-0,072	0,50	0,115	0,28	-0,006	0,95
Stadija	0,340	0,01	0,081	0,45	-0,069	0,52	0,346	0,001	0,013	0,90	0,167	0,11	0,300	0,005
Naviko histologinis tipas	0,210	0,04	0,067	0,53	0,096	0,37	0,073	0,50	-0,132	0,21	0,219	0,04	-0,065	0,55
Naviko diferenciacijos laipsnis	-0,040	0,70	0,159	0,13	0,035	0,74	0,118	0,27	0,099	0,35	0,166	0,12	0,287	0,007
Limfmazgių būklė	0,256	0,01	0,037	0,73	-0,028	0,79	0,251	0,01	0,015	0,89	0,102	0,34	0,145	0,17
ER raiška	-0,029	0,78	-0,081	0,45	-0,122	0,25	-0,073	0,50	-0,029	0,78	0,135	0,20	-0,002	0,98
PR raiška	-0,023	0,83	-0,101	0,34	-0,116	0,28	0,042	0,69	0,070	0,51	0,138	0,19	0,064	0,55

r – koreliacijos koeficientas, ER – estrogenų receptoriai; PR – progesterono receptoriai.

Tyrimė dalyvavusių pacienčių išgyvenamumo tikimybė buvo įvertinta priklausomai nuo MMP genų raiškos krūties navikuose. Kaip ir analizuojant išgyvenamumą pagal MMP genų raišką kraujyje, analizė buvo atlikta visoms 88 pacientėms; dėl nepakankamo pacienčių skaičiaus grupėje išgyvenamumo analizė pagal MMP genų raišką navike nebuvo atlikta priklausomai nuo limfmazgių būklės toms pacientėms, kurioms nustatyta pokyčių daugiau nei viename sritiniame limfmazgyje (n=7).

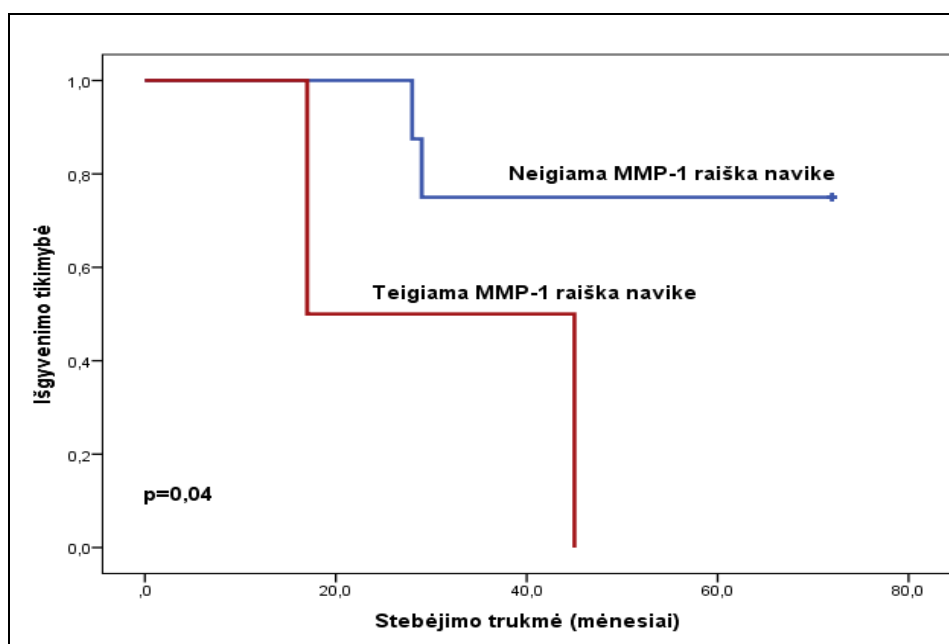
Atlikta išgyvenamumo vienaveiksni analizė Kaplano-Majerio metodu parodė, kad iš tirtų septynių MMP spektro *MMP-1*, *MMP-3* ir *MMP-13* genų raiška krūties navikuose yra susijusi su pacienčių išgyvenamumu (19 lent.).

19 lentelė. Sergančių krūties vėžiu pacientų išgyvenamumo tikimybės analizė pagal MMP genų raišką krūties navikuose

Kintamieji	<i>MT1-MMP</i>	<i>MMP-1</i>	<i>MMP-2</i>	<i>MMP-3</i>	<i>MMP-9</i>	<i>MMP-11</i>	<i>MMP-13</i>
	p (log-rank)						
Amžiaus grupė: 31–56 metai	0,66	0,61	0,53	0,07	0,53	0,66	0,07
57–83 metai	0,30	0,38	0,36	0,50	0,36	--	0,78
Stadija: I	0,57	0,07	--	0,15	0,82	0,82	0,24
II	0,65	0,89	0,25	0,26	0,30	--	0,08
III/IV	--	0,04	--	0,06	--	--	0,08
Naviko histologinis tipas: duktalinė karcinoma	0,46	0,91	0,39	0,43	0,29	--	0,32
lobulinė karcinoma	0,32	0,05	0,44	0,03	--	0,59	0,23
Naviko diferenciacijos laipsnis: G1	0,71	0,82	--	0,17	0,71	0,71	0,89
G2	0,51	0,98	0,33	0,64	0,38	--	0,49
G3	0,37	0,58	--	0,29	--	--	0,26
Limfmazgių būklė: N0	0,36	0,31	0,54	0,15	0,54	0,73	0,43
N1	--	0,73	0,43	0,13	0,33	--	0,05
ER: neigiami	0,45	0,85	0,60	0,14	0,45	0,60	0,04
teigiami	0,44	0,28	0,38	0,41	0,44	--	0,96
PR: neigiami	0,51	0,92	0,65	0,18	0,41	0,65	0,06
teigiami	0,38	0,24	0,32	0,27	0,45	--	0,70

G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas; N0 – sritiniuose limfmazgiuose metastazių nėra; N1 – yra paslankių metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose; N2 – yra metastazių tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose, suaugusių tarpusavyje ir su kitomis struktūromis; ER – estrogenų receptoriai; PR – progesterono receptoriai.

Palyginus išgyvenamumo kreives nustatyta, kad pacientės, kurioms diagnozuotas vėlyvųjų stadijų krūties vėžys ir navike nebuvo nustatyta *MMP-1* raiškos, išgyveno ilgiau nei tų pačių stadijų krūties vėžiu sergančios pacientės, kurioms navike *MMP-1* raiška buvo nustatyta ($p=0,04$) (11 pav.).



11 pav. Sergančių krūties vėžiu pacienčių, kurioms diagnozuota vėlyvųjų stadijų liga, išgyvenamumo kreivės pagal *MMP-1* geno raišką navike

Panašūs rezultatai gauti ir grupėje sergančių krūties vėžiu pacienčių, kurioms histologiškai buvo nustatyta lobulinė karcinoma. Šios grupės pacientės, kurioms navike nebuvo nustatyta *MMP-3* raiškos, išgyveno ilgiau nei pacientės, kurioms *MMP-3* raiška buvo nustatyta ($p=0,03$). Tų pacienčių, kurioms navikuose nebuvo nustatyta ER ir *MMP-13* raiškos, išgyvenamumas buvo geresnis, palyginti su išgyvenamumu pacienčių, kurioms ER raiškos nebuvo nustatyta, tačiau buvo identifikuota *MMP-13* raiška navike ($p=0,04$).

4.1.4. Sergančių krūties vėžiu pacienčių išgyvenamumui įtaką darantys veiksniai

Ankstesniuose skyriuose pateikti rezultatai rodo, kad moterų, sergančių krūties vėžiu, išgyvenamumui įtakos turi daugelis tirtų veiksnių. Todėl buvo

atlikta daugiaveiksnė tirtų veiksmų analizė, pritaikant proporcingų rizikų regresinę analizę Kokso metodu, siekiant išsiaiškinti, kurie veiksniai turi didžiausią įtaką pacienčių išgyvenamumui.

Atlikta šių veiksmų prognozė: amžiaus, ligos stadijos, naviko histologinio tipo ir diferenciacijos laipsnio, pokyčių limfmazgiuose, ER bei PR raiškos navike, MMP-3 (-1171 5A6A) bei MMP-9 (-1562 CT) polimorfizmo, MMP-9, MMP-11 raiškos kraujyje, MMP-1, MMP-3 ir MMP-13 raiškos navike (20 lent.).

20 lentelė. Sergančių krūties vėžiu pacienčių išgyvenamumui įtakos turinčių veiksmų daugiaveiksnė analizė

Kintamieji	Rizikų santykis	95% PI	p
Amžius	0,433	0,117-1,600	0,20
Ligos stadija	0,132	0,031-0,569	0,007
Naviko histologinis tipas	3,419	0,743-15,743	0,11
Naviko diferenciacijos laipsnis	0,107	0,020-0,570	0,009
Limfmazgių būklė	12,014	0,987-146,294	0,05
ER raiška	9,646	1,564-59,476	0,01
PR raiška	0,076	0,011-0,542	0,01
MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmas	0,071	0,006-0,806	0,03
MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmas	1,003	0,127-7,950	0,99
MMP-9 raiška kraujyje	0,998	0,215-4,634	0,99
MMP-11 raiška kraujyje	0,630	0,181-2,192	0,46
MMP-1 raiška navike	1,014	0,279-3,692	0,98
MMP-3 raiška navike	0,359	0,079-1,643	0,18
MMP-13 raiška navike	0,816	0,139-4,780	0,82

PI – pasikliautiniai intervalai, ER – estrogenų receptoriai; PR – progesterono receptoriai.

Atlikta daugiaveiksnė analizė parodė, kad ligos stadija, naviko diferenciacijos laipsnis, ER bei PR raiška navike ir MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmas yra nepriklausomi sergančiųjų krūties vėžiu pacienčių išgyvenamumo prognozėms veiksniai. Pacienčių išgyvenamumui įtakos neturėjo

amžius, naviko histologinis tipas, pokyčiai sritiniuose limfmazgiuose, MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmas, *MMP-9*, *MMP-11* raiška kraujyje, *MMP-1*, *MMP-3* ir *MMP-13* raiška navike.

Daugiau nei pusei šiame tyrime dalyvavusių moterų buvo diagnozuota antros stadijos liga (n=57). Todėl buvo atlikta sergančių antros stadijos krūties vėžiu pacienčių išgyvenamumui darančių įtaką veiksnių analizė. Daugiaveiksni prognozinė veiksnių analizė parodė, kad naviko diferenciacijos laipsnis ir MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmas yra nepriklausomi pacienčių išgyvenamumo prognoziniai veiksniai (21 lent.). Pacientės, kurioms identifikuotas vidutiniškai ar gerai diferencijuotas navikas, išgyveno ilgiau nei tos pacientės, kurioms identifikuotas blogos diferenciacijos krūties navikas (*log-rank* p=0,006). Taip pat tos pacientės, kurioms kraujyje buvo nustatyti MMP-3 -1171 5A/6A ar 6A/6A variantai, išgyveno ilgiau, palyginti su tomis pacientėmis, kurioms nustatytas MMP-3 -1171 5A/5A variantas (*log-rank* p=0,04).

21 lentelė. Sergančių antros stadijos krūties vėžiu pacienčių išgyvenamumui įtakos turinčių veiksnių daugiaveiksni analizė

Kintamieji	Rizikų santykis	95% PI	p
Naviko histologinis tipas	0,005	0,001-4,335	0,12
Naviko diferenciacijos laipsnis	0,002	0,000-0,072	0,01
Limfmazgių būklė	0,001	0,000-4,921	0,97
Estrogenų receptorių raiška	0,334	0,008-14,347	0,56
MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmas	1,813	0,331-9,914	0,02
MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmas	0,052	0,000-7,714	0,24
<i>MMP-9</i> raiška kraujyje	3,329	0,170-65,047	0,42
<i>MMP-11</i> raiška kraujyje	0,101	0,003-3,568	0,20
<i>MMP-1</i> raiška navike	10,559	0,798-139,778	0,07
<i>MMP-13</i> raiška navike	0,001	0,000-1,366	0,83

PI – pasikliautinieji intervalai, ER – estrogenų receptoriai; PR – progesterono receptoriai.

Iš pateiktų duomenų matyti, kad tirtų MMP genų raiška yra susijusi su klinikinėmis-patologinėmis ligos charakteristikomis, o MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmas yra nepriklausomas veiksnys prognozuojant ligos eigą.

4.2. Priešinės liaukos vėžys

Kaip jau minėta, gana dažnai pacientus, sergančius priešinės liaukos vėžiu, tam tikrą laikotarpį, įvertinus ligos progresavimo galimybes, pakanka tik stebėti, todėl MMP, dalyvaujančių naviko progresavimo procese, raiška ir polimorfizmas jų genuose gali padėti prognozuoti sergančių priešinės liaukos vėžiu ligos eigą.

4.2.1. Matrikso metaloproteinazių genų raiška sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje

Sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje buvo tirta *MMP-9* ir *MMP-11* genų raiška.

Sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu grupę sudarė 82 pacientai. Pagal amžiaus medianą pacientai buvo suskirstyti į dvi grupes; pagal ligos stadiją – į tris grupes; pagal Glisono laipsnį – į tris grupes; pagal PSA koncentraciją serume – į tris grupes; pagal prognozinę grupę – į tris grupes; pagal lydintį ligą uždegimą bei GPH – į dvi grupes.

MMP-9 geno raiška kraujyje nustatyta 63 pacientams (76,8 %, 95% PI 72,17-81,49), o *MMP-11* geno raiška – 26 pacientams (31,7 %, 95% PI 26,57-36,85).

Sugrupavus pacientus pagal amžių ir įvertinus, ar tirtųjų MMP genų raišką galima sieti su pacientų amžiumi, konstatuota, kad *MMP-9* raiška ($p=0,001$) ir *MMP-11* raiška ($p=0,02$) kraujyje statistiškai reikšmingai dažniau nustatyta vyresniems pacientams (64-85 metai) (22 lent.).

Įvertinus *MMP-9* ir *MMP-11* genų raišką kraujyje priklausomai nuo klinikinių-patologinių charakteristikų, statistiškai reikšmingi skirtumai nustatyti tarp ligos stadijos ir *MMP-9* raiškos ($p=0,02$) bei *MMP-11* raiškos ($p<0,001$);

tarp prognozinės grupės ir *MMP-9* ($p=0,005$) raiškos bei *MMP-11* raiškos ($p<0,001$) kraujyje. Nustatyti taip pat statistiškai reikšmingi skirtumai tarp *MMP-11* raiškos ir PSA koncentracijos serume ($p=0,001$). Kitų statistiškai reikšmingų skirtumų tarp MMP genų raiškos kraujyje ir klinikinių-patologinių parametrų nenustatyta (22 lent.).

22 lentelė. MMP raiškos kraujyje analizė priklausomai nuo sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų amžiaus ir klinikinių-patologinių charakteristikų

Kintamieji	<i>MMP-9</i> raiška		P	<i>MMP-11</i> raiška		P
	teigiama, n (%)	neigiama, n (%)		teigiama, n (%)	neigiama, n (%)	
Amžiaus grupė: 50-63 metai 64-85 metai	27 (42,9) 36 (57,1)	16 (84,2) 3 (15,8)	0,001	9 (34,6) 17 (65,4)	34 (60,7) 22 (39,3)	0,02
Ligos stadija: I II III	4 (6,3) 29 (46,1) 30 (47,6)	4 (21,1) 14 (73,7) 1 (5,2)	0,02	0 5 (19,2) 21 (80,8)	8 (14,2) 38 (67,9) 10 (17,9)	<0,001
Glisono laipsnis: 6 7 8-10	40 (63,5) 16 (25,4) 7 (11,1)	15 (78,9) 4 (21,1) 0	0,25	16 (61,5) 6 (23,1) 4 (15,4)	39 (69,6) 14 (25,0) 3 (5,4)	0,31
PSA koncentracija serume (ng/ml): 10 ir mažiau 10–20 daugiau kaip 20	49 (77,8) 8 (12,7) 6 (9,5)	16 (84,2) 3 (15,8) 0	0,37	15 (57,7) 6 (23,1) 5 (19,2)	50 (89,3) 5 (8,9) 1 (1,8)	0,002
Prognozinė grupė: I II III	5 (8,0) 29 (46,0) 29 (46,0)	3 (15,8) 15 (78,9) 1 (5,3)	0,005	0 6 (23,1) 20 (76,9)	8 (14,2) 38 (67,9) 10 (17,9)	<0,001
Uždegimas: nustatytas nenustatytas	15 (23,8) 48 (76,2)	2 (10,5) 17 (89,5)	0,17	19 (73,1) 7 (26,9)	46 (82,1) 10 (17,9)	0,25
GPH: nustatyta nenustatyta	48 (76,2) 15 (23,8)	14 (73,7) 5 (26,3)	0,52	12 (21,4) 44 (78,6)	8 (30,8) 18 (69,2)	0,25

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija

Papildomai įvertintas tiriamų parametrų ryšių stiprumas koreliacinės analizės metodu. 23 lentelėje pateikti koreliacinės analizės rezultatai tarp tirtų MMP genų raiškos kraujyje, pacientų amžiaus ir klinikinių-patologinių charakteristikų.

23 lentelė. MMP genų raiškos kraujyje ir sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų amžiaus bei klinikinių-patologinių charakteristikų koreliacinė analizė

Kintamieji	MMP-9 raiška		MMP-11 raiška	
	r	p	r	p
Amžius	0,349	0,001	0,243	0,02
Stadija	0,387	<0,001	0,591	<0,001
Glisono laipsnis	0,157	0,15	0,104	0,35
PSA koncentracija serume	0,082	0,46	0,375	0,001
Prognozinė grupė	0,342	0,002	0,564	<0,001
Uždegimas	0,138	0,21	0,104	0,35
GPH	0,025	0,82	-0,101	0,36

r – koreliacijos koeficientas, PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija.

Iš 23 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad nustatytas silpnas, tačiau statistiškai reikšmingas ryšys tarp *MMP-9* raiškos kraujyje ir pacientų amžiaus, stadijos bei prognozinės grupės, taip pat tarp *MMP-11* raiškos kraujyje ir pacientų amžiaus bei PSA koncentracijos serume nustatytas statistiškai reikšmingas silpnas ryšys, o tarp *MMP-11* raiškos kraujyje ir ligos stadijos ($r=0,591$) bei prognozinės grupės ($r=0,564$) nustatytas statistiškai reikšmingas vidutinio stiprumo ryšys.

Tikimybė nustatyti *MMP-9* ir *MMP-11* raišką kraujyje didesnė, jei pacientai yra vyresnio amžiaus (64-85 metai), jiems patvirtinta trečioji ligos stadija bei pacientai priskirti trečiajai prognozei grupei. Esant didesnei PSA koncentracijai kraujyje, tikimybė nustatyti *MMP-11* raišką kraujyje didesnė.

Tyrime dalyvavusių pacientų, sergančių priešinės liaukos vėžiu, išgyvenamumo tikimybė buvo įvertinta priklausomai nuo MMP raiškos kraujyje. Analizė buvo atlikta visiems 82 pacientams, tačiau dėl nepakankamo skaičiaus pacientų tiriamosiose grupėse išgyvenamumo analizė nebuvo atlikta tų grupių pacientams, kuriems Glisono laipsnis biopsinėje medžiagoje buvo tarp 8 ir 10 ($n=7$) ar PSA koncentracija serume buvo daugiau kaip 20 ng/ml ($n=6$). Atlikta išgyvenamumo vienaveiksnė analizė Kaplano-Majerio metodu parodė, kad *MMP-9* ir *MMP-11* raiška kraujyje susijusi su pacientų, sergančių priešinės liaukos vėžiu, išgyvenamumu (24 lent.).

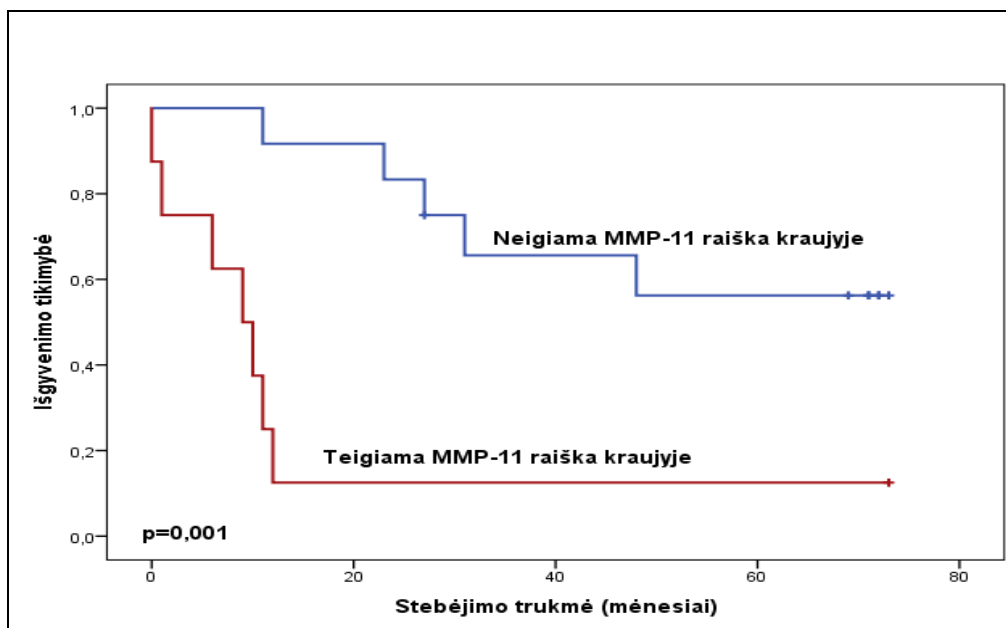
24 lentelė. Sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų išgyvenamumo tikimybės analizė pagal MMP genų raišką kraujyje

Kintamieji	MMP-9	MMP-11
	p (log-rank)	
Amžiaus grupė:		
50-63 metai	0,90	0,55
64-85 metai	0,65	0,15
Stadija:		
I	0,38	--
II	0,17	0,51
III	0,04	0,49
Glisono laipsnis:		
6	0,24	0,43
7	0,80	0,06
PSA koncentracija serume (ng/ml):		
10 ir mažiau	0,21	0,24
10–20	0,36	0,20
Prognozinė grupė:		
I	0,24	--
II	0,03	0,65
III	0,04	0,56
Uždegimas:		
nustatytas	0,27	0,15
nenustatytas	0,18	0,05
GPH:		
nustatyta	0,08	0,43
nenustatyta	0,27	0,001

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija.

Iš 24 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad pacientų, sergančių priešinės liaukos vėžiu, išgyvenamumo negalima sieti su nustatyta *MMP-9* bei *MMP-11* genų raiška kraujyje priklausomai nuo amžiaus, Glisono laipsnio ir PSA koncentracijos serume.

Įvertinus patologines būkles, lydinčias priešinės liaukos naviką, reikia pažymėti, kad tie pacientai, kuriems kartu su naviku priešinėje liaukoje nebuvo nustatyta GPH ir kraujyje nenustatyta *MMP-11* geno raiškos, išgyveno ilgiau, palyginti su tos pačios grupės pacientais, kuriems *MMP-11* raiška kraujyje buvo nustatyta (log-rank p=0,001) (12 pav.).



12 pav. Sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų, kuriems nenustatyta gerybinės priešinės liaukos hiperplazijos (GPH), išgyvenamumo kreivės pagal *MMP-11* raišką kraujyje

4.2.2. Matrikso metaloproteinazės 9 geno polimorfizmas sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje

Visiems tyrime dalyvavusiems pacientams buvo nustatytas MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmas. MMP-9 geno polimorfizmo C/C, C/T ir T/T variantai nustatyti atitinkamai 53 (64,6 %, 95% PI 59,35-69,91), 15 (18,3 %, 95% PI 14,02-22,56) ir 14 (17,1%, 95% PI 12,92-21,23) atvejų. Išanalizavus polimorfizmo variantų pasiskirstymą priklausomai nuo amžiaus ir klinikinių-patologinių charakteristikų, statistiškai reikšmingos sąsajos nustatytos tarp MMP-9 (-1562 C/T) geno polimorfizmo variantų ir ligos stadijos ($p < 0,0001$), prognozinės grupės ($p < 0,0001$) bei GPH buvimo kartu su naviku ($p = 0,03$) (25 lent.).

25 lentelė. MMP-9 (-1562 C/T) geno polimorfizmo analizė sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu kraujyje priklausomai nuo amžiaus ir klinikinių-patologinių charakteristikų

Kintamieji	MMP-9 -1562 polimorfizmas			p
	C/C, n (%)	C/T, n (%)	T/T, n (%)	
Amžiaus grupė: 50-63 metai 64-85 metai	31 (58,5) 22 (41,5)	8 (53,3) 7 (46,7)	4 (28,6) 10 (71,4)	0,13
Ligos stadija: I II III	5 (9,4) 32 (60,4) 16 (30,2)	3 (20,0) 11 (73,3) 1 (6,7)	0 0 14 (100,0)	<0,0001
Glisono laipsnis: 6 7 8-10	36 (72,0) 11 (22,0) 3 (6,0)	11 (78,6) 3 (21,4) 0	5 (45,5) 3 (27,3) 3 (27,3)	0,10
PSA koncentracija serume (ng/ml): 10 ir mažiau 10–20 daugiau kaip 20	41 (83,7) 5 (10,2) 3 (6,1)	10 (83,3) 2 (16,7) 0	7 (58,3) 2 (16,7) 3 (25,0)	0,15
Prognozinė grupė: I II III	6 (11,3) 31 (58,5) 16 (30,2)	2 (13,3) 13 (86,7) 0	0 0 14 (100,0)	<0,0001
Uždegimas: nustatytas nenustatytas	9 (17,0) 44 (83,0)	4 (26,7) 11 (73,3)	4 (28,6) 10 (71,4)	0,52
GPH: nustatytas nenustatytas	44 (83,0) 9 (17,0)	11 (73,3) 4 (26,7)	7 (50,0) 7 (50,0)	0,03

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija.

Panaudojus koreliacinės analizės metodą, įvertintas ir tirtųjų parametru ryšių stiprumas. 26 lentelėje pateikti tik statistiškai reikšmingi koreliacinės analizės rezultatai tarp tirto MMP-9 (-1562 C/T) geno polimorfizmo ir pacientų klinikinių-patologinių charakteristikų.

26 lentelė. MMP-9 (-1562 C/T) geno polimorfizmo kraujyje ir sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų klinikinių-patologinių charakteristikų koreliacinė analizė

Kintamieji	MMP-9 (-1562 C/T)	
	r	p
Amžius	0,164	0,14
Stadija	0,300	0,006
Glisono laipsnis	0,098	0,38
PSA koncentracija serume	0,127	0,25
Prognozinė grupė	0,343	0,002
Uždegimas	0,125	0,26
GPH	0,80	0,47

r – koreliacijos koeficientas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija.

Iš 26 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad tarp MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo variantų pasiskirstymo ir pacientų ligos stadijos bei prognozinės grupės yra silpnas, tačiau statistiškai reikšmingas ryšys. Sergant vėlyvų stadijų liga ar priskiriant pacientą prie trečios prognozinės grupės, didesnė tikimybė nustatyti MMP-9 -1562 T/T variantą, kuris yra siejamas su blogesne ligos eiga.

Tyrimė dalyvavusių pacientų išgyvenamumo tikimybė buvo įvertinta priklausomai nuo nustatyto MMP-9 (-1562 C/T) geno polimorfizmo varianto kraujyje. Analizė buvo atlikta visiems 82 pacientams, tačiau dėl nepakankamo skaičiaus tiriamosiose grupėse išgyvenamumo analizė nebuvo atlikta tose grupėse, kuriose pacientams Glisono laipsnis biopsinėje medžiagoje buvo tarp 8 ir 10 (n=6) ar PSA koncentracija serume buvo daugiau kaip 20 ng/ml (n=6).

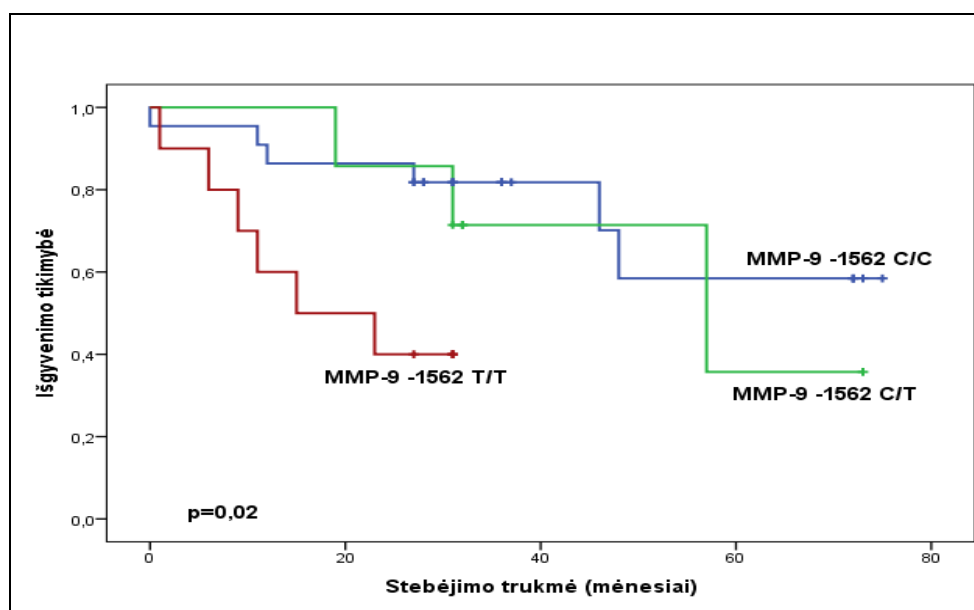
Atlikta išgyvenamumo vienaveiksnė analizė Kaplano-Majerio metodu parodė, kad MMP-9 geno (-1562 C/T) polimorfizmas susijęs su pacientų išgyvenamumu priklausomai nuo amžiaus, PSA koncentracijos serume bei su pataloginėmis būklėmis – uždegimu ar GPH – diagnozuojamomis kartu su priešinės liaukos naviku (27 lent.).

27 lentelė. Sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų išgyvenamumo tikimybės analizė pagal MMP-9 geno (-1562 C/T) polimorfizmą kraujyje

Kintamieji	MMP-9 -1562 C/T polimorfizmas
	p (log-rank)
Amžiaus grupė: 50-63 metai 64-85 metai	0,21 0,02
Stadija: I II III	0,24 0,84 0,20
Glisono laipsnis: 6 7	0,04 0,37
PSA koncentracija serume (ng/ml): 10 ir mažiau 10-20	0,23 0,001
Prognozinė grupė: I II III	0,11 0,70 0,09
Uždegimas: nustatytas nenustatytas	0,02 0,30
GPH: nustatyta nenustatyta	0,04 0,31

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija

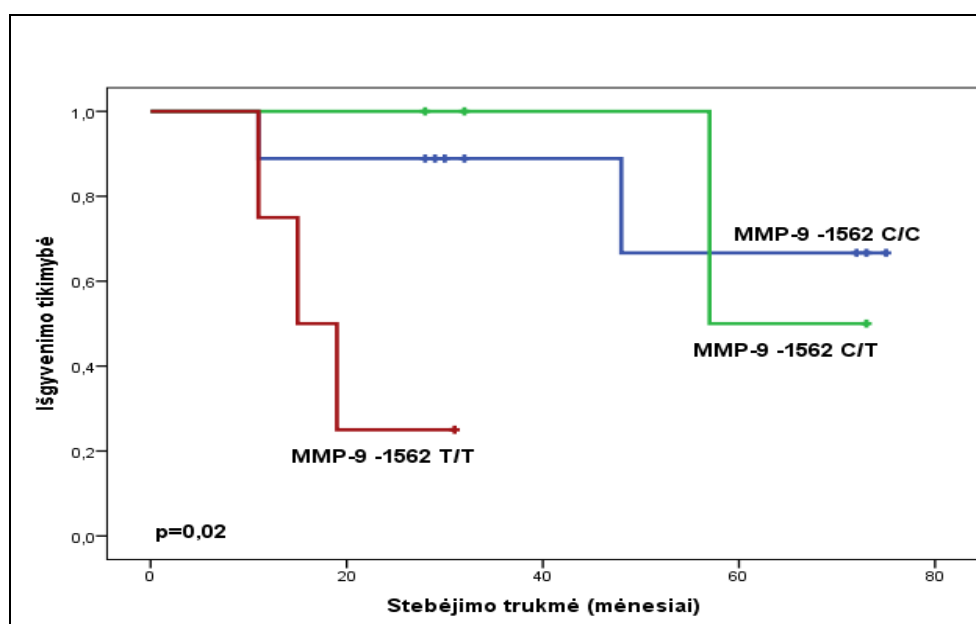
Vyresni pacientai (64-85 metai), sergantys priešinės liaukos vėžiu, kuriems buvo nustatytas MMP-9 -1562 C/C variantas, išgyveno ilgiau, palyginti su to paties amžiaus pacientais, kuriems nustatytas T/T variantas (*log-rank* $p=0,02$) (13 pav.).



13 pav. Sergančių priešinės liaukos vėžiu vyresnių pacientų (64-85 metai) išgyvenamumo kreivės pagal MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmą kraujyje

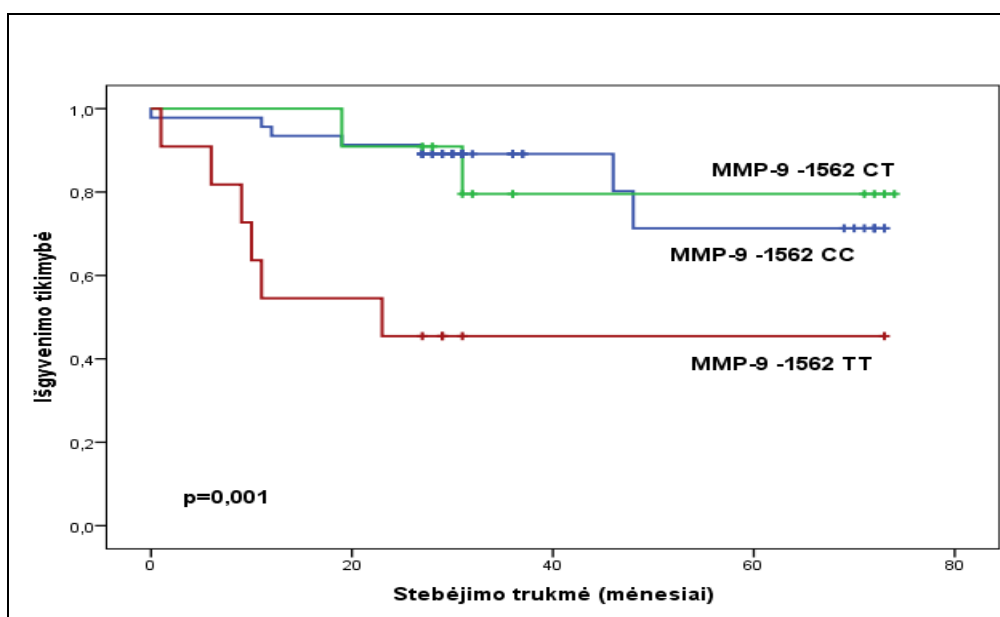
Vertinant pacientų išgyvenamumą pagal nustatytą PSA koncentraciją serume ir MMP-9 polimorfizmą, nustatyta, kad tie pacientai, kurių PSA koncentracija buvo nuo 10 iki 20 ng/ml ir kraujyje buvo nustatytas MMP-9 -1562 C/C ar C/T variantas, išgyveno ilgiau, palyginti su tos pačios grupės pacientais, kuriems buvo nustatytas T/T variantas (*log-rank* $p=0,001$) (27 lent.).

Kaip jau minėta anksčiau, kartu su priešinės liaukos naviko charakteristikomis buvo vertinamos ir kitos patologinės būklės – uždegimas ir GPH. 65 pacientams priešinėje liaukoje nebuvo nustatyta uždegimo, o 17 pacientų kartu su naviku priešinėje liaukoje nustatytas uždegimas. Tie pacientai, kuriems kraujyje buvo nustatytas MMP-9 -1562 C/C ar C/T variantas ir priešinėje liaukoje kartu su naviku uždegimas, išgyveno ilgiau, palyginti su tais pacientais, kuriems buvo nustatytas T/T variantas. 14 paveiksle pateiktos išgyvenamumo kreivės pagal MMP-9 polimorfizmą tų pacientų, kuriems buvo nustatytas uždegimas priešinėje liaukoje (*log-rank* $p=0,02$).



14 pav. Sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų, kuriems liaukoje nustatytas uždegimas, išgyvenamumo kreivės pagal MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmą kraujyje

Kartu su naviku priešinėje liaukoje 62 pacientams buvo nustatyta GPH. Atsižvelgiant šią patologiją tie pacientai, kurių kraujyje buvo nustatytas MMP-9 -1562 C/C ar C/T variantas ir GPH liaukoje, išgyveno ilgiau nei tie pacientai, kuriems buvo nustatytas T/T variantas (*log-rank* $p=0,04$) (15 pav.).



15 pav. Sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų, kuriems liaukoje nustatyta gerybine hiperplazija (GPH), išgyvenamumo kreivės pagal MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmą kraujyje

4.2.3. Sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų išgyvenamumui įtaką darantys veiksniai

Ankstesniuose skyriuose pateikti rezultatai rodo, kad vyrų, sergančių priešinės liaukos vėžiu, išgyvenamumui įtakos turi daugelis tirtų veiksnių. Todėl buvo atlikta daugiaveiksni tirtų veiksnių analizė, pritaikant proporcingų rizikų regresinę analizę Kokso metodu, siekiant išsiaiškinti, kurie veiksniai turi didžiausią įtaką pacientų išgyvenamumui.

Atlikta šių veiksnių prognozė: amžiaus, ligos stadijos, naviko diferenciacijos laipsnio pagal Glisoną, PSA koncentracijos serume, patologiinių būklių priešinėje liaukoje (uždegimas, GPH), MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo, MMP-9, MMP-11 raiškos kraujyje (28 lent.).

28 lentelė. Sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų išgyvenamumui įtakos turinčių veiksnių daugiaveiksni analizė

Kintamieji	Rizikų santykis	95% PI	p
Amžius	0,270	0,071-1,028	0,05
Ligos stadija	0,321	0,019-5,468	0,43
Glisono laipsnis	0,134	0,035-0,515	0,003
PSA koncentracija serume (ng/ml)	1,428	0,325-6,279	0,63
Uždegimas	1,027	0,297-3,550	0,96
GPH	5,177	1,916-13,989	0,001
MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmas	0,855	0,142-5,149	0,86
<i>MMP-9</i> raiška kraujyje	0,816	0,096-6,906	0,85
<i>MMP-11</i> raiška kraujyje	0,340	0,119-0,975	0,04

PI – pasikliautiniai intervalai, PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija.

Gauti rezultatai rodo, kad naviko diferenciacijos laipsnis pagal Glisoną, GPH ir *MMP-11* raiška yra nepriklausomi sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų išgyvenamumo prognoziniai veiksniai, o amžius, ligos stadija, PSA koncentracija serume, uždegimas priešinėje liaukoje, MMP-9 (-1562 CT) polimorfizmas ir *MMP-9* raiška kraujyje pacientų išgyvenamumui įtakos neturėjo.

Iš pateiktų duomenų matyti, kad tirtų MMP raiška, sergant priešinės liaukos vėžiu yra susijusi su klinikinėmis-patologinėmis ligos charakteristikomis ir gali būti nepriklausomu veiksniumi prognozuojant ligos eigą.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

Jau kelis dešimtmečius trunkantys molekuliniai tyrimai onkologijoje leido sukaupti duomenų, pagrindžiančių mintį, kad kiekviena onkologinė liga, nulemta dinaminių genomo pokyčių, pasireiškia individualiai. Šios ligos kontrolei tampa prieinami ne tik instrumentiniai ir histologiniai metodai, bet ir didelė potencialių molekulinų žymenų įvairovė. Tarp tokių žymenų yra MMP. MMP raiška nustatoma augant daugeliui piktybinių navikų, tarp jų ir nuo hormonų raiškos priklausomiems vėžio tipams – krūties ir priešinės liaukos vėžiui. Šio darbo tikslas buvo nustatyti *MMP-9* ir *MMP-11* genų raišką sergančiųjų krūties ar priešinės liaukos vėžiu kraujyje ir *MT1-MMP*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-11*, *MMP-13* genų raišką krūties navikuose, bei *MMP-3* (-1171 5A/6A) ir *MMP-9* (-1562 C/T) polimorfizmą sergančiųjų krūties vėžiu kraujyje ir *MMP-9* (-1562 C/T) polimorfizmą sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu kraujyje.

5.1. Krūties vėžys

MT1-MMP. Membraninio tipo MT1-MMP yra ląstelės membranos receptorių. MT1-MMP prisideda netiesiogiai prie ULU skaidymo ląstelės paviršiuje aktyvindama MMP-2 (5, 126), todėl MT1-MMP siejama su navikinių ląstelių migracija ir naviko progresavimo procesu (53).

Šiame tyrime nustatėme reikšmingą *MT1-MMP* geno raiškos navike sąsają tarp sergančiųjų krūties vėžiu ligos stadijos ir pokyčių sritiniuose limfmazgiuose. Koreliacinės analizės rezultatai parodė, kad tikimybė nustatyti *MT1-MMP* raišką navike didesnė esant vėlyvosioms ligos stadijoms ($r=0,340$, $p=0,001$), daugėjant pokyčių sritiniuose limfmazgiuose ($r=0,256$, $p=0,01$) ir krūties naviką identifikavus kaip duktalinę karcinomą ($r=0,210$, $p=0,04$).

Mūsų tyrimo duomenys atitinka literatūroje pateiktus duomenis. Pavyzdžiui, B. Tetu ir bendraautorių (129) tyrime MT1-MMP raiška reikšmingai dažniau nustatyta jaunesnėms pacientėms, taip pat pacientėms, kurioms histologiškai patvirtinta krūties duktalinė karcinoma ar identifikuoti pokyčiai

limfmazgiuose. Tačiau *G. Yao* ir bendraautorių tyrime (53) MT1-MMP raiška dažniau buvo nustatyta nesant pokyčių limfmazgiuose. Reikia pažymėti, kad abiejų tyrimų rezultatai rodo, kad pacientės, kurioms nebuvo nustatyta MT1-MMP raiškos, gyveno ilgiau nei tos pacientės, kurioms MT1-MMP raiška buvo nustatyta. Šiame tyrime nenustatėme, kad *MT1-MMP* raiška yra susijusi su pacienčių, sergančių krūties vėžiu, išgyvenamumu. Minėti tyrėjai MT1-MMP raišką dažniau sieja su agresyvesniu krūties naviku, metastazėmis limfmazgiuose, o šiame tyrime dauguma pacienčių sirgo ankstyvųjų stadijų liga.

MMP-1. Ši MMP yra vienintelė tarp MMP, galinti krūties liaukos audinyje skaidyti visų tipų kolageną, todėl šio fermento raiška yra siejama su krūties vėžiu (2, 3, 134). *P. Boström* ir bendraautoriai (6) teigia, kad MMP-1 raiška krūties piktybinio naviko ląstelėse susijusi su naviko diferenciacijos laipsniu, t.y. blogesnės diferenciacijos navikuose dažniau nustatoma MMP-1 raiška.

Mūsų tyrime identifikuota reikšminga *MMP-1* geno raiškos navike sąsaja su sergančiųjų krūties vėžiu ligos stadija ($p=0,02$). Pacientės, sergančios vėlyvųjų stadijų krūties vėžiu, kurių navikuose nebuvo nustatyta *MMP-1* geno raiškos, išgyveno ilgiau nei tos pacientės, kurioms *MMP-1* raiška buvo nustatyta (*log-rank* $p=0,04$).

MMP-2. Padidėjusi MMP-2 raiška siejama su greitesniu įvairių lokalizacijų navikų augimu bei metastazavimu (2, 4, 134). Padidėjusi MMP-2 raiška krūties piktybinių navikų ląstelėse siejama su ligos stadija (93) bei trumpesniu pacienčių išgyvenamumu (129). Pažymėtina, kad pacientės, kurioms nenustatyta MMP-2 ir hormonų receptorių raiškos navike išgyvena ilgiau, nei tos pacientės, kurioms MMP-2 raiška nustatyta (56).

Mūsų tyrime buvo vertinta sąsaja tarp pacienčių amžiaus bei klinikinių-patologinių charakteristikų ir *MMP-2* geno raiškos navike. Tačiau statistiškai reikšmingos sąsajos nebuvo gauta. Išgyvenamumo analizės rezultatai parodė, kad *MMP-2* raiška navike neturėjo įtakos sergančių krūties vėžiu pacienčių

išgyvenamumui. Tai, matyt, galima paaiškinti šio tyrimo metodika, nes genų raiškos nustatymas, kas buvo atliekama šiame tyrime, neparodo, kiek navikas išties produkuoja aktyvios formos MMP-2. Tad atlikus kito tipo tyrimus sąsaja tarp MMP-2 raiškos navike ir pacienčių išgyvenamumo gali išryškėti.

MMP-3. Literatūroje trūksta duomenų, patvirtinančių MMP-3 raiškos sąsają su krūties vėžiu. Negausiose publikacijose teigiama, kad MMP-3 raiška dažniau nustatoma strominiuose komponentuose, supančiuose krūties navikus. Todėl manoma, kad MMP-3 raišką navike galima susieti su navikinių ląstelių pasiruošimu intravazacijos procesui, t.y. navikinėse ląstelėse padidėja BM ir ULU komponentus ardančių MMP raiška tam, kad navikinės ląstelės galėtų greičiau patekti į cirkuliacinę sistemą (40). MMP-3 raiška taip pat siejama su navikinių ląstelių invazija ir metastazavimu (2, 84, 101).

Mums prieinamoje literatūroje nerasta publikuotų tyrimų, kuriuose būtų vertinama *MMP-3* geno raiška navike priklausomai nuo sergančiųjų krūties vėžiu klinikinių-patologinių charakteristikų, todėl mūsų gautųjų rezultatų palyginimas su kitų tyrėjų gautais tyrimais šiuo atžvilgiu nėra galimas. Reikia pažymėti, kad mūsų tyrime nustatyta reikšminga *MMP-3* raiškos navike sąsaja su pacienčių amžiumi, ligos stadija ir pokyčiais sritiniuose limfmazgiuose. *MMP-3* geno raiška navike dažniau nustatyta jaunesnėms pacientėms ir esant vėlyvosioms ligos stadijoms. Koreliacinė analizė rodo, kad tikimybė nustatyti *MMP-3* raišką navike didesnė, jei pacientei diagnozuota vėlyvoji ligos stadija ($r=0,346$, $p=0,001$) ar nustatyta pokyčių sritiniuose limfmazgiuose ($r=0,251$, $p=0,01$). Vertinant išgyvenamumą, tos pacientės, kurioms buvo histologiškai patvirtinta lobulinė karcinoma ir nenustatyta *MMP-3* raiškos navike, išgyveno ilgiau nei tos pacientės, kurioms *MMP-3* raiška navike buvo identifikuota (*log-rank* $p=0,03$).

Plačiau ištirtas MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmas, tačiau įvairių autorių duomenimis, tyrimų rezultatai kontroversiški. Vieni tyrėjai teigia, kad yra sąsaja tarp šio polimorfizmo ir krūties vėžio (22, 66), kiti tyrėjai šios sąsajos nenustatė (83, 139). Literatūros duomenimis, MMP-3 -1171 5A/5A variantas,

lemiantis didesnę MMP-3 raišką, dažniau nustatomas krūties piktybinio naviko ląstelėse, palyginti su sveiko krūties audinio ląstelėmis (45).

Vertinome sąsają tarp pacienčių amžiaus bei klinikinių-patologinių charakteristikų ir MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo variantų. Esant vėlyvosios ligos stadijoms dažniau nustatytas MMP-3 -1171 5A/5A variantas, t.y. tas variantas, kuris siejamas su blogesne ligos prognoze ($r=0,227$, $p=0,03$). *G. Ghilardi* ir bendraautoriai (33) savo tyrime MMP-3 -1171 5A/5A variantą dažniau nustatė sergančioms krūties vėžiu pacientėms negu sveikoms kontrolinės grupės moterims. Autorių duomenimis, pacientėms, kurioms nustatomas MMP-3 -1171 5A/5A variantas, rizika, kad navikas vystysis agresyviau ar metastazuos, yra didesnė 2,4 karto palyginti su rizika tų pacienčių, kurioms nustatyta MMP-3 -1171 5A/6A ar 6A/6A variantas.

P. Krippel ir bendraautoriai (66) nenustatė reikšmingos sąsajos tarp MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo variantų ir sergančių krūties vėžiu pacienčių amžiaus, naviko dydžio, diferenciacijos laipsnio ir ER bei PR raiškos, tačiau konstatavo statistiškai reikšmingą sąsają tarp MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo ir pokyčių sritiniuose limfmazgiuose. Esant pokyčių sritiniuose limfmazgiuose dažniau buvo nustatytas MMP-3 -1171 5A/5A variantas ($p=0,018$). Mūsų atliktame tyrime, vertinant pacienčių išgyvenamumą, buvo nustatyta, kad pacientės, kurioms pokyčių limfmazgiuose nebuvo rasta, o kraujyje nustatytas MMP-3 -1171 5A/6A ar 6A/6A variantas, išgyveno ilgiau, palyginti su tomis pacientėmis, kurioms buvo nustatytas 5A/5A variantas (*log-rank* $p<0,001$). Reikia pažymėti, kad MMP-3 -1171 5A/5A variantas taip pat buvo susijęs su trumpesniu išgyvenamumu, jei pacientėms buvo diagnozuota krūties duktalinė karcinoma (*log-rank* $p=0,01$), gerai diferencijuotas navikas (*log-rank* $p=0,003$) ar navike buvo nustatyta teigiama PR raiška (*log-rank* $p=0,02$). Pritaikius daugiaveiksę pacienčių išgyvenamumui įtaką darančių veiksnių analizę, tarp visų tiriamųjų MMP genų ir polimorfizmo variantų tik MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmas buvo nepriklausomas veiksnys, kuris gali būti reikšmingas numatant sergančiųjų krūties vėžiu ligos prognozę.

MMP-9. Ši MMP yra viena plačiausiai tiriamų MMP. MMP-9 raiška yra siejama su greitesniu įvairių lokalizacijų navikų augimu bei metastazavimu dėl savo sugebėjimo skaidyti kolageną (2, 4, 134). Į MMP-9 raišką atkreipia dėmesį daugelis tyrėjų dar ir dėl to, kad šis fermentas skaido IV tipo kolageną, kuris yra pagrindinis BM, atskiriančios epitelines ląsteles nuo stromos, komponentas. Kai kurie ULU komponentai, ypač intersticinis kolagenas, yra atsparūs proteolizei, ir šį kolageną skaido tik MMP. Literatūroje MMP-9 raiška krūties navikuose siejama su ligos stadija ir pokyčiais sritiniuose limfmazgiuose (119).

Savo tyrimu taip pat siekėme įvertinti sąsają tarp *MMP-9* geno raiškos kraujyje ir sergančiųjų krūties vėžiu amžiaus bei klinikinių-patologinių charakteristikų. Dėl MMP-9 raiškos sąsajos su amžiumi literatūroje pateikiami kontroversiški duomenys. Vieni autoriai tokią sąsają nustatė (108), kiti autoriai šios sąsajos nerado (19). Mūsų gauti duomenys rodo, kad vyresnio amžiaus pacientės (57–83 metai), kurioms nebuvo nustatyta *MMP-9* geno raiškos kraujyje, išgyveno ilgiau, palyginti su to paties amžiaus pacientėmis, kurioms *MMP-9* raiška kraujyje buvo nustatyta (*log-rank* $p=0,01$).

Konstatavome statistiškai reikšmingą sąsają tarp *MMP-9* raiškos kraujyje ir naviko diferenciacijos laipsnio. Tikimybė nustatyti *MMP-9* raišką kraujyje didėja esant blogos diferenciacijos navikui ($r=0,279$, $p=0,009$). Tai atitinka kitų tyrėjų publikuojamus rezultatus, kuriuose aprašoma *MMP-9* raiškos sąsaja su blogos diferenciacijos naviku (19).

Yra žinoma, kad ER raiška gali būti susijusi su signaliniais keliais, kurie stimuliuoja ląstelių proliferaciją ir veikia ULU skaidančių fermentų, tokius kaip MMP, raišką, o MMP raiškos pokyčiai savo ruožtu turi įtakos krūties vėžiui progresuoti. Panaudojus ER ir PR teigiamą krūties vėžio ląstelių liniją MCF-7 nustatyta, kad padidėjęs estradiolio (E2) aktyvumas mažina MMP-9 aktyvumą (86). Mūsų tyrimo duomenimis, nustatytas silpnas, tačiau statistiškai reikšmingas ryšys tarp *MMP-9* geno raiškos kraujyje ir ER būklės ($r=-0,260$, $p=0,01$). Tikimybė nustatyti *MMP-9* raišką kraujyje yra didesnė nesant ER raiškos navike. Literatūroje taip pat pateikiami duomenys, įrodantys sąsają tarp *MMP-9* raiškos ir neigiamos ER raiškos krūties navikuose (123). Be to, mūsų tyrime

išgyvenamumo analizė parodė, kad pacientės, kurioms nebuvo nustatyta *MMP-9* raiškos kraujyje ir PR raiška navikuose buvo neigiama, išgyveno ilgiau, palyginti su tos pačios grupės pacientėmis, kurioms *MMP-9* raiška kraujyje buvo nustatyta (*log-rank* $p=0,02$). Kai kurie autoriai pateikia statistiškai reikšmingą sąsają tarp *MMP-9* ir PR raiškos navike, tačiau išgyvenamumo analizėje statistiškai reikšmingi rezultatai nekonstatuoti (108).

Plačiai tyrinėjamas *MMP-9* (-1562 C/T) polimorfizmas, tačiau publikuotų tyrimų rezultatai kontroversiški. Vieni tyrėjai teigia, kad yra sąsaja tarp šio polimorfizmo ir krūties vėžio (97), kiti tyrėjai šios sąsajos nenustatė (77). Literatūros duomenimis, *MMP-9* -1562 T/T variantas lemia didesnę *MMP-9* geno raišką (142).

Mūsų tyrime *MMP-9* (-1562 C/T) polimorfizmas buvo statistiškai reikšmingai susijęs su ligos stadija. Esant vėlyvosioms ligos stadijoms dažniau nustatytas *MMP-9* -1562 T/T variantas, siejamas su blogesne ligos eiga ($p=0,02$). Parodyta statistiškai reikšminga sąsaja tarp *MMP-9* (-1562 C/T) polimorfizmo ir pokyčių sritiniuose limfmazgiuose. Esant pokyčių sritiniuose limfmazgiuose, dažniau nustatytas *MMP-9* -1562 T/T variantas ($p=0,001$). Pacientės, kurioms buvo nustatytas *MMP-9* -1562 C/C variantas ir nebuvo nustatyta pokyčių sritiniuose limfmazgiuose, gyveno ilgiau, nei tos pacientės, kurioms buvo nustatytas *MMP-9* -1562 T/T variantas (*log-rank* $p<0,001$). S. Hughes ir bendraautoriai (48) savo tyrime parodė, kad esant *MMP-9* -1562 C/T variantui rizika, kad pacientėms bus nustatyta pokyčių sritiniuose limfmazgiuose, padidėja 3,6 karto, palyginti su rizika esant *MMP-9* -1562 C/C variantui. Šią riziką autoriai nustatė tirdami mišrią populiaciją, kurioje kaukazinio tipo pacientės sudarė 65% tiriamosios grupės, tačiau ištyrus tik kaukazinio tipo pacientės sąsaja tarp *MMP-9* (-1562 C/T) polimorfizmo ir pokyčių limfmazgiuose nebuvo konstatuota.

Literatūroje nepatvirtinta *MMP-9* (-1562 C/T) polimorfizmo sąsaja su naviko diferenciacijos laipsniu (34). Mūsų tyrime pacientės, kurioms buvo identifikuotas blogos diferenciacijos navikas ir *MMP-9* -1562 C/C variantas, išgyveno ilgiau nei tos pacientės, kurioms nustatytas *MMP-9* -1562 T/T variantas

(*log-rank* $p=0,001$). MMP-9 -1562 T/T variantas lemia didesnę MMP-9 raišką, kuri, matyt, drauge su kitais veiksniais turi įtakos formuojantis blogos diferenciacijos navikui.

MMP-11. Šios MMP raiška pirmiausia buvo nustatyta fibroblastuose, supančiuose invazines krūties piktybinio naviko ląsteles, vėliau šios MMP raiška patvirtinta ir navikinėse ląstelėse. Tyrimai rodo, kad padidėjusi MMP-11 raiška gali būti siejama su krūties vėžio progresavimu (2, 84, 109).

Mūsų tyrimo duomenimis, krūties naviką identifikavus kaip duktalinę karcinomą tikimybė nustatyti *MMP-11* raišką navike ($r=0,219$, $p=0,04$) yra didesnė. C-W. Cheng ir bendraautoriai (12) tyrė moteris, sergančias vėlyvųjų stadijų invazine duktaline krūties karcinoma ir nustatė sąsają tarp *MMP-11* raiškos navike ir ligos stadijos bei pokyčių sritiniuose limfmazgiuose. Manoma, kad MMP-11 dalyvauja procese, kai ikivėžinės krūties ląstelės virsta invazinėmis navikinėmis ląstelėmis. Mechanizmas nėra aiškus, bet MMP-11, matyt, prisideda prie šio proceso epigenetiniame lygmenyje (12).

MMP-13. Šios MMP didelė raiška nustatyta sergant galvos ir kaklo, krūties vėžiu, taip pat sergant piktybiniais periferinių nervų dangalų navikais (18, 31, 46). MMP-13 raiškos tyrimų duomenys išlieka kontroversiški. Vieni autoriai teigia, kad MMP-13 raiška yra didesnė strominėse ląstelėse ar miofibroblastuose, kitų autorių duomenimis – navikinėse ląstelėse (136). MMP-13 raiškos padidėjimas siejamas su krūties vėžio ląstelių mikrometastazėmis kauluose. Atlikus tyrimus, panaudojant žmogaus krūties vėžio ląstelių liniją MDA-MB-231, nustatyta, kad šios ląstelės, kauluose prisijungusios prie I tipo kolageno, skatina MMP-13 raišką ir tolesnę osteolizę, t.y. kaulinio audinio ardymą, ir taip gali būti skatinamas metastazavimo procesas (82).

Šio tyrimo duomenimis, tikimybė nustatyti *MMP-13* geno raišką navike yra didesnė esant vėlyvosioms ligos stadijoms ($r=0,300$, $p=0,005$). Taip pat nustatyta reikšminga *MMP-13* raiškos navike sąsaja su naviko diferenciacijos laipsniu. Tikimybė nustatyti *MMP-13* raišką navike didėja esant blogai naviko

diferenciacijai ($r=0,287$, $p=0,007$). Literatūroje taip pat nurodoma, kad didelė MMP-13 raiška krūties navikinėse ląstelėse reikšmingai dažniau nustatoma esant blogai naviko diferenciacijai (62, 136).

5.2. Priešinės liaukos vėžys

MMP-9. Kaip jau minėta, MMP-9 yra viena plačiausiai tiriamų MMP dėl savo savybės skaidyti IV tipo kolageną ULU, kuris supa naviką. Skaidydama kolageną MMP-9 sudaro sąlygas navikinėms ląstelėms skverbtis į jas supančius audinius – taip inicijuojami naviko invazijos ir metastazavimo procesai (119). Literatūroje skelbiami metaanalizių rezultatai rodo, kad teigiama MMP-9 raiška siejama su blogesne ligos prognoze sergant krūties (119), nesmulkiaūsteliniais plaučių (95) ar skrandžio vėžiu (137). Dėl MMP-9 raiškos įtakos sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų išgyvenamumui vis dar nėra vienos nuomonės. Vienų autorių duomenimis, MMP-9 raiška priešinės liaukos navikinėse ląstelėse susijusi su ilgesniu laiku iki ligos atsinaujinimo (91), kiti autoriai tokios sąsajos nekonstatuoja (130), dar kitų autorių tyrimų rezultatai rodo, kad MMP-9 raiška susijusi su trumpesniu laiku iki priešinės liaukos naviko atsinaujinimo (8).

Siekėme iširti sąsają tarp *MMP-9* geno raiškos kraujyje ir sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu amžiaus bei ligos klinikinių-patologinių charakteristikų. Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad tikimybė nustatyti *MMP-9* raišką kraujyje didesnė, jei pacientai yra vyresnio amžiaus (64-85 metai) ($r=0,349$, $p=0,001$). Negausiose publikacijose ši sąsaja nebuvo nustatyta (8; 81, 104). Dažnai vyresnio amžiaus pacientams nustatomas agresyvesnio tipo priešinės liaukos navikas, kuris gali greičiau metastazuoti (133). Kadangi MMP-9 yra siejama su naviko invazijos procesu, todėl padidėjusią MMP-9 raišką vyresnio amžiaus pacientams, matyt, galima sieti su prasidėjusiu intensyvesniu naviko invazijos procesu.

Vertinant *MMP-9* geno raišką kraujyje nustatyta sąsaja tarp *MMP-9* raiškos ir ligos stadijos. Tikimybė nustatyti *MMP-9* raišką kraujyje yra didesnė, jei pacientas serga trečios stadijos liga ($r=0,387$, $p=0,001$). Mūsų gauti rezultatai

sutampa su literatūroje pateiktais duomenimis. *M.R. Cardillo* ir bendraautorių tyrime (10) MMP-9 baltymo raiška buvo dažniau nustatyta priešinės liaukos navikuose sergantiesiems trečios stadijos liga negu sergantiesiems antros stadijos liga.

TNM sistemos septintajame leidime rekomenduojama sergančiuosius priešinės liaukos vėžiu pacientus skirstyti į prognozes grupes (117). Pacientas priskiriamas tam tikrai prognozei grupei atsižvelgiant į ligos stadiją, Glisono laipsnį ir PSA koncentraciją serume. Literatūroje neradome publikacijų, kuriose būtų įvertinta MMP raiška priklausomai nuo to, kokiai prognozei grupei priskirtas pacientas. Mūsų tyrimo duomenimis, pacientą priskyrimas trečiai prognozei grupei, tikimybė nustatyti *MMP-9* raišką kraujyje didesnė ($r=0,342$, $p=0,004$).

Publikacijų apie MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo sąsajas su priešinės liaukos vėžiu, nedaug. Vieni tyrėjai teigia, kad yra sąsaja tarp šio polimorfizmo ir rizikos susirgti priešinės liaukos vėžiu (110), kiti tokios sąsajos nenustatė (32). Literatūros duomenimis, MMP-9 -1562 T/T variantas lemia didesnę *MMP-9* raišką (142).

Mūsų tyrime, palyginus MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo variantų pasiskirstymą pagal amžiaus grupes, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta. Įvertinus pacientų išgyvenamumą, nustatyta, kad vyresnio amžiaus pacientai (64-85 metai), kuriems buvo nustatytas MMP-9 -1562 C/T ar C/C variantas, išgyveno ilgiau, palyginti su to paties amžiaus pacientais, kuriems nustatytas T/T variantas (*log-rank* $p=0,02$).

Šio tyrimo duomenimis, pacientams, sergantiems trečia ligos stadija dažniau nustatytas MMP-9 -1562 T/T variantas, siejamas su blogesne ligos eiga ($r=0,300$, $p=0,006$), kas neprieštarauja literatūros duomenims (110).

Pacientų, sergančių priešinės liaukos vėžiu, skirstymas į prognozes grupes pasiūlytas neseniai, todėl nėra publikuota daug tyrimų, patvirtinančių tokio grupavimo reikšmingumą. *T. Kimura* ir bendraautorių (61) atliktas tyrimas, panaudojant didelę pacientų imtį ($n=15259$), rodo, kad sugrupavus priešinės liaukos vėžiu sergančius pacientus į prognozes grupes atsižvelgiant į ligos

stadiją, Glisono laipsnį ir PSA koncentraciją serume įmanoma prognozuoti ligos eigą. Tačiau autoriai nurodo, kad, matyt, reikalingas tikslesnis grupavimas, t.y. išskaidymas pacientų į smulkesnes prognozinės grupes, nes jų tyrime pacientų išgyvenamumas buvo panašus tiek pirmoje, tiek trečioje prognozinėje grupėje. Mūsų tyrime nenustatyta, kad MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmas būtų susijęs su pacientų išgyvenamumu atsižvelgiant į prognozinės grupes. Tačiau buvo nustatyta, kad pacientą priskyrus trečiajai prognozinėi grupei tikimybė nustatyti MMP-9 -1562 TT variantą, siejamą su blogesne ligos eiga, yra didesnė ($r=0,343$, $p=0,002$).

Manoma, kad tokios priešinės liaukos gerybinės ligos kaip priešinės liaukos uždegimas ar GPH padidina riziką susirgti priešinės liaukos vėžiu. Šios patologinės būklės sukelia pažaidas ląstelėse. Nors dar nėra aiškūs molekuliniai ir genetiniai šių ligų mechanizmai, tačiau epidemiologiniai tyrimai rodo, kad yra bendri požymiai (vyresnis amžius, hormonų raiška), kurie sieja priešinės liaukos vėžį, GPH ir uždegimą. Remiantis moksliniais klinikiniais tyrimais keliami hipotezė, kad uždegimas gali daryti įtaką GPH ir priešinės liaukos naviko vystymuisi bei progresavimui (21).

Mūsų tyrimo duomenys rodo, kad pacientai, kuriems kartu su naviku buvo nustatytas uždegimas, o kraujyje nustatytas MMP-9 -1562 CC ar CT variantas, išgyveno ilgiau nei tie pacientai, kuriems buvo nustatytas MMP-9 -1562 TT variantas (*log-rank* $p=0,02$). Mums prieinamuose literatūros šaltiniuose neaptikome tokio tipo tyrimų, todėl rezultatų palyginti negalime.

Literatūros šaltiniuose nėra duomenų apie MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo variantų dažnį ir sąsają su GPH, tačiau nurodoma, kad MMP-9 raiška yra didesnė priešinės liaukos naviko ląstelėse, palyginti su GPH ląstelėmis (27).

MMP-11. Šios MMP raiška siejama su didesne naviko atsinaujinimo rizika sergant krūties, kasos ar gaubtinės žarnos vėžiu. Nustatoma reikšmingai didesnė *MMP-11* geno raiška navikiniame krūties, plaučių, skrandžio, kepenų audinyje, palyginti su sveiku audiniu (96). Literatūroje radome tik keletą tyrimų,

kuriuose buvo analizuojama MMP-11 raiška sergant priešinės liaukos vėžiu. Tyrimuose nurodoma, kad priešinės liaukos navikinėse ląstelėse nustatyta didesnė MMP-11 raiška negu epitelinėse priešinės liaukos ląstelėse ar GPH ląstelėse (27; 89).

Siekėme ištirti sąsają tarp *MMP-11* geno raiškos kraujyje ir sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu amžiaus bei klinikinių-patologinių charakteristikų. Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad tikimybė nustatyti *MMP-11* raišką kraujyje didesnė, jei pacientai yra vyresnio amžiaus (64-85 metai) ($r=0,243$, $p=0,02$). *N. Nonsrijun* ir bendraautorių (89) tyrime tokia sąsaja nebuvo nustatyta. Reikia pažymėti, kad minėtų autorių tyrime pacientų amžiaus mediana buvo 70 metų (jauniausias 42 metų, vyriausias 91 metų), o mūsų tyrime pacientų amžiaus mediana yra 64 metai (jauniausias 50 metų, vyriausias 85 metų), tai, matyt, ir lėmė *MMP-11* raiškos pasiskirstymo skirtumus tarp grupių.

Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad esant trečiajam ligos stadijai, tikimybė nustatyti *MMP-11* raišką kraujyje yra didesnė ($r=0,591$, $p<0,001$). Literatūroje pateikiami kontroversiški duomenys – vieni autoriai aprašo sąsają tarp MMP-11 raiškos ir ligos stadijos (89), kiti autoriai tokios sąsajos nekonstatuoja (26). Tai gali būti dėl skirtingų pacientų įtraukimo į tyrimą kriterijų, kuriame buvo įtraukiami tik tokie pacientai, kuriems prieš tai nebuvo taikomas gydymas nuo vėžio, kitame tyrime pacientams buvo taikyta neoadjuvantinė terapija.

Plačiai priešinės liaukos vėžio diagnostikai taikomas PSA tyrimas. Pažymėtina, kad PSA yra specifinis priešinės liaukos žymuo, tačiau nespecifinis priešinės liaukos vėžiui. Didesnė PSA koncentracija serume gali būti nustatoma tiek esant priešinėje liaukoje navikui, tiek esant GPH (102). Sąsaja tarp MMP raiškos ir PSA koncentracijos nėra tiksliai nustatyta. Pavyzdžiui, literatūroje vienoje publikacijoje pateikiami statistiškai reikšmingi skirtumai tarp MMP-9 raiškos ir didesnės kaip 10 ng/ml PSA koncentracijos serume (103), kitose publikacijose tokia sąsaja nekonstatuota (27, 89, 91). Mūsų tyrime buvo nustatyta sąsaja tarp *MMP-11* raiškos ir PSA koncentracijos serume. Pacientams, kurių PSA koncentracija serume yra daugiau kaip 20 ng/ml, tikimybė nustatyti *MMP-11* raišką kraujyje yra didesnė ($r=0,375$, $p<0,001$).

Taip pat šiame tyrime, įvertinus patologines būkles, pasireiškiančias kartu su priešinės liaukos naviku, pažymėtina, kad tie pacientai, kuriems kartu su naviku priešinėje liaukoje nebuvo nustatyta GPH ir nenustatyta *MMP-11* raiškos kraujyje, išgyveno ilgiau, palyginti su tais pacientais, kuriems *MMP-11* raiška kraujyje buvo nustatyta.

Atlikta daugiaveiksnė priešinės liaukos vėžio pacientų išgyvenamumui turinčių įtakos veiksnių analizė parodė, kad naviko diferenciacijos laipsnis pagal Glisoną, GPH ir *MMP-11* geno raiška kraujyje yra nepriklausomi sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų išgyvenamumo prognoziniai veiksniai.

Nepaisant gausių darbų, skirtų įvertinti MMP raiškos svarba prognozuojant ligos eigą, vis dar neaišku, kurios iš MMP labiausiai susijusios su ligos progresavimu. Dar neatlikta daugiacentrių tyrimų, kurie įrodytų sąsają tarp vienos ar kitos MMP raiškos ar grupės MMP raiškos ir sergančių priešinės liaukos vėžiu pacientų išgyvenamumo. Mūsų gauti rezultatai skatina tęsti tyrimus siekiant nustatyti ir kitų MMP svarbą vėžio atvejais.

6. IŠVADOS

1. Sergant krūties vėžiu nustatyta:

- MMP raiška navike susijusi su jaunesniu pacientės amžiumi (*MMP-3*), naviko histologiniu tipu – duktaline karcinoma (*MT1-MMP*, *MMP-11*), blogai diferencijuotu naviku (*MMP-13*) bei sritinių limfmazgių būkle – metastazėmis tos pačios pusės pažasties limfmazgiuose (*MT1-MMP*, *MMP-3*);
- tik *MMP-9* geno raiška kraujyje susijusi su blogai diferencijuotu naviku;
- statistiškai reikšmingai dažniau nustatyti *MMP-3* polimorfizmo 5A/5A ir 5A/6A variantai bei *MMP-9* polimorfizmo C/C ir C/T variantai.

2. Sergančiųjų krūties vėžiu ilgesnei gyvenimo trukmei daro įtaką ne tik ligos stadija, naviko diferenciacijos laipsnis, estrogenų ir progesterono receptorių būklė, bet ir *MMP-3* polimorfizmas.

3. Sergant priešinės liaukos vėžiu nustatyta:

- *MMP-9* ir *MMP-11* raiška kraujyje susijusi su vyresniu pacientų amžiumi, ligos stadija ir prognozinė grupe; o *MMP-11* raiška susijusi dar ir su PSA koncentracija serume;
- statistiškai reikšmingai dažniau nustatytas *MMP-9* -1562 C/C variantas, palyginti su C/T ar T/T variantais.

4. Naviko diferenciacijos laipsnis pagal Glisoną, gerybinė priešinės liaukos hiperplazija ir *MMP-11* geno raiška kraujyje yra nepriklausomi sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu išgyvenamumo prognoziniai veiksniai.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Sergančiąsias krūties vėžiu pacientės būtina atidžiai stebėti, jei joms nustatytas *MMP-3* (-1171 5A/5A) variantas, susijęs su greitesniu vėžio progresavimu.

2. Vertinant sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu ligos eigą į prognozinę žymenų spektrą siūlome įtraukti *MMP-11* kaip prognozinę žymenį.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ahokas K., Skoog T., Suomela S., Jeskanen L., Impola U., Isaka K., Saarialho-Kere U. Matrilysin-2 (matrix metalloproteinase-26) is upregulated in keratinocytes during wound repair and early skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol.* 2005, 124(4):849–56.
2. Amalinei C., Caruntu I-D., Balan R.A. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol.* 2007, 48(4):323–34.
3. Artacho-Cordón F., Ríos-Arrabal S., Lara P.C., Artacho-Cordón A., Calvente I., Núñez M.I. Matrix metalloproteinases: potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. *Surg Oncol.* 2012, 21(3):e143–51.
4. Balducci C., Lilli C., Stabellini G., Marinucci L., Giustozzi G., Becchetti A., Cagini L., Locci P. Human desmoid fibroblasts: matrix metalloproteinases, their inhibitors and modulation by Toremifene. *BMC Cancer.* 2005, 5:22.
5. Barbolina M.V., Stack M.S. Membrane type 1-matrix metalloproteinase: substrate diversity in pericellular proteolysis. *Semin Cell Dev Biol.* 2008, 19(1):24–33.
6. Boström P., Söderström M., Vahlberg T., Söderström K.O., Roberts P.J., Carpen O., Hirsimäki P. MMP-1 expression has an independent prognostic value in breast cancer. *BMC Cancer.* 2011, 11:348.
7. Boyd S., Virolainen S., Parssinen J., Skoog T., van Hogerlinden M., Latonen L., Kyllönen L., Toftgard R., Saarialho-Kere U. MMP-10 (Stromelysin-2) and MMP-21 in human and murine squamous cell cancer. *Exp Dermatol.* 2009, 18(12):1044–52.
8. Boxler S., Djonov V., Kessler T.M., Hlushchuk R., Bachmann L.M., Held U., Markwalder R., Thalmann G.N. Matrix metalloproteinases and angiogenic factors: predictors of survival after radical prostatectomy for clinically organ-confined prostate cancer? *Am J Pathol.* 2010, 177(5):2216–24.
9. Brew K., Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta.* 2010, 1803(1):55–71.

10. Cardillo M.R., Di Silverio F., Gentile V. Quantitative immunohistochemical and in situ hybridization analysis of metalloproteinases in prostate cancer. *Anticancer Res.* 2006, 26(2A):973–82.
11. Chen P., Parks W.C. Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration. *J Cell Biochem.* 2009, 108(6):1233–43.
12. Cheng C.W., Yu J.C., Wang H.W., Huang C.S., Shieh J.C., Fu Y.P., Chang C.W., Wu P.E., Shen C.Y. The clinical implication of MMP-11 and CK-20 expression in human breast cancer. *Clinica Chimica Acta.* 2010, 411:234–41.
13. Chiang A.C., Massague J. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med.* 2008, 359(26):2814–23.
14. Chirco R., Liu X.W., Jung K.K., Kim H.R. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev.* 2006, 25(1):99–113.
15. Clark I.M., Young D.A., Rowan A.D. Matrix Metalloproteinase Protocols. *Methods in Molecular Biology.* Vol. 622. 2010. Humana Press 1–489.
16. Cudic M., Fields G.B. Extracellular proteases as targets for drug development. *Curr Protein Pept Sci.* 2009, 10(4):297–307.
17. Cui X., Schiff R., Arpino G., Osborne C.K., Lee A.V. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 2005, 23(30):7721–35.
18. Culhaci N., Metin K., Copcu E., Dikicioglu E. Elevated expression of MMP-13 and TIMP-1 in head and neck squamous cell carcinomas may reflect increased tumor invasiveness. *BMC Cancer.* 2004, 4:42.
19. Daniele A., Zito A.F., Giannelli G., Divella R., Asselti M., Mazzocca A., Paradiso A., Quaranta M. Expression of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in sentinel lymph node and serum of patients with metastatic and non-metastatic breast cancer. *Anticancer Res.* 2010, 30(9):3521–7.
20. Dasgupta S., Srinidhi S., Vishwanatha J.K. Oncogenic activation in prostate cancer progression and metastasis: Molecular insights and future challenges. *J Carcinog.* 2012, 11:4.
21. De Nunzio C., Kramer G., Marberger M., Montironi R., Nelson W., Schröder F., Sciarra A., Tubaro A. The controversial relationship between benign

- prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol.* 2011, 60(1):106–17.
22. Decock J., Paridaens R., Ye S. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases in lung, breast and colorectal cancer. *Clin Genet.* 2008, 73(3):197–211.
23. Deraz E.M., Yoshida Y.M., Obayashi M., Tsunematsu T., Tani H., Siriwardena S.B., Keikhaee M.R., Qi G., Iizuka S., Oqawa I., Campisi G., Lo Muzio L., Abiko Y., Kikuchi A., Takata T. MMP-10/Stromelysin-2 promotes invasion of head and neck cancer. *PLoS One.* 2011, 6(10):e25438.
24. Deryugina E.I., Quigley J.P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006, 25(1):9–34.
25. Egeblad M., Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2(3):161–74.
26. Escaff S., Fernandez J.M., Gonzalez L.O., Suarez A., Gonzalez-Reyes S., Gonzalez J.M., Vizoso F.J. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in prostate cancer. *Br J Cancer.* 2010, 102:922–9.
27. Escaff S., Fernandez J.M., Gonzalez L.O., Suarez A., Gonzalez-Reyes S., Gonzalez J.M., Vizoso F.J. Comparative study of stromal metalloproteinases expression in patients with benign hyperplasia and prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011, 137(3):551–5.
28. Fang Y.J., Lu Z.H., Wang F., Wu X.J., Li L.R., Zhang L.Y., Pan Z.Z., Wan D.S. Prognostic impact of ER β and MMP7 expression on overall survival in colon cancer. *Tumour Biol.* 2010, 31(6):651–8.
29. Fang S., Jin X., Wang R., Li Y., Gou W., Wang N., Wang Y., Wen D., Wei L., Zhang J. Polymorphisms in the MMP1 and MMP3 promoter and non-small cell lung carcinoma in North China. *Carcinogenesis.* 2005, 26(2):481–6.
30. Figueira R.C.S., Gomes L.R., Neto J.S., Silva F.C., Silva I., Sogayar M.C. Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. *BMC Cancer.* 2009, 9:20.

31. Folgueras A.R., Pendas A.M., Sanchez L.M., Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol.* 2004, 48(5–6):411–24.
32. Gil Ugarteburu R, Rivas del Fresno M, Gonzalez Rodriguez I, Gonzales Arriaga P, Lopez Cima F, Fernandez Samoano A, Fernandez Garcia I, Benito Garcia P, Muruamendiaraz Fernandez V, Tardon A: Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms in the diagnosis of prostate cancer. A preliminary experience. *Arch Esp Urol.* 2010, 63(2):125–32.
33. Ghilardi G., Biondi M.L., Caputo M., Leviti S., DeMonti M., Guagnellini E., Scorza R. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 promoter enhances breast cancer susceptibility. *Clin Cancer Res.* 2002, 8:3820–3.
34. Grieu F., Li W.Q., Iacopetta B. Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat.* 2004, 88:197–204.
35. Gross J., Lapiere C.M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1962, 48:1014–22.
36. Goldberg G.I., Wilhelm S.M., Kronberger A., Bauer E.A., Grant G.A., Eisen A.Z. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem.* 1986, 261(14):6600–5.
37. González-Arriaga P., López-Cima M.F., Fernández-Somoano A., Pascual T., Marrón M.G., Puente X.S., Tardón A. Polymorphism +17 C/G in matrix metalloprotease MMP8 decreases lung cancer risk. *BMC Cancer.* 2008, 8:378.
38. Gonzalez L.O., Pidal I., Janguera S., Corte M.D., Vazquez J., Rodriguez J.C., Lamelas M.L., Merino A.M., Garcia-Muniz J.L., Vizoso F.J. Overexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in mononuclear inflammatory cells in breast cancer correlates with metastasis-relapse. *Br J Cancer.* 2007, 97(7):957–63.

39. Hadler-Olsen E., Winberg J-O., Uhlin-Hansen L. Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Tumor Biol.* 2013, 34(4):2014–51.
40. Haupt L.M., Irving R.E., Weinstein S.R., Irving M.G., Griffiths L.R. Matrix metalloproteinase localisation by in situ-RT-PCR in archival human breast biopsy material. *Mol Cell Probes.* 2008, 22(2):83–9.
41. Hessels D., Schalken J.A. The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2009, 6(5):255–61.
42. Hettiaratchi A., Hawkins N.J., McKenzie G., Ward R.L., Hunt J.E., Wakefield D., Di Girolamo N. The collagenase-1 (MMP-1) gene promoter polymorphism -1607/2G is associated with favourable prognosis in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2007, 96(5):783–92.
43. Hirata H., Naito K., Yoshihiro S., Matsuyama H., Suehiro Y., Hinoda Y. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter is associated with conventional renal cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2003, 106:372–4.
44. Hoekstra R., Eskens F.A., Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. *Oncologist.* 2001, 6(5):415–27.
45. Holliday D.L., Hughes S., Shaw J.A., Walker R.A., Jones J.L. Intrinsic genetic characteristics determine tumor-modifying capacity of fibroblasts: matrix metalloproteinase-3 5A/5A genotype enhances breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res.* 2007, 9(5):R67.
46. Holtkamp N., Atallah I., Okuducu A.F., Mucha J., Hartmann C., Mautner V.F., Friedrich R.E., Mawrin C., von Deimling A. MMP-13 and p53 in the progression of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neoplasia.* 2007, 9(8):671–7.
47. Hu Z., Huo X., Lu D., Qian J., Zhou J., Chen Y., Xu L., Ma H., Zhu J., Wei Q., Shen H. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005, 11(15):5433–9.

48. Hughes S., Agbaje O., Bowen R.L., Holliday D.L., Shaw J.A., Duffy S., Jones J.L. Matrix metalloproteinase single-nucleotide polymorphisms and haplotypes predict breast cancer progression. *Clin Cancer Res.* 2007, 13(22):6673–80.
49. <http://epitools.ausvet.com.au>
50. <http://globocan.iarc.fr>
51. Illman S.A., Lohi J., Keski-Oja J. Epilysin (MMP-28) – structure, expression and potential functions. *Exp Dermatol.* 2008, 17(11):897–907.
52. Yan C., Boyd D.D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol.* 2007, 211(1):19–26.
53. Yao G., He P., Chen L., Hu X., Gu F., Ye C. MT1-MMP in breast cancer: induction of VEGF-C correlates with metastasis and poor prognosis. *Cancer Cell Int.* 2013, 13(1):98.
54. Yu C., Pan K., Xing D., Liang G., Tan W., Zhang L., Lin D. Correlation between a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer. *Cancer Res.* 2002, 62(22):6430–3.
55. Jensen E.V., Jacobson H.I. Fate of steroidal estrogen in target tissues. In Pincus G, Vollmer EP, eds. *Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer.* New York Academic Press. 1960, 1–174.
56. Jezierska A., Motyl T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Med Sci Monit.* 2009, 15(2):RA32-40.
57. 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(2):499–510.
58. Joos L., He J.Q., Shepherdson M.B., Connett J.E., Anthonisen N.R., Pare P.D., Sandford A.J. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet.* 2002, 11(5):569–76.
59. Kader A.K., Shao L., Dinney C.P., Schabath M.B., Wang Y., Liu J., Gu J., Grossman H.B., Wu X. Matrix metalloproteinase polymorphisms and bladder cancer risk. *Cancer Res.* 2006, 66(24):11644–8.

60. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010, 141(1):52–67.
61. Kimura T., Onozawa M., Miyazaki J., Kawai K., Nishiyami H., Hinotsu S., Akaza H. Validation of the prognostic grouping of the seventh edition of the tumor-nodes-metastasis classification using a large-scale prospective cohort study database of prostate cancer treated with primary androgen deprivation therapy. *Int J Urol*. 2013, 20:880–8.
62. Köhrmann A., Kammerer U., Kapp M., Dietl J., Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer*. 2009, 9:188.
63. Korpi J.T., Kervinen V., Mäklin H., Väänänen A., Lahtinen M., Läärä E. et al. Collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) plays a protective role in tongue cancer. *Br J Cancer*. 2008, 98(4):766–75.
64. Kousidoua O.Ch., Berdiaki A., Kletsas D., Zafiropoulos A., Theocharis A.D., Tzanakakis G.N., Karamanos N.K. Estradiol–estrogen receptor: A key interplay of the expression of syndecan-2 and metalloproteinase-9 in breast cancer cells. *Mol Oncol*. 2008, (2):223–32.
65. Kridel S.J., Sawai H., Ratnikov B.I., Chen E.I., Li W., Godzik A., Strongin A.Y., Smith J.W. A unique substrate binding mode discriminates membrane type-1 matrix metalloproteinase from other matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 2002, 277(26):23788–93.
66. Krippel P., Langsenlehner U., Renner W., Yazdani-Biuki B., Koppel H., Leithner A., Wascher T.C., Paulweber B., Samonigg H. The 5A/6A polymorphism of the matrix metalloproteinase 3 gene promoter and breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004, 10(10):3518–20.
67. Kubben F.J., Sier C.F., Meijer M.J., van den Berg M., van der Reijden J.J., Griffioen G., van de Velde C.J., Lamers C.B., Verspaget H.W. Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2006, 95:744–51.

68. Lambert E., Dasse E., Haye B., Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004, 49:187–98.
69. Lange C.A., Yee D. Progesterone and breast cancer. *Womens health (Lond Engl)*. 2008, 4(2):151–62.
70. Loffek S., Schilling O., Franzke C.W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J*. 2011, 38:191–208.
71. Lu Z., Wang Y., Zhang Q., Zhang X., Wang S., Xie H., Li Y., Jiao B., Zhang J. Association between the functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-7 promoter and susceptibility to adult astrocytoma. *Brain Res*. 2006, 1118(1): 6–12.
72. Mack G.S., Marshall A. Lost in migration. *Nat Biotechnol*. 2010, 28(3):214–29.
73. Mancini A., Di Battista J.A. Transcriptional regulation of matrix metalloprotease gene expression in health and disease. *Front Biosci*. 2006, 11:423–46.
74. Mannello F. What does matrix metalloproteinase-1 expression in patients with breast cancer really tell us? *BMC Med*. 2011, 9:95.
75. Marchionni L., Wilson R.F., Wolff A.C., Marinopoulos S., Parmigiani G., Bass E.B., Goodman S.N. Systematic review: gene expression profiling assays in early-stage breast cancer. *Ann Intern Med*. 2008, 148(5):358–69.
76. Martin M.D., Matrisian L.M. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2007, 26(3–4):717–24.
77. McColgan P., Sharma P. Polymorphisms of matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 and susceptibility to lung, breast and colorectal cancer in over 30000 subjects. *Int J Cancer*. 2009, 125(6):1473–8.
78. McCready J., Broaddus W.C., Sykes V., Fillmore H.L. Association of a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter with glioblastoma. *Int J Cancer*. 2005, 117(5):781–5.
79. Melendez-Zajgla J., Pozo L., Ceballos G., Maldonado V. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4. The road less traveled. *Mol Cancer*. 2008, 7:85.

80. Miao X., Yu C., Tan W., Xiong P., Liang G., Lu W., Lin D. A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (-1306C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2003, 63(14):3987–90.
81. Miyake H., Muramaki M., Kurahashi T., Takenaka A., Fujisawa M. Expression of potential molecular markers in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. *Urol Oncol.* 2010, 28(2):145–51.
82. Morrison C., Mancini S., Cipollone J., Kappelhoff R., Roskelley C., Overall C. Microarray and proteomic analysis of breast cancer cell and osteoblast co-cultures: the role of osteoblast matrix metalloproteinase (MMP)-13 in bone metastasis. *J Biol Chem.* 2011, 286(39):34271–85.
83. Motovali-Bashi M., Hojati Z., Hajihoseiny S. The role of matrix metalloproteinase-3 functional 5A/6A promoter polymorphism in tumor cell progression and metastasis of breast cancer. *Iranian Journal of Biotechnology.* 2008, 6(1):45–9.
84. Murphy G., Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med.* 2008, 29(5):290–308.
85. Nagase H., Visse R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006, 69(3):562–73.
86. Nilsson U.W., Garvin S., Dabrosin C. MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2007, 102(3):253–61.
87. Nishioka Y., Sagae S., Nishikawa A., Ishioka S., Kudo R. A relationship between Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter polymorphism and cervical cancer progression. *Cancer Lett.* 2003, 200(1):49–55.
88. Noel A., Jost M., Maquoi E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Semin Cell Dev Biol.* 2008, 19(1):52–60.
89. Nonsrijun N., Mitchai J., Brown K., Leksomboon R., Tuamsuk P. Overexpression of matrix metalloproteinase 11 in Thai prostatic adenocarcinoma is associated with poor survival. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013, 14(5):3331–5.

90. Oesterreich S., Lee A.V., Davidson N.E. Is it time to ReSET the standard for estrogen receptor testing in breast cancer? *J Clin Oncol.* 2010, 28(27):4101–3.
91. Ozden F., Saygin C., Uzunaslán D., Onal B., Durak H., Aki H. Expression of MMP-1, MMP-9 and TIMP-2 in prostate carcinoma and their influence on prognosis and survival. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013, 139(8):1373–82.
92. Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, 8(3):221–33.
93. Pellikainen J.M., Ropponen K.M., Kataja V.V., Kellokoski J.K., Eskelinen M.J., Kosma V.M. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2004, 10(22):7621–8.
94. Peng B., Cao L, Ma X., Wang W., Wang D., Yu L. Meta-analysis of association between matrix metalloproteinase 2, 7 and 9 promoter polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis.* 2010, 25(4):371–9.
95. Peng W.J., Zhang J.Q., Wang B.X., Pan H.F., Lu M.M., Wang J. Prognostic value of matrix metalloproteinase 9 expression in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Chim Acta.* 2012, 413(13–14):1121–6.
96. Peruzzi D., Mori F., Conforti A., Lazzaro D., De Rinaldis E., Ciliberto G., La Monica N., Aurisicchio L. MMP11: a novel target antigen for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2009, 15(12):4104–13.
97. Przybyłowska K., Kluczna A., Zadrożny M., Krawczyk T., Kulig A., Rykala J., Kolacinska A., Morawiec Z., Drzewoski J., Blasiak J. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006, 95(1):65–72.
98. Psaila B., Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer.* 2009, 9(4):285–93.
99. Pulukuri S.M., Rao J.S. Matrix metalloproteinase-1 promotes prostate tumor growth and metastasis. *Int J Oncol.* 2008, 32(4):757–65.
100. Ra H.J., Parks W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol.* 2007, 26(8):587–96.

101. Radisky D.C., Przybylo J.A. Matrix metalloproteinase-induced fibrosis and malignancy in breast and lung. *Proc Am Thorac Soc.* 2008, 5(3):316–22.
102. Rao A.R., Motiwala H.G., Karim O.M. The discovery of prostate-specific antigen. *BJU Int.* 2008, 101(1):5–10.
103. Reis S.T., Pontes-Junior J., Antunes A.A., de Sous-Canavez J.M., Dall'Oglio M.F., Passeroti C.C., Abe D.K., Crippa A., da Cruz J.A., Timoszczuk L.M., Srougi M., Leite K.R. MMP-9 overexpression due to TIMP-1 and RECK underexpression is associated with prognosis in prostate cancer. *Int J Biol Markers.* 2011, 26(4):255–61.
104. Ribeiro R., Monteiro C., Cunha V., Oliveira M.J., Freitas M., Fraga A., Principe P., Lobato C., Lobo F. et al. Human periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer aggressiveness in vitro. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012, 31:32.
105. Risbridger G.P., Davis I.D., Birrell S.N., Tilley W.D. Breast and prostate cancer: more similar than different. *Nat Rev Cancer.* 2010, 10(3):205–12.
106. Rozario T., DeSimone D.W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol.* 2010, 341(1):126–40.
107. Rudek M. A., Venitz J., Figg W. D. Matrix metalloproteinase inhibitors: do they have place in anticancer therapy? *Pharmacotherapy.* 2002, 22(6):705–20.
108. Scorilas A., Karameris A., Arnogiannaki N., Ardavanis A., Bassilopoulos P., Trangas T., Talieri M. Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer.* 2001, 84(11):1488–96.
109. Selvey S., Haupt L.M., Thompson E.W., Matthaei K.I., Irving M.G., Griffiths L.R. Stimulation of MMP-11 (stromelysin-3) expression in mouse fibroblasts by cytokines, collagen and co-culture with human breast cancer cell lines. *BMC Cancer.* 2004, 4:40.
110. Sfar S., Saad H., Mosbah F., Gabbouj S., Chouchane L. TSP1 and MMP9 genetic variants in sporadic prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007, 172:38–44.

111. Shin A., Cai Q., Shu X.O., Gao Y.T., Zheng W. Genetic polymorphisms in the matrix metalloproteinase 12 gene (MMP12) and breast cancer risk and survival: the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Res.* 2005, 7(4):R506–12.
112. Sieuwerts A.M., Usher P.A., Meijer-van Gelder M.E., Timmermans M., Martens J.W., Brunner N., Klijn J.G., Offenberg H., Foekens J.A. Concentrations of TIMP1 mRNA splice variants and TIMP-1 protein are differentially associated with prognosis in primary breast cancer. *Clin Chem.* 2007, 53(7):1280–8.
113. Simian M., Bissell M.J., Barcellos-Hoff M.H., Shyamala G. Estrogen and progesterone receptors have distinct roles in the establishment of the hyperplastic phenotype in PR-A transgenic mice. *Breast Cancer Res.* 2009, 11(5):R72.
114. Singh H., Jain M., Mittal B. MMP-7 (-181A>G) promoter polymorphisms and risk for cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008, 110(1):71–5.
115. Six L., Grimm C., Leodolter S., Tempfer C., Zeillinger R., Sliutz G., Speiser P., Reinthaller A., Hefler L.A. A polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 gene promoter is associated with the prognosis of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2006, 100(3):506–10.
116. Smolarz B., Szylo K., Romanowicz-Makowska H., Niewiadowski M., Kozłowska E., Kulig A. PCR Analysis of matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) gene promoter polymorphism in ovarian cancer. *Pol J Pathol.* 2003, 54(4):233–8.
117. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. 7th edition. Wiley-Blackwell Press 2009.
118. Sohail A., Sun Q., Zhao H., Bernardo M., Cho J.A., Fridman R. MT4- (MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2008, 27(2):289–302.
119. Song J., Su H., Zhou Y.Y., Guo L.L. Prognostic value of matrix metalloproteinase 9 expression in breast cancer patients: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013, 14(3):1615–21.
120. Sotiriou C., Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med.* 2009, 360(8):790–800.

121. Sounni N.E., Noel A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. *Biochimie*. 2005, 87(3–4):329–42.
122. Sparano J. A., Bernardo P., Stephenson P., Gradisher W.J., Ingle J.N., Zucker S., Davidson N.E. Randomized phase III trial of marimastat versus placebo in patients with metastatic breast cancer who have responding or stable disease after first-line chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology group trial E2196. *J Clin Oncol*. 2004, 22(23):4683–90.
123. Sullu Y., Demirag G.G., Yildirim A., Karagoz F., Kandemir B. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. *Pathol Res Pract*. 2011, 207(12):747–53.
124. Stankovic S., Konjevic G., Gopcevic K., Jovic V., Inic M., Jurisic V. Activity of MMP-2 and MMP-9 in sera of breast cancer patients. *Pathol Res Pract*. 206(4):241–7.
125. Steeg P.S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006, 12(8):895–904.
126. Sternlicht M. D., Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001, 17: 463–516.
127. Stetler-Stevenson W.G. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Cancer Metastasis Rev*. 2008, 27(1):57–66.
128. Tallant C., Marrero A., Gomis-Rüth F.X. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta*. 2010, 1803(1):20–8.
129. Tetu B., Brisson J., Wang C.S., Lapointe H., Beaudry G., Blanchette C., Trudel D. The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res*. 2006, 8(3):R28.
130. Trudel D., Fradet Y., Meyer F., Tetu B. Matrix metalloproteinase 9 is associated with Gleason score in prostate cancer but not with prognosis. *Hum Pathol*. 2010, 41(12):1694–701.
131. Van Wart H.E., Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire

- matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990, 87:5578–82.
132. Vayrynen J.P., Vornanen J., Tervahartiala T., Sorsa T., Bloigu R., Salo T., Tuomisto A., Makinen M.J. Serum MMP-8 levels increase in colorectal cancer and correlate with disease course and inflammatory properties of primary tumors. *Int J Cancer*. 2012, 131:E463–E474.
133. Vellekoop A, Loeb S. More aggressive prostate cancer in elderly men. *Rev Urol*. 2013, 15(4):202–204.
134. Visse R., Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92:827–39.
135. Vlaeminck-Guillem V., Ruffion A., Andre J., Devonec M., Paparel P. Urinary prostate cancer 3 test: toward the age of reason? *Urology*. 2010, 75:447–53.
136. Zhang B., Cao X., Liu Y., Cao W., Zhang F., Zhang S., Li H., Ning L., Fu L., Niu Y., Niu R., Sun B., Hao X. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. *BMC Cancer*. 2008, 8:83.
137. Zhang Q.W., Liu L., Chen R., Wei Y.Q., Li P., Shi H.S., Zhao Y.W. Matrix metalloproteinase-9 as a prognostic factor in gastric cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012, 13(6):2903–8.
138. Zhou Y., Yu C., Miao X., Tan W., Liang G., Xiong P., Sun T., Lin T. Substantial reduction in risk of breast cancer associated with genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes. *Carcinogenesis*. 2004, 25(3):399–404.
139. Zhou P., Du L.F., Ly G.Q., Yu X.M., Gy Y.L., Li J.P., Zhang C. Current evidence on the relationship between four polymorphisms in the matrix metalloproteinases (MMP) gene and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2011, 127(3):813–8.
140. Zinzindohoue F., Lecomte T., Ferraz J-M., Houllier A-M., Cugnenc P-H., Berger A., Blons H., Laurent-Puig P. Prognostic significance of MMP-1 and

MMP-3 functional promoter polymorphisms in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005, 11(2 Pt 1):594–9.

141. Weigel M.T., Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer.* 2010, 17(4):R245–R62.

142. Wieczorek E., Reszka E., Gromadzinska J., Wasowicz W. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinases in breast cancer. *Neoplasma.* 2012, 59(3):237–47.

143. Woolley D.E., Glanville R.W., Crossley M.J., Evanson J.M. Purification of rheumatoid synovial collagenase and its action on soluble and insoluble collagen. *Eur J Biochem.* 1975, 54(2):611–22.

144. Würtz S.O., Schrohl A.S., Sørensen N.M., Lademann U., Christensen I.J., Mouridsen H., Brüner N. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2005, 12(2):215–27.

145. Xing L.L., Wang Z.N., Jiang L., Zhang Y., Xu Y.Y., Li J., Luo Y., Zhang X. Matrix metalloproteinase-9-1562C>T polymorphism may increase the risk of lymphatic metastasis of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2007, 13(34):4626–9.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

ISI PUBLIKACIJOS disertacinio darbo tematika:

1. **D. Schveigert**, S. Cicenas, S. Bruzas, N. E. Samalavicius, Z. Gudleviciene, J. Didziapetriene. The value of MMP-9 for breast and non-small cell lung cancer patients' survival. *Adv Med Sci.* 2013, 58(1):73-82.
2. **D. Schveigert**, K. P. Valuckas, V. Kovalcis, A. Ulys, G. Chvatovic, J. Didziapetriene. Significance of MMP-9 expression and MMP-9 polymorphism in prostate cancer. *Tumori.* 2013, 99(4):537-43.

KITOS PUBLIKACIJOS disertacinio darbo tematika:

1. **D. Stančiūtė (Schveigert)**, J. Didziapetrienė, J. Kadziauskas. Matrikso metaloproteinazės sergant piktybiniais navikais. *Medicina* 2004, 40(12):1143-50.
2. **D. Stančiūtė (Schveigert)**, R. Aškinis, J. Didziapetrienė. Matrikso metaloproteinazių sintetiniai inhibitoriai (ikiklinikinių ir klinikinių tyrimų apžvalga). *Sveikatos mokslai* 2006, 6:622-8.
3. **D. Schveigert**, S. Bružas, I. Nedzelskienė, G. Chvatovič, R. Meškauskas, J. Didziapetrienė. Matrikso metaloproteinazės sergant krūties vėžiu. *Laboratorinė medicina* 2011, 4(52):179-84.

TARPTAUTINIAI STENDINIAI PRANEŠIMAI disertacinio darbo tematika:

1. **D. Stanciute (Schveigert)**, J. Didziapetriene, F. Jankevicius. Matrix metalloproteinase 9 single nucleotide polymorphism analysis in blood of urological cancer patients. *EJC Suppl.* 2006, 4(6):36.
Second International Congress on Molecular Staging of Cancer, 22–26 June 2006, Heidelberg, Germany.
2. **D. Schveigert**, J. Didziapetriene. Matrix Metalloproteinase-9 as Prognostic Marker of Cancer. *Eur J Hum Genet.* 2012, 20(1):187.
European Human Genetics Conference 2012, 23–26 June 2012, Nürnberg, Germany.

TARPTAUTINIAI ŽODINIAI PRANEŠIMAI disertacinio darbo tematika:

D. Schveigert, J. Didžiapetrienė, S. Bružas, A. Ulys. Prognostic significance of matrix metalloproteinases for patients with hormone-dependent cancer.

The 11th Baltic Congress of Laboratory Medicine, 9-11 May 2012, Vilnius, Lithuania.

KITOS MOKSLINĖS PUBLIKACIJOS:

1. **D. Stančiūtė (Schveigert)**, A. Girulytė, A. Ulys, F. Jankevičius, K. Sužiedėlis, G. Chvatovič. Matrix metalloproteinase 3 and matrix metalloproteinase 9 expression and polymorphisms analysis in bladder cancer. *Acta Medica Lituanica* 2007, 14(3):166-9.

2. **D. Stančiūtė (Schveigert)**, A. Ulys, J. Didžiapetrienė. Matrikso metaloproteinazės-9 polimorfizmo prognozinė vertė šlapimo pūslės vėžio remisijos trukmei. *Sveikatos mokslai* 2009, 6(19):2743-46.

3. **D. Stančiūtė (Schveigert)**, A. Barzinskienė, G. Chvatovič, I. Baranauskaitė, G. Smailytė, A. Ulys, J. Didžiapetrienė. Mikrosatelitinių sekų pokyčiai sergant šlapimo pūslės vėžiu. *Laboratorinė medicina* 2010, 1(145):3-7.

4. **D. Schveigert**, S. Cicenas, J. Bublevic, R. Askinis, V. Sapoka, J. Didžiapetriene. The role of genetic and other biomarkers in NSCLC prognosis. *Cent Eur J Med.* 2014, 9(3):382-90.

PRIEDAI

1 priedas. Leidimas atlikti biomedicininį tyrimą



LIETUVOS BIOETIKOS KOMITETAS

Konars 118/119-05, Vilnius g. 33-230, LT-01119 Vilnius, tel./faks. +370-5-212 45 63, www.mma.lt/bioetika

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2005-01-22 Nr. 16

Biomedicininio tyrimo pavadinimas:

„Matriksio metaloproteinazių prognostinės svarbos įvertinimas“

Protokolo Nr.: A7-1

Versija: 1

Data: 2005 m. vasario 14 d.

Asmens informavimo ir informuot asmens sutikimo forma:

Data: nenurodyta

Pagrindinis tyrėjas: Diana Stančiūtė

Biomedicininio tyrimo vieta:

Ištygos pavadinimas: Vilniaus universiteto Onkologijos institutas

Vėžio biologijos laboratorija

Adresas: Santariškių 1, Vilnius

Leidimas išduotas Lietuvos bioetikos komiteto posėdžio, įvykusio 2005 m. balandžio 19 d., sprendimu.

Lietuvos bioetikos komiteto biomedicininių tyrimų ekspertų grupės nariai

Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1	Ged. Gintari Breivienė	pediatrija	taip
2	Ged. Vytautas Čepulis	onkologija	taip
3	Doc. Eugenijus Gefenas	bioetika	taip
4	Doc. Zita Jušarskienė	filosofija	taip
5	Dr. Andrius Narbekovas	teologija	taip
6	Prof. Algimantas Raugle	pediatrija	taip
7	Doc. Krescentius Stoškus	filosofija	taip
8	Ged. Vytautas Tutkus	mikrochirurgija	taip
9	Dalia Zelenkienė	teise	ne

Lietuvos bioetikos komitetas dirba vadovaudamasis Geros Klinikinės Praktikos taisyklėmis, kurias siūloma priimti Europos Sąjungos, Japonijos ir JAV valdžios struktūroms

Pirmuotinkas



Eugenijus Gefenas

2 priedas. Asmens informavimo forma

ASMENS INFORMAVIMO FORMA

Pacientas # _____

Apie klinikinį tyrimą "Matrikso metaloproteinazių prognostinės svarbos įvertinimas sergant krūties, plaučių ir prostatos vėžiu"

Jūs esate kviečiamas (-a) dalyvauti klinikiniam tyrimui. Jūs pats nuspręsite, ar dalyvauti šiame tyrimui. Šios asmens informavimo formos tikslas yra papasakoti Jums apie tyrimą, kad Jūs galėtumėte nuspręsti, ar norite jame dalyvauti. Labai svarbu, kad Jūs suprastumėte galimą šio tyrimo riziką ir naudą tam, kad galėtumėte pasirašyti informuoto asmens sutikimo formą.

Jums nustatytas krūties, plaučių ar plaučių vėžys. Jūsų gydytojas paskirs jums tinkamą gydymą.

Šis tyrimas atliekamas siekiant anksti nustatyti Jūsų ligos atsinaujinimą ir laiku pradėti pakartotinį gydymą, kadangi tiriami fermentai, matrikso metaloproteinazės, susijusios su navikinio proceso progresavimu. Matrikso metaloproteinazės tai tokie fermentai, kurie padeda navikinėms ląstelėms patekti į kraujo apytaką ir plisti į tolimesnes organizmo vietas.

TYRIMO IR GYDYMO PROCEDŪROS

Prieš pradėdant gydymą, Jums bus išsamiai ištirta Jūsų sveikatos būklė. Jums bus atlikti kraujo ir šlapimo tyrimai. Pooperacinė medžiaga (navikas) bus tiriama laboratorijoje. Visi šie tyrimai yra įprastiniai. Jie yra atliekami, jeigu Jūs tyrimui ir nedalyvautumėte. Yra daug priežasčių, dėl kurių Jūsų gydytojas gali nuspręsti, kad Jūs negalite dalyvauti šiame tyrimui. Jei taip nutiks, jūsų gydytojas su Jumis aptars šias priežastis.

RIZIKA, NEPATOGUMAI, ŠALUTINIS POVEIKIS

Atliekami tyrimai negali sukelti nepageidaujamo poveikio organizmui. Tačiau imant kraują iš venos galite jaustis nemaloniai, kartais kraujo ėmimo vietoje kraujuoja ar atsiranda mėlynė, infekcija, galimi reti nualpimo atvejai.

Ir operacinė medžiaga (navikas), ir kraujo ėminys nebus imami atskirai tik šiam tyrimui. Bus tiriamas navikas, išimtas operacijos metu bei kraujas, likęs nuo kraujo ėminio, skirto laboratoriniams būtiniais tyrimams.

GALIMA NAUDA

Jei nuspręsite dalyvauti šiame tyrimui, šis tyrimas bus naudingas Jums, nes suteiks galimybę sekti Jūsų ligos eigą, taip pat bus gauta žinių, kurios gali būti naudingos, gydant kitus šia liga sergančius pacientus.

Tikimybė gauti naudą yra didesnė už tai, kad naudos gali nebūti.

PACIENTŲ TEISĖS

Jei nuspręsite nedalyvauti šiame tyrimui, šis sprendimas nepaveiks Jūsų tolesnės medicininės priežiūros.

Jūs galite pasitraukti iš tyrimo bet kuriuo metu, nerizikuodami Jūsų būsima medicinine priežiūra ar galimu Jūsų įtraukimu į vėlesnius klinikinius tyrimus. Jūsų dalyvavimas šiame tyrime yra visiškai savanoriškas ir Jūs galite nuspręsti pasitraukti iš šio tyrimo bet kuriuo metu - dėl to Jums nebus taikomos nuobaudos. Jei kurio nors metu nuspręsite pasitraukti iš tyrimo, turėtumėte kreiptis į savo gydantį gydytoją. Jei manote, kad pažeidžiamos jūsų teisės ar turite kokių klausimų apie savo, kaip tyrimo subjekto, teises, Jūs galite kreiptis į Lietuvos bioetikos komiteto pirmininką E. Gefeną tel 8 5 2124565.

Tyrimas gali būti nutrauktas be Jūsų sutikimo jei tyrimas sustabdomas.

KONFIDENCIALUMAS

Jūs turite teisę į privatumą. Jūs suprantate, kad visa informacija bus laikoma konfidencialia ir nebus atskleidžiama kiek tai leidžia galiojantys įstatymai. Jūsų pavardė ir kita tapatybę atskleidžianti informacija nebus išsiųsta už Vilniaus universiteto Onkologijos instituto ribų. Šio tyrimo duomenys gali būti spausdinami, tačiau jūsų tapatybė nebus atskleista. Pasirašydami šią sutikimo formą, jūs sutinkate, kad gauti duomenys (informacija) būtų panaudojami, neatskleidžiant jūsų tapatybės.

KOMPENSACIJA

Už dalyvavimą šiame tyrime jūs negausite jokio atlyginimo.

3 priedas. Informuoto asmens sutikimo forma

INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMO FORMA

Pasirašydamas(a) šią formą, Jūs pritariate, kad perskaitėte ir supratote aukščiau pateiktą Informuoto asmens sutikimo formą ir savo noru sutinkate dalyvauti moksliniame tyrime, kuris vadinasi “Matrikso metaloproteinazių prognostinės svarbos įvertinimas sergant krūties, plaučių ir prostatos vėžiu”.

Pasirašydamas šią formą Jūs sutinkate, kad tyrimo personalas jums labai gerai paaiškino šio tyrimo pobūdį, procedūras, naudą ir riziką, labai gerai atsakė į Jūsų klausimus.

Jūs suprantate, kad galite pasitraukti iš tyrimo bet kuriuo metu ir kad toks Jūsų veiksmas nepaveiks Jūsų tolesnio medicininio gydymo.

Jūs suprantate, kad šį tyrimą patvirtino Lietuvos bioetikos komitetas. Jūs gausite pasirašytą šios informuoto asmens sutikimo formos kopiją.

Pasirašydamas (-a) šią formą, Jūs neatsisakote jokių savo juridinių teisių bei leidžiate naudoti gautą informaciją neatskleidžiant Jūsų tapatybės.

Tyrimo dalyvio parašas

Data

Pavardė (prašome rašyti spausdintinėmis raidėmis)

Aš, žemiau pasirašęs, labai gerai paaiškinau visą svarbią su tyrimu susijusią informaciją aukščiau nurodytam pacientui.

Sutikimą gaunančio asmens parašas

Data

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju buvusiam Vilniaus universiteto Onkologijos instituto direktoriui prof. habil. dr. Konstantinui Povilui Valuckui ir dabartiniam Nacionalinio vėžio instituto direktoriui prof. dr. Narimantui Evaldui Samalavičiui už suteiktą galimybę ir paramą vykdant šį mokslinį darbą.

Esu ypač dėkinga mokslinio darbo konsultantei prof. dr. (HP) Janinai Didžiapetrienei, kuri uždegė žingeidumą moksliniam darbui. Nuoširdžiai dėkoju už visapusišką globą, padaršinimus ir patarimus, reiklumą bei skatinimą siekti kuo geresnių darbo rezultatų.

Labai ačiū Instituto kolegoms prof. dr. (HP) Sauliui Cicėnui, dr. Albertui Uliui, dr. Sauliui Bružui už bendradarbiavimą ir pagalbą atliekant klinikinę mokslinio darbo dalį.

Noriu padėkoti dr. Giedrei Smailytei ir dr. Irenai Kuzmickienei už konsultacijas statistiškai apdorojant disertacijos duomenis.

Nuoširdus ačiū doc. dr. Simonai Rūtai Letautienei už palaikymą ir nuolatinį skatinimą.

Dėkoju Valstybinio patologijos centro darbuotojui gydytojui patologui konsultantui Raimundui Meškauskui už histologinių tyrimų vertinimą.

Esu labai dėkinga savo mamai ir tėčiui už nuolatinį rūpestį, tikėjimą bei palaikymą, taip pat savo vyrui už visapusišką supratimą.