

Anna Goździalska

Ocena ekspresji mRNA  
dla kolagenów typu I, III i IV  
oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9  
w guzkowym  
raku podstawnocomórkowym  
i odmianie naciekającej



Anna Goździalska

Ocena ekspresji mRNA  
dla kolagenów typu I, III i IV  
oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9  
w guzkowym  
raku podstawnocomórkowym  
i odmianie naciekającej

Kraków 2014

Rada Wydawnicza Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego:  
Klemens Budzowski, Maria Kapiszewska, Zbigniew Maciąg, Jacek M. Majchrowski

Recenzja:

prof. dr hab. Anna Wojas-Pelc

prof. dr hab. Krystyna Olczyk

Projekt okładki: Oleg Aleksejczuk

Adiustacja: Halina Baszak Jaroń

ISBN 978-83-7571-324-4

Copyright© by Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego  
Kraków 2014

Żadna część tej publikacji nie może być powielana ani magazynowana w sposób umożliwiający ponowne wykorzystanie, ani też rozpowszechniana w jakiegokolwiek formie za pomocą środków elektronicznych, mechanicznych, kopiujących, nagrywających i innych, bez uprzedniej pisemnej zgody właściciela praw autorskich

Na zlecenie:



Krakowskiej Akademii  
im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego  
[www.ka.edu.pl](http://www.ka.edu.pl)

Wydawca:

Krakowskie Towarzystwo Edukacyjne sp. z o.o. – Oficyna Wydawnicza AFM,  
Kraków 2014

Sprzedaż detaliczną, hurtową i wysyłkową  
prowadzi Księgarnia „U Frycza”  
Kampus Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego  
ul. Gustawa Herlinga-Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków  
tel./faks: (12) 252 45 93  
e-mail: [ksiegarnia@kte.pl](mailto:ksiegarnia@kte.pl)

Skład: Oleg Aleksejczuk

Druk i oprawa: KTE sp. z o.o.

# Spis treści

Wykaz skrótów .....	9
<b>1. Wstęp</b> .....	13
1.1. Budowa skóry.....	13
1.1.1. Naskórek .....	13
1.1.2. Błona podstawna .....	16
1.1.3. Skóra właściwa .....	17
1.1.3.1. Kolageny .....	17
1.1.3.2. Glikoaminoglikany .....	20
1.1.4. Tkanka podskórna .....	21
1.1.5. Przydatki skóry .....	21
1.2. Nowotwory .....	23
1.2.1. Nowotwory skóry .....	24
1.2.2. Nieczerniakowe nowotwory skóry .....	26
1.2.3. Rak podstawnokomórkowy .....	26
1.2.3.1. Historia i epidemiologia .....	26
1.2.3.2. Klasyfikacja raka podstawnokomórkowego .....	28
1.2.3.3. Czynniki sprzyjające powstaniu raka podstawnokomórkowego .....	30
1.2.3.4. Molekularne podłoże rozwoju raka podstawnokomórkowego .....	32
1.2.3.4.1. Rola mutacji genu <i>RAS</i> w patomechanizmie raka podstawnokomórkowego .....	32
1.2.3.4.2. Rola mutacji w genie <i>P53</i> w patomechanizmie raka podstawnokomórkowego .....	33
1.2.3.4.3. Rola szlaku sygnałowego Hedgehog w patomechanizmie raka podstawnokomórkowego.....	34
1.2.3.4.4. Rola cykliny D1 w patomechanizmie raka podstawnokomórkowego .....	35
1.2.3.4.5. Rola ekspresji podjednostki <i>hTR</i> genu telomerazy w patomechanizmie raka podstawnokomórkowego.....	37
1.2.3.4.6. Rola ekspresji białka KI-67 i $\beta$ kateniny w patomechanizmie raka podstawnokomórkowego.....	37
1.2.3.4.7. Rola COX-2 w patomechanizmie raka podstawnokomórkowego .....	38

1.2.3.4.8. Rola apoptozy w rozwoju raka podstawnocomórkowego.....	39
1.2.3.4.9. Angiogeneza w rozwoju i progresji raka podstawnocomórkowego .....	39
1.2.3.5. Diagnostyka raka podstawnocomórkowego .....	41
1.2.3.6. Leczenie raka podstawnocomórkowego .....	41
1.3. Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej.....	47
1.3.1. Budowa metaloproteinaz .....	48
1.3.2. Regulacja ekspresji <i>MMPs</i> .....	50
1.3.3. Specyfika substratowa <i>MMPs</i> .....	53
1.3.4. Fizjologiczna aktywność <i>MMPs</i> .....	57
1.3.5. Aktywność <i>MMPs</i> w stanach patologicznych .....	57
1.3.6. Rola <i>MMPs</i> w procesie rozwoju nowotworu.....	58
1.3.7. Rola <i>MMPs</i> w patogenezie raka podstawnocomórkowego .....	59
<b>2. Cel pracy .....</b>	<b>61</b>
<b>3. Materiał i metody .....</b>	<b>63</b>
3.1. Pacjenci .....	63
3.2. Metody .....	64
3.2.1. Izolacja RNA z biopatów skóry pobranych od pacjentów .....	64
3.2.2. Pomiar stężenia całkowitego RNA i ocena czystości próbek.....	64
3.2.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji RT ( <i>Reverse Transcription</i> ).....	65
3.2.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )..	66
3.2.4.1. Amplifikacja fragmentu genu <i>COL1A1</i> .....	66
3.2.4.2. Amplifikacja fragmentu genu <i>COL3A1</i> .....	67
3.2.4.3. Amplifikacja fragmentu genu <i>COL4A4</i> .....	67
3.2.4.4. Amplifikacja fragmentu genu <i>MMP-2</i> .....	67
3.2.4.5. Amplifikacja fragmentu genu <i>MMP-9</i> .....	67
3.2.4.6. Amplifikacja fragmentu genu <i>ACTB</i> .....	68
3.2.5. Elektroforeza produktów uzyskanych w wyniku reakcji PCR w żelu agarozowym.....	68
3.2.6. Analiza statystyczna.....	69
<b>4. Wyniki .....</b>	<b>71</b>
4.1. Rozkłady badanych parametrów .....	71
4.2. Zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz <i>MMP-2</i> i <i>MMP-9</i> w raku podstawnocomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC pomiędzy próbkami tkanki nowotworowej (T), a próbkami tkanki zdrowej pobranej z marginesu guza (NT) od tych samych pacjentów .....	77

4.3. Zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 oznaczanych w tkance nowotworowej (T), w raku podstawnokomórkowym guzkowym w stosunku do raka naciekającego oraz tych samych parametrów oznaczanych w tkance zdrowej pobranej z marginesu guza (NT) raka guzkowego w stosunku do raka naciekającego .....	80
4.4. Zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej pomiędzy tkanką nowotworową (T), a tkanką zdrową, pobraną z marginesu guza (NT) u pacjentów w poszczególnych przedziałach wiekowych .....	83
4.5. Zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i naciekającym pomiędzy tkanką nowotworową (T), a tkanką zdrową pobraną z marginesu guza (NT) u pacjentów wg podziału na rodzaje fototypów w skali Fitzpatricka (fototyp II, fototyp III, fototyp IV).....	88
4.6. Zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC pomiędzy tkanką nowotworową (T), a tkanką zdrową pobraną z marginesu guza (NT) u pacjentów, w zależności od lokalizacji guza na głowie (G) i tułowi (Tł) .....	93
4.7. Zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej pomiędzy tkanką nowotworową (T), a tkanką zdrową pobraną z marginesu guza (NT) u pacjentów w zależności od płci .....	97
4.8. Zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-2 i spadkiem ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV, w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC .....	102
4.9. Zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-9 i spadkiem ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV, w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC .....	103
4.10. Zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-2 i wzrostem ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, w raku guzkowym i naciekającej odmianie BCC .....	104
<b>5. Dyskusja .....</b>	<b>105</b>
5.1. Rak podstawnokomórkowy.....	105
5.2. Ekspresja mRNA dla kolagenu typu I, III, IV i MMP-2 i MMP-9 .....	107

5.3. BCC guzkowy a odmiana naciekająca .....	110
5.4. Wiek pacjentów .....	111
5.5. Fototyp skóry .....	112
5.6. Lokalizacja guza.....	113
5.7. Płeć pacjentów .....	114
5.8. Wzrost ekspresji mRNA dla MMP-2 a spadek ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV .....	115
5.9. Wzrost ekspresji mRNA dla MMP-9 a spadek ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV .....	115
5.10. Wzrost ekspresji mRNA dla MMP-2 a wzrost ekspresji mRNA dla kolagenu typu I .....	116
5.11. Molekularne markery procesu powstawania nowotworu .....	116
<b>6. Wnioski</b> .....	119
<b>Piśmiennictwo</b> .....	121
<b>Aneks</b> .....	141
1. Metody biologii molekularnej użyte w prezentowanej pracy.....	141
1.1. Izolacja RNA z homogenatu tkanek – zasada metody.....	141
1.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji RT-PCR (Reverse Transcription PCR) – zasada metody.....	142
1.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) – zasada metody.....	143
1.4. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym – zasada metody.....	144
2. Wykaz odczynników .....	147
3. Bufory i roztwory.....	148
4. Wykaz aparatury wykorzystanej do badań.....	149
Streszczenie .....	155
Abstract .....	157
Indeks .....	159



# Wykaz skrótów\*

- ADAM** (*a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein*) – białko zawierające domenę dezintegriny i metaloproteinazy
- ADAM-TS** (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) – białko ADAM z motywami typu trombospondyny
- AP-1** (*activator protein 1*) – białko aktywatorowe typu 1
- AP-2** (*activator protein 2*) – białko aktywatorowe typu 2
- ASP** (*acylation stimulating protein*) – białko stymulujące acylację
- BCC** (*basal cell carcinoma*) – rak podstawnocomórkowy skóry
- BM** (*basement membrane*) – błona podstawna
- BT** (*brachytherapy*) – brachyterapia
- C1q** (*complement component 1q*) – białko układu dopełniacza
- cAMP** (*cyclic adenosine monophosphate*) – cykliczny adenozynomonofosforan
- CDK** (*cyclin dependent kinase*) – kinaza zależna od cyklin
- cDNA** (*complementary deoxyribonucleic acid*) – komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy
- CETP** (*cholesteryl ester transfer protein*) – białko transportujące estry cholesterolu
- C-JUN** (*AP1 family transcription factor*) – czynnik transkrypcyjny z rodziny AP1
- COX-1** (*cyclooxygenase-1*) – cyklooksygenaza 1
- COX-2** (*cyclooxygenase-2*) – cyklooksygenaza 2
- COX-3** (*cyclooxygenase-3*) – cyklooksygenaza 3
- DNA** (*deoxyribonucleic acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy
- EBRT** (*External Beam Radiotherapy*) – teleradioterapia
- ECM** (*extracellular matrix*) – macierz pozakomórkowa
- EGF** (*epidermal growth factor*) – czynnik wzrostu naskórka
- EMMPRIN** (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*) – czynnik stymulujący syntezę metaloproteinaz przez fibroblasty
- FAS ligand** (*TNF family transmembrane protein*) – białko przezbłonowe należące do rodziny TNF
- FGF** (*fibroblast growth factor*) – czynnik wzrostu fibroblastów

---

\* Wszystkie użyte w pracy symbole genów i białek wykazano zgodnie z zasadami przedstawionymi w Guidelines for Human Gene Nomenclature (1).

- FGFR** (*fibroblast growth factor receptor*) – receptor czynnika wzrostu fibroblastów;
- GLI** (*glioma-associated oncogene*) – czynniki transkrypcyjne biorące udział w szlaku Hedgehog
- GTP** (*guanosine triphosphate*) – guanozotrifosforan
- HB-EGF** (*heparin – binding epidermal growth factor*) – epidermalny czynnik wzrostu wiążący heparynę
- HIF-1** (*hypoxia induced factor 1*) – czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją
- HIV** (*human immunodeficiency virus*) – ludzki wirus niedoboru odporności
- HLH** (*Helix-Loop-Helix*) – motyw helisa-pętla-helisa
- HPV** (*human papilloma virus*) – wirus brodawczaka ludzkiego
- IFN- $\gamma$**  (*interferon-gamma*) – interferon gamma
- IGF-BP** (*insulin-like growth factor-binding protein*) – białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu
- IgG** (*immunoglobulin G*) – immunoglobulina G
- IL-1** (*interleukin 1*) – interleukina 1
- kD** (*kilodalton*) – kilodalton, jednostka masy
- LPL** (*lipoprotein lipase*) – lipaza lipoproteinowa
- MCC** (*Merkel cell carcinoma*) – rak pochodzący z komórek Merkla
- MCP-1** (*monocyte chemoattractant protein 1*) – czynnik chemotaktyczny monocytów
- MMPs** (*matrix metalloproteinases*) – metaloproteiny macierzy pozakomórkowej
- MMS** (*micrographic Mohs surgery*) – chirurgia Mohsa
- mRNA** (*messenger RNA*) – matrycowy mRNA
- MSH** (*melanotropin*) – melanotropina
- MT-MMPs** (*membrane type-matrix metalloproteinases*) – metaloproteiny macierzy pozakomórkowej typu błonowego
- NBCCS** (*nevroid basal cell carcinoma syndrome*) – zespół raka podstawnokomórkowego newoidu
- NC1** (*non-collagenous 1 region*) – fragment niekolagenowy
- NMSC** (*non melanoma skin cancers*) – nieczerniakowe raki skóry
- PAI-1** (*plasminogen activator inhibitor-1*) – inhibitor aktywatora plazminogenu 1
- PATCHED** (*Drosophila patched gen*) – gen regulatorowy szlaku Hedgehog
- PTCH** (*human homologue of Drosophila patched gene*) – ludzki homolog genu *patched* u *Drosophila*
- PCR** (*Polymerase Chain Reaction*) – łańcuchowa reakcja polimerazy
- PDGF-BB** (*platelet-derived growth factor*) – płytkowy czynnik wzrostowy
- PGF** (*placental growth factor*) – łożyskowy czynnik wzrostu
- proMMPs** (*metalloproteinases pro enzymes*) – proenzymy metaloproteinaz
- PGE2** (*prostaglandin E2*) – prostaglandyna E2

- RT** (*reverse transcriptase*) – odwrotna transkryptaza
- RT-PCR** (*reverse transcription polymerase chain reaction*) – odwrotna transkrypcja z reakcją łańcuchowej polimerazy
- SALT** (*skin associated lymphoid tissues*) – tkanka limfatyczna związana ze skórą
- SCC** (*squamous cell carcinoma*) – rak kolczystokomórkowy
- SH** (*sulphydrile group*) – grupa sulfhydrylowa
- SIS** (*skin immune system*) – skórny układ immunologiczny
- SMO** (*smoothened transmembrane proteins*) – białko transbłonowe SMO
- TF** (*tissue factor*) – czynnik tkankowy
- TFPI2** (*tissue- factor- pathway- inhibitor 2*) – inhibitor zewnątrzprzochodnej drogi krzepnięcia krwi
- TGF $\beta$**  (*transforming growth factor  $\beta$* ) – transformujący czynnik wzrostu  $\beta$
- TIMPs** (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) – tkankowe inhibitory metaloproteinaz
- TKI** (*tyrosine kinase inhibitor*) – drobnocząsteczkowy inhibitor kinazy tyrozynowej
- TNF** (*tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu
- UV** (*ultraviolet*) – światło ultrafioletowe
- VEGF** (*vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
- VEGFR-1** (*vascular endothelial growth factor receptor - 1*) – receptor dla czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego
- VHL** (*von Hippel-Lindau protein*) – białko von Hippel-Lindau
- VLA** (*very late antigens*) – bardzo późne antygeny
- 11 $\beta$ HSD1** (*11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase*) – dehydrogenaza 11 $\beta$ -hydroksysteroidowa typu 1
- 17 $\beta$ HSD** (*17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase*) – dehydrogenaza 17 $\beta$ -hydroksysteroidowa



# 1. Wstęp

## 1.1. Budowa skóry

Skóra stanowi największy organ ludzkiego ciała, o powierzchni od 1,5 do 2m<sup>2</sup>, którego grubość waha się w granicach od 0,5 do 5mm. Skóra zabezpiecza organizm przed czynnikami zewnętrznymi, uczestniczy w termoregulacji i w usuwaniu toksycznych produktów przemian metabolicznych. Skóra wpływa także na stan gospodarki wodno-elektrolitowej oraz odbiera odczucia temperaturowe, wrażenia dotyku i bólu. W skórze zachodzi synteza i metabolizm głównych hormonów steroidowych, takich jak estrogeny, androgeny, a także witamina D<sub>3</sub> [2,3].

Skóra składa się z trzech zasadniczych warstw – naskórka (*epidermis*), skóry właściwej (*dermis*) oraz podskórnej tkanki tłuszczowej (*tela subcutanea s. subcutis*) [4]. W skórze znajdują się naczynia krwionośne, naczynia limfatyczne oraz zakończenia nerwowe, a powierzchnię pokrywa płaszcz lipidowy [3].

### 1.1.1. Naskórek

Naskórek jest strukturą składającą się z pięciu poziomów morfologicznych. Od wnętrza licząc wyróżnia się warstwę podstawną (*stratum basale*), warstwę kolczystą (*stratum spinosum*), warstwę ziarnistą (*stratum granulosum*) oraz warstwę jasną (*stratum lucidum*). Najbliżej powierzchni znajduje się warstwa zrogowaciała (*stratum corneum*) [2,4,5]. Do przydatków skóry zalicza się: gruczoły łojowe, gruczoły potowe apokrynowe, gruczoły potowe ekrynowe, włosy oraz paznokcie.

Naskórek ma różną grubość, w zależności od obszarów ciała, które okrywa. Grubość ta waha się od 0,04 mm na powiekach i zewnętrznych narządach płciowych do około 1,5 mm na dłoniach i podeszwach. Naskórek tworzony jest przez wielowarstwowy nabłonek płaski rogowaciejący. Podstawowymi komórkami wchodzącymi w skład tej warstwy są keratynocyty, wśród których rozmieszczone są gwieżdźiste melanocyty, pochłaniające promieniowanie UV, a tym samym chroniące przed niekorzystnym wpływem tego promieniowania głębsze warstwy tkanek. W naskórku znajdują się także prezentujące antygen komórki Langerhansa i komórki Merkla, będące swoistymi receptorami czucia dotyku [6].

Naskórek pełni funkcję ochronną przed wnikaniem patogenów. Ta właściwość wynika ze specyfiki ukrwienia i metabolizmu komórek naskórka. Górne warstwy naskórka nie mają dostarczanego z krwią tlenu, zatem syntetyzują ATP na drodze beztlenowej, poprzez fermentację mlekową. Kwas mlekowy dysocjując, powoduje powstanie kwaśnego pH w zewnętrznych warstwach naskórka, co chroni naskórek przed kolonizacją bakterii [6].

Na zabarwienie skóry, w sposób najbardziej widoczny, wpływa aktywność melanocytów, wytwarzających melaninę [7]. Drobin pigmentu, skupiające się przede wszystkim w warstwie podstawnej naskórka, przybierają kolor od jasnożółtego do ciemnobrązowego. Intensywność barwy skóry nie wynika jednak z chemicznych różnic w strukturze barwnika, lecz jedynie ze stopnia zagęszczenia drobin melaniny. I tak np. u ludzi rasy czarnej melanocyty znajdują się w warstwie podstawnej naskórka, a także w skórze właściwej wewnątrz melanoforów, co powoduje szczególnie intensywne zabarwienie skóry [4,5,8].

Melanina pełni funkcje ochronne przed nadmiernym promieniowaniem UV, chroni głębiej leżące tkanki, poprzez absorbowanie promieniowania należącego do widma światła widzialnego, UV oraz podczerwonego [7]. Melanina syntezowana jest z tyrozyny, w reakcji katalizowanej przez tyrozinazę, pod wpływem wydzielanej przez pośredni płąt przysadki melanotropiny (MSH) [9]. Synteza tego związku zachodzi w aparacie Golgiego melanocytów, skąd w pęcherzykach zwanych melanosomami w postaci ziarenek transportowana jest z wypustek melanocytów do keratynocytów, w procesie cytokrynii. Barwnik ten jest też w pewnej ilości wychwytywany przez melanofory skóry, natomiast pozostała część usuwana jest na zewnątrz wraz ze złuszczającymi się komórkami naskórka [4,8].

W zależności od stopnia zabarwienia skóry wyróżnia się odpowiednie fototypy skóry, których zestawienie przedstawiono w tabeli 1.

Tym samym, na podstawie stopnia zabarwienia skóry wyróżnić można trzy podstawowe rasy ludzkie, których rodzaje zostały przedstawione w tabeli 2.

Fenotyp rasy celtyckiej charakteryzuje się bardzo jasną skórą, ze względu na małą ilość melanosomów, które szybko ulegają degradacji. U ludzi tych podczas migracji keratynocytów do powierzchni skóry następuje stopniowa utrata melaniny. Osoby rasy celtyckiej posiadają najczęściej jasne lub rude włosy i bardzo łatwo ulegają poparzeniom słonecznym [7].

Przedstawiciele rasy kaukaskiej mają skórę jasną, lekko matową. U tych osób melanosomy są liczne i w dużym stopniu wypełnione melaniną. Im dłużej osoby te przebywają na słońcu, tym większa jest możliwość migracji melanosomów na powierzchnię skóry, co powoduje powstanie opalenizny [12].

Tabela 1. Fototypy skóry według Fitzpatricka ocenione na podstawie reakcji na pierwszą w roku ekspozycję na słońce, przez 45-60 minut w południe, w okresie lata, w szerokości geograficznej 20-45° [10]

TYP SKÓRY	WYSTĄPIENIE OPARZENIA SŁONECZNEGO	WYSTĄPIENIE ŚCIEMNIENIA SKÓRY	RODZAJ POPULACJI
I	zawsze	nigdy	celtycka
II	zawsze	czasem	kaukaska
III	czasami	zawsze	kaukaska
IV	nigdy	zawsze	kaukaska
V	nigdy	zawsze	rdzenni Amerykanie
VI	nigdy	zawsze	Afroamerykanie

Tabela 2. Rasy ludzkie – klasyfikacja wg fototypu skóry, podana przez Adamski i Kaszuba [11]

RASA	FOTOTYP	WYGLĄD SKÓRY
celtycka	I	bardzo jasna skóra, rude lub blond włosy
		mała ilość melanosomów, które w większości rozpadają się w powierzchniowych warstwach naskórka
		dłuższa ekspozycja na słońce prowadzi do oparzenia
kaukaska	II-IV	jasna skóra
		duża ilość melanosomów
		pod wpływem słońca powstaje opalenizna związana z migracją melanosomów na powierzchnię skóry
negroidalna	V-VI	ciemna skóra
		bardzo liczne melanosomy
		dwukrotnie większe niż u rasy celtyckiej, nie ulegają rozpadowi rozpościerając się na powierzchni skóry

Skóra rasy negroidalnej charakteryzuje się czarnym kolorem i znacząco różni się od pozostałych typów, zarówno pod względem zabarwienia, jak i wrażliwości. Skóra tych osób wykazuje skłonność do wyprysku, będącego następstwem suchości skóry, a także do nadmiernego rogowacenia oraz nierównego zabarwienia, które nasila się wraz z wiekiem, prowadząc do powstawania odbarwionych plam oraz skłonnością do keloidów pojawiających się na skórze nawet po niewielkich urazach [11,13].

### 1.1.2. Błona podstawna

Naskórek łączy się ze skórą właściwą poprzez błonę podstawną (*membrana basalis*) [11]. Struktura ta składa się z białek, w tym proteoglikanów, produkowanych przez keratynocyty, a także komórki skóry właściwej. Górna część BM (błony podstawnej, *basement membrane*) nosi nazwę blaszki jasnej (*lamina lucida*). Blaszka jasna przylega do komórek warstwy podstawnej naskórka i osiąga grubość około 25 nm. Dolna część błony podstawnej to blaszka ciemna (*lamina densa*), o grubości około 50 nm. W blaszce jasnej znajduje się laminina – wielkocząsteczkowa glikoproteina zbudowana z trzech łańcuchów A (440kD) i dwóch łańcuchów B (400kD), łączących się za pomocą wiązań dwusiarczkowych w charakterystyczną strukturę krzyża [12]. W cząsteczce lamininy występują obszary umożliwiające przyłączenie kolagenu typu IV i proteoglikanów (np. zawierających siarczan heparanu) [14]. W strukturze lamininy znajdują się także miejsca wiążące się z receptorami komórek, przez co białko to umożliwia integrowanie się komórek ze sobą. W związku z taką budową, laminina ma bezpośredni wpływ na przyleganie keratynocytów do błony podstawnej i włókien kolagenowych, co ma szczególne znaczenie dla spistości skóry, ale również jest istotne przy naciekaniu nowotworów [15]. Laminina posiada również aktywność czynnika wzrostu, podobną do aktywności czynnika wzrostu naskórka (EGF), a także działa aktywująco na podziały i różnicowanie się komórek. W skład blaszki jasnej, oprócz lamininy i układu sieciowego tworzonego przez agregaty kolagenu typu IV, wchodzi również perlekan, który łączy składowe warstwy jasnej, a także białko o mniejszych rozmiarach, entaktyna, która tworzy mostki pomiędzy wspomnianą lamininą oraz kolagenem [16].

W blaszce ciemnej obecne są: kolagen typu IV, antygen kolagenowy KF-1 oraz proteoglikany, które tworzą gęstą sieć [12]. Każdy z tych elementów strukturalnych bierze udział w przyłączeniu naskórka do skóry właściwej, zatem jest to układ bardzo znaczący, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w procesie naciekania nowotworów [2,5,8,17].

Bardzo ważną rolę w prawidłowym połączeniu naskórka ze skórą właściwą odgrywają integryny, w szczególności z grupy bardzo późnych antygenów (VLA) [18]. Integryny stanowią nadrodzinę białek powierzchniowych biorących udział w przyleganiu komórek do komórek oraz komórek do składników substancji międzykomórkowej. Białka te są receptorami dla składników macierzy pozakomórkowej (ECM), takich jak kolagen (VLA 2), lamininy (VLA 6), fibronektyna (VLA 5) oraz epiligryna (VLA 3) [5,19].

Błona podstawna, dzięki swojej polarności służy jako płaszczyna wymiany wielu substancji pomiędzy krwią a naskórkiem [20]. Warstwa ta umożliwia migrację komórek nabłonkowych i decyduje o rodzaju tworzonych przez te komórki skupisk,



zarówno w okresie morfogenezy, jak i w czasie całego życia. Wiadomo, że zanik błony podstawnej towarzyszy procesowi powstawania nowotworów [5,17,20].

Poniżej błony podstawnej, pozakomórkowo, w tkance łącznej znajduje się włókniasta struktura zawierająca – oprócz kotwiczących fibryli – także włókna kolagenu typu III [2,8,5].

### 1.1.3. Skóra właściwa

W skórze właściwej wyróżnia się dwie warstwy, a mianowicie brodawkowatą (*stratum papillae*) oraz siateczkową (*stratum reticulare*). Skórę właściwą buduje tkanka łączna zbity, która jest uboga w komórki, składa się głównie z włókien kolagenowych i sprężystych, o nieregularnym, trójwymiarowym układzie, najliczniej występujących w głębszej warstwie skóry właściwej [2,4,16]. Fibroblasty i ich spoczynkowe formy fibrocyty są podstawowym składnikiem tkanki łącznej zbitej. W niektórych przypadkach fibrocyty mogą przekształcać się w fibroblasty, przechodząc do miejsca uszkodzenia tkanki, gdzie współuczestniczą w procesach naprawczych, wytwarzając blizny [2,4,8,21]. Fibroblasty biorą udział w syntezie włókien kolagenowych, siateczkowych i sprężystych oraz proteoglikanów macierzy pozakomórkowej. Fibroblasty syntetyzują także białka niekolagenowe, takie jak fibronektyna, tenascyna, aktyna oraz undulina [16]. Komórki te wydzielają również enzym – kolagenazę śródmiąższową (metaloproteinazę 1, MMP-1), która aktywowana jest w przestrzeni międzykomórkowej przez stromielizynę. Enzym ten katalizuje proteolizę kolagenów typu I, II, III, IV i X [2]. Fibroblasty dzięki zdolności wytwarzania elementów macierzy pozakomórkowej oraz enzymów katalizujących proteolizę ECM, kształtują strukturę macierzy pozakomórkowej. W macierzy pozakomórkowej znajduje się woda, elektrolity, białka osocza krwi, glikoaminoglikany, ale przede wszystkim obecny jest rozpuszczalny kolagen [2,8,19].

#### 1.1.3.1. Kolageny

Włókna kolagenowe tworzą szczególnie istotny element strukturalny podścieliska łącznotkankowego skóry właściwej. Kolagen jest glikoproteiną, którego cząsteczki mają postać sztywnego pręta o długości 280 nm i grubości 1,5 nm. Cząsteczki kolagenu budowane są przez trzy lewoskrętne łańcuchy polipeptydowe typu  $\alpha$ , o masie cząsteczkowej 100 kD, tworzące strukturę potrójnej helisy. Łańcuchy kolagenu zwinęte są wokół siebie prawoskrętnie, przy czym oba końcowe odcinki – telopeptydy nie tworzą spirali. Telopeptydy zawierają większość reszt cukrowych w postaci krótkich łańcuchów. Reszty te są głównym miejscem tworzenia wiązań stabilizujących układ cząsteczek kolagenu w fibryle. Cząsteczki te nie są połączone końcami [2,9,22].

Kolagen, tworzący fibryle włókien klejorodnych, posiada bardzo charakterystyczny skład aminokwasowy, a mianowicie co trzecim aminokwasem w łańcuchu polipeptydowym jest Gly, około 25% reszt stanowi Pro i Hyp, w dużych ilościach występują także Lys i jej hydroksylowa pochodna Hyl. Taka struktura powoduje, że sekwencja aminokwasów w cząsteczce kolagenu charakteryzuje się wyjątkową regularnością. Ponadto zwraca się uwagę na brak cysteiny i wiązań dwusiarczkowych w większości dojrzałych cząsteczek kolagenu oraz na niewielki odsetek cukrów w budowie, mimo tego, że są to glikoproteiny [22].

Zdolność do syntezy kolagenu wykazuje wiele komórek różnych tkanek, jednak głównym miejscem syntezy tego białka są komórki tkanki łącznej, takie jak chondroblasty i osteoblasty, a także występujące w skórze właściwej fibroblasty. W skórze właściwej znajduje się około 40% ustrojowego kolagenu [2,19,23].

W tkankach ludzkich zostało zidentyfikowane 19 odmiennych genetycznie typów kolagenu, zbudowanych z około 30 różnych łańcuchów polipeptydowych. Typy te różnią się pomiędzy sobą składem i sekwencją aminokwasową, masą cząsteczkową, a także stopniem hydroksylacji reszt prolilowych i lizylowych oraz glikozylacji hydroksylizyny [19]. Typy kolagenu wraz z genami kodującymi poszczególne kolageny oraz miejscem występowania tych białek, przedstawione zostały w tabeli 3.

W skórze występuje najwięcej kolagenu typu I i III. Kolagen typu I stanowi 80% masy całego kolagenu skóry. Gęsta sieć włókien kolagenowych, znajdujących się w warstwie siateczkowej skóry właściwej, budowana jest właśnie przez kolagen typu I, który należy do białek kolagenowych tworzących włókna. Dojrzały kolagen typu I tworzony jest przez około 1000 reszt aminokwasowych. Szczególną jego cechą jest występowanie reszt glicylowych w co trzecim miejscu łańcuchów  $\alpha$ . Jest to spowodowane tym, że Gly jest na tyle małym aminokwasem, że mieści się w ograniczonej przestrzeni środkowej części rdzenia potrójnej helisy. Powtarzająca się sekwencja  $(\text{Gly-X-Y})_n$  jest niezbędna do utworzenia typowej struktury kolagenu. W pozycji X i Y może znajdować się dowolny aminokwas. W strukturze kolagenu typu I około 100 reszt w pozycji X to Pro i 100 reszt w pozycji Y to Hyp. Aminokwasy te nadają dużą sztywność cząsteczce kolagenu. Włókna kolagenu typu I układają się w kierunku działania przyłożonej siły. Otoczone są szeregiem proteoglikanów, a czynnikiem spajającym je, a zarazem łączącym w grubsze fibryle jest kolagen typu VI [2].

Kolagen typu III stanowi 15% masy kolagenu skóry. Białko to występuje w postaci włókien siateczkowych budujących sieć w części brodawkowej skóry, aktywnie utrzymując połączenia między naskórkiem a skórą właściwą. Kolagen typu III zlokalizowany jest najczęściej koncentrycznie wokół naczyń krwionośnych oraz komórek tłuszczowych tkanki podskórnej, chociaż włókna te obecne są również w warstwie siateczkowej skóry właściwej. Występują tam wraz z gęstą siecią włókien kolagenowych typu I [6].

Tabela 3. Typy kolagenu wraz z genami odpowiedzialnymi za kodowanie poszczególnych białek i miejscem ich występowania w tkankach organizmu człowieka [19]

<b>TYP</b>	<b>MIEJSCE WYSTĘPOWANIA</b>	<b>GENY</b>
I	Większość tkanek, w tym kość	<i>COL1A1, COL1A2</i>
II	Chrząstka, ciało szkliste oka	<i>COL2A1</i>
III	Rozciągliwe tkanki, takie jak obecne w skórze, płucach, układzie naczyniowym	<i>COL3A1</i>
IV	Błony podstawne	<i>COL4A1-COL4A6</i>
V	Składnik towarzyszący kolagenowi typu I	<i>COL5A1-COL5A3</i>
VI	Większość tkanek łącznych	<i>COL6A1-COL6A3</i>
VII	Włókna kotwiczące	<i>COL7A1</i>
VIII	Śródbłonek, inne tkanki	<i>COL8A1-COL8A2</i>
IX	Tkanki zawierające kolagen typu II	<i>COL9A1-COL9A3</i>
X	Chrząstka hipertroficzna	<i>COL10A1</i>
XI	Tkanki zawierające kolagen typu II	<i>COL11A1, COL11A2, COL2A1</i>
XII	Tkanki zawierające kolagen typu I	<i>COL12A1</i>
XIII	Wiele tkanek	<i>COL13A1</i>
XIV	Tkanki zawierające kolagen typu I	<i>COL14A1</i>
XV	Wiele tkanek	<i>COL15A1</i>
XVI	Wiele tkanek	<i>COL16A1</i>
XVII	Hemidesmosomy skóry	<i>COL17A1</i>
XVIII	Wiele tkanek (np. wątroba, nerka)	<i>COL18A1</i>
XIX	Komórki mięsaka z mięśni poprzecznie prążkowanych	<i>COL19A1</i>

Kolagenu typu IV, V, VI, VII również występują w skórze. Kolagen typu IV tworzy struktury sieciowe w błonie podstawnej naskórka, a także wokół włókien nerwowych i mięśniowych zawartych w skórze [17]. Elastyczność formy tworzonej przez ten typ kolagenu zapewnia jego nietypowa budowa. Postać superhelisy tego białka jest przerwana około 24 niehelikalnymi odcinkami. N-końce pochodzące od 4 cząsteczek kolagenu IV mogą bocznie asocjować, co skutkuje powstaniem tetramerycznego elementu [5].

Kolagen typu V występuje tylko w niewielkich ilościach, najczęściej towarzysząc kolagenowi typu I, powleka powierzchnie komórek skóry właściwej. Kolagen typu VI charakteryzuje się występowaniem licznych wiązań dwusiarczkowych. Ten typ kolagenu występuje dookoła wiązek włókien kolagenowych typu I; znajduje się też wokół włókien nerwowych, naczyń krwionośnych i komórek tłuszczowych. Kolagen typu VII łączy się z kolagenem typu IV błony podstawnej poprzez końcową niekolagenową domenę tego białka, a także jest składnikiem filamentów kotwiczących, które występują w połączeniach naskórkowo-skrónych [4,5,19,22]. Poza wymienionymi powyżej typami kolagenu, w różnych tkankach występują inne jeszcze typy kolagenu, które przedstawione zostały w tabeli 3.

W skórze właściwej obok włókien kolagenowych występują również włókna sprężyste. Mechaniczna odporność skóry zapewniona jest przez przeplatające się ze sobą struktury obu tych rodzajów białek. Rozciągliwość skóry, która jest przejawem jej elastyczności, ulega znaczącemu zmniejszeniu w okresie starzenia się organizmu. Wynika to z procesów destrukcji elastyny i kolagenu, których miejsce zajmują ziarna i bryłki stanowiące produkty rozpadu tych białek [8,22].

Skóra ludzka przybiera charakterystyczną barwę, która stanowi istotną cechę odróżniającą rasy ludzkie. Na barwę skóry wpływają trzy podstawowe czynniki, do których zalicza się naturalne zabarwienie włókien kolagenowych warstwy siateczkowej skóry właściwej, przedstawioną już wcześniej ilość melaniny wytwarzanej przez melanocyty oraz aktualny stopień ukrwienia skóry. Patologicznym czynnikiem warunkującym zabarwienie skóry jest obecność chorobowych lub przypadkowych barwników, które dostały się do skóry [4,8].

### 1.1.3.2. Glikoaminoglikany

W skórze występują także glikoaminoglikany, do których zalicza się kwas hialuronowy, siarczan chondroityny, siarczan dermatanu, siarczan keratanu I i II oraz heparynę wraz z siarczanem heparanu. Kwas hialuronowy zapewnia skórze elastyczność oraz jędrność dzięki zdolności wiązania cząsteczek wody, przez co wpływa na gospodarkę wodno-elektrolitową ustroju [24,25]. Ilość kwasu hialuronowego determinowana jest zarówno przez wiek, jak i zmienność osobniczą. Związek ten cechuje także zdolność wiązania kolagenu, fibronektyny, lamininy czy receptorów CD44 zlokalizowanych na powierzchni komórek [26]. Uważa się ponadto, że kwas hialuronowy wspomaga rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych przez przestrzeń pozakomórkową. Wykazano, że komórki nowotworowe mogą stymulować fibroblasty do produkcji glikoaminoglikanów [19]. Również niewielkie ilości siarczanu heparanu związanego z błoną komórkową niektórych komórek nowotworowych mogą wpływać na utratę ich zdolności do adhezji, tym samym ułatwiając ich migracje [19,27].

### 1.1.4. Tkanka podskórna

Tkanka podskórna (*tela subcutanea s. subcutis*) zbudowana jest z tkanki łącznej wiotkiej, w której występuje zmienna ilość tkanki tłuszczowej. Tkanka podskórna różni się od skóry właściwej przewagą występowania komórek nad włóknami białkowymi, a także ilością istoty podstawowej. Z elementów komórkowych w tkance podskórnej obecne są, oprócz licznych skupień komórek tłuszczowych, fibroblasty i histiocyty. Występują tu również włókna kolagenowe i sprężyste, a także naczynia krwionośne i włókna nerwowe. Tkanka podskórna formalnie nie jest wymieniana jako składnik skóry właściwej, lecz obie te warstwy wykazują ścisłe połączenie anatomiczne i czynnościowe [4,8].

Tkanka tłuszczowa sprawuje kontrolę nad bilansem energetycznym człowieka, ale także odgrywa istotną rolę w metabolizmie hormonów płciowych [28]. Współcześnie tkankę tłuszczową uważa się za aktywny organ endokrynnny syntetyzujący liczne, biologicznie czynne peptydy, zwane adipokinami, które działają w obrębie tkanki tłuszczowej (działanie autokrynnne i parakrynnne) oraz na odległe narządy i tkanki (klasyczne działanie endokrynnne) [29,30]. Do biologicznie aktywnych białek produkowanych przez adipocyty należą: cytokiny, leptyna, czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukina 6 (IL-6), angiotensynogen — białko układu renina-angiotensyna, a także inne białka (pozostałe adipokiny): rezystyna, apelina, wisfatyna, a także lipaza lipoproteinowa (LPL), białko transportujące estry cholesterolu (CETP), apolipoproteina E, inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1), czynnik tkankowy (TF), aromataza zależna od cytochromu P450, dehydrogenaza 17 $\beta$ -hydroksysteroidowa (17 $\beta$ HSD), dehydrogenaza 11 $\beta$ -hydroksysteroidowa typu 1 (11 $\beta$ HSD1); adiposyna, adiponektyna, białko stymulujące acylację (ASP); czynnik chemotaktyczny monocytów (MCP-1). Wiele spośród wymienionych powyżej białek, które są produkowane przez komórki tłuszczowe, wykazuje cechy hormonów [31,32].

### 1.1.5. Przydatki skóry

Do przydatków skóry należą i paznokcie, włosy, jednostki mieszkowo-łojowe, gruczoły łojowe, gruczoły potowe apokrynowe i gruczoły potowe ekrynowe.

Paznokcie powstają w wyniku wrastania komórek naskórka w obręb skóry właściwej. W budowie paznokcia można wyróżnić macierz, płytkę paznokcia, hyponychium, łożysko, wał proksymalny oraz wały boczne, a także cuticula oraz lunula. Paznokcie są rogowymi, przezroczystymi płytkami pokrywającymi grzbietową powierzchnię zakończeń paliczków. Dojrzewanie i rogowacenie komórek zachodzi tu podobnie jak w naskórku. Przyrost paznokci na długość jest nieograniczony i wynosi ok. 2 mm miesięcznie, przy czym jest kilkakrotnie wolniejszy dla paznokci stóp.

Morfologia paznokci wykazuje nie tylko różnice indywidualne, ale i może wskazywać na toczący się proces chorobowy, ogólnoustrojowy (anoreksja) lub miejscowy, dotyczący samego paznokcia (grzybice, infekcja bakteryjna) [6,11].

Włosy są to elastyczne włókna rogowe powstające ze sznurów komórek naskórka wrastających w głąb skóry, aż do warstwy podskórnej. Włos zbudowany jest z komórek zrogowaciałych zawierających keratynę. Włókienka keratynowe, mające grubość 6 nm ułożone są jedno przy drugim w substancji wypełniającej komórki [8].

Jedną z najważniejszych struktur obecnych w skórze są jednostki mieszkowo-łojowe, które znajdują się na całej powierzchni ciała. Rozmieszczenie tych jednostek charakteryzuje się pewną nieregularnością, a one same przyjmują różne postaci (włosy meszkowe, pośrednie, terminalne). Nabłonkowe komórki macierzyste obecne w naskórku i mieszku włosowym są zarówno podstawowym źródłem odnowy naskórka, jak i cyklu włosowego. Komórki macierzyste jednostek mieszkowo-łojowych mogą ulegać transformacji nowotworowej. Nowotwory podstawnokomórkowe (BCC) pochodzą często z elementów mieszka włosowego. W części nabłonkowej mieszka włosowego znajdują się także komórki macierzyste wywodzące się z grzebienia nerwowego, z których można w warunkach *in vitro* uzyskać neurony i melanocyty [3].

Gruczoły łojowe należą do gruczołów holokrynowych, w których wytwarzanie łoju połączone jest ze zniszczeniem komórek. Następnie dochodzi do odtworzenia komórek wydzielniczych w warstwie podstawnej naskórka. Gruczoły wydzielające łoju, najliczniej występują na skórze twarzy, pleców czy owłosionej skórze głowy, nie stwierdza się ich natomiast na dłoniach i podeszwach. Pod wpływem skurczu mięśni przywłosowych, spowodowanego zimnem lub bodźcem psychicznym, dochodzi do wydzielania łoju. Wydzielina ta jest mieszaniną lipidową, złożoną m.in. ze skwalenu, cholesterolu, trójglicerydów i estrów woskowych. Funkcją łoju jest ochrona przed utratą wody oraz hamowanie wzrostu i rozwoju drobnoustrojów. Aktywność gruczołów łojowych podlega wpływom hormonalnym – estrogeny hamują czynność wydzielniczą gruczołów, natomiast androgeny wykazują wpływ stymulujący [11,12].

Występowanie gruczołów potowych apokrynowych związane jest z mieszkami włosowymi. Część wydzielnicza znajduje się w skórze właściwej lub tkance podskórnej. Gruczoły apokrynowe ulegają aktywacji w okresie pokwitania, podobnie jak gruczoły łojowe. Struktury te unerwiane są przez włókna adrenergiczne, co może wyjaśniać mechanizm oraz kontrolę wydzielania apokrynowego, gdyż obserwuje się wzmożoną aktywność tych gruczołów pod wpływem czynników hormonalnych lub emocjonalnych. Nie wykazano udziału gruczołów potowych apokrynowych w termoregulacji [6].

Gruczoły potowe ekrynowe występują na całej powierzchni skóry, a ich ujście znajduje się na powierzchni naskórka. Gruczoły ekrynowe wydzielają pot o składzie jonowym podobnym do osocza i pH w granicach 4 – 6,8, współuczestniczą także w procesie termoregulacji ustroju. Na zmienną zawartość poszczególnych składników potu wpływają takie czynniki jak dieta, klimat, hormony, czy też wysiłek fizyczny [4,9].

Skóra wchodzi w skład układu immunologicznego organizmu. Część układu immunologicznego związana ze skórą określona została jako SALT (*skin associated lymphoid tissues*) lub SIS (*skin immune system*). Zalicza się tu obecne w naskórku komórki Langerhansa, limfocyty T oraz wszystkie węzły chłonne związane ze skórą. Istotne w immunologicznej roli skóry są również keratynocyty zdolne do produkcji wielu cytokin, między innymi takich jak: IL-1, IL-3, IL-6, IL-8 oraz TNF (*tumor necrosis factor*) [5,8]. Niektóre czynniki, do których można zaliczyć przede wszystkim promieniowanie UV i rentgenowskie, znacznie zmniejszają zarówno liczbę, jak i aktywność komórek Langerhansa w skórze. Zaburza to fizjologiczny udział tych komórek w reakcjach immunologicznych, co znacząco sprzyja zagrożeniu rozwoju raka skóry [33,34,35].

Wygląd skóry stanowi odzwierciedlenie funkcjonowania całego ustroju, będąc wykładnikiem stanu zdrowia lub też postępującego procesu chorobowego. Kolor, nawilżenie, obecność zmian skórnych oraz natłuszczenie skóry są wypadkową działania czynników egzogennych, takich jak: promieniowanie UV, dieta, palenie tytoniu, stosowanie używek oraz czynników endogennych, do których należą m.in. zaburzenia wydzielania hormonów przysadki, tarczycy oraz hormonów steroidowych. Spośród wymienionych, najsilniej oddziałują na skórę estrogeny, pobudzając wzrost i dojrzewanie keratynocytów oraz stymulując fibroblasty do syntezy kolagenu [27,36,37].

## 1.2. Nowotwory

Nowotwory stały się obecnie jednym z najpoważniejszych problemów zdrowotnych na świecie. Po chorobach układu krążenia są główną przyczyną zgonów. Liczba chorób nowotworowych stale wzrasta, co związane jest ze starzeniem się społeczeństwa, zwiększaniem się liczby ludności oraz oddziaływaniem licznych czynników mutagennych na organizm człowieka, które aż w 80-90% uczestniczą w powstawaniu nowotworów złośliwych [38].

Wśród nowotworów wyróżnia się nowotwory łagodne (*neoplasma benignum*) oraz złośliwe (*neoplasma malignum*). Podział ten oparty jest na różnicy w budowie oraz rodzaju zmian chorobowych wywoływanych przez nowotwory [39]. Nowo-

twory łagodne są otoczone torebką łącznotkankową, nie dają przerzutów, choroby najczęściej mają dobre rokowania i tylko sporadycznie nowotwory te mogą prowadzić do śmierci pacjenta [40]. Komórki nowotworów łagodnych w obrazie morfologicznym są podobne do komórek tkanki prawidłowej, z której się wywodzą. Nowotwory złośliwe natomiast cechuje destrukcyjny, naciekający rozrost oraz zdolność do tworzenia przerzutów do węzłów chłonnych lub odległych narządów, w których komórki nowotworowe zagnieżdżają się i proliferują, dlatego właśnie nowotwory złośliwe są jedną z głównych przyczyn zgonów [41,42]. W przypadku komórek nowotworów złośliwych postrzegane jest znaczne zróżnicowanie w stosunku do komórek prawidłowych.

Zarówno nowotwory łagodne, jak i złośliwe powstają przeważnie z komórek somatycznych. Aby doszło do powstania nowotworów musi wystąpić mutacja w genomie komórki [41]. Mutacja taka pojawia się najpierw w pojedynczej komórce, należącej do określonego narządu lub tkanki podporowej, a następnie tworzony jest klon komórek powielających tę mutację, w wyniku czego powstają komórki stanowiące właściwą masę guza [39]. Mutacje są przekazywane pochodnym pokoleniom proliferujących komórek, jednak, ze względu na fakt, że guz powstaje z komórek somatycznych, zmiany te nie są przekazywane potomstwu [43]. Transformacja nowotworowa opiera się na powstawaniu nieodwracalnych zmian w genomie komórki, utracie kontroli ustroju nad nadmierną ich proliferacją oraz zaburzeniu reakcji immunologicznych skierowanych przeciwko zmienionym morfologicznie i czynnościowo komórkom [39]. W przypadku mutacji w komórkach linii germinalnej zmiany te zostają przekazane następnym pokoleniom. Tego typu mutacje dotyczą zwykle mutacji genów supresorowych, których inaktywacja prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek i jest podstawą toczącej się progresji nowotworowej [40,44,45].

### 1.2.1. Nowotwory skóry

Raki skóry należą do najczęściej występujących nowotworów złośliwych. U ludzi rasy białej stanowią aż 30% ogólnej liczby zachorowań na nowotwory. Aktualne dane wykazują, że w ostatnich dziesięcioleciach liczba odnotowywanych przypadków zachorowań na raka skóry stale się zwiększa (nawet o 10–15% rocznie). Najczęściej diagnozowaną postacią raka skóry jest rak podstawnokomórkowy (BCC), a następnie rak kolczystokomórkowy (SCC). Nowotwory te są jednak tylko miejscowo złośliwe i rzadko dają przerzuty. Fakt ten nie wyklucza możliwości naciekania pobliskich tkanek i niszczenia sąsiednich struktur [46]. Z takich zmian wynikają poważne defekty kosmetyczne, dlatego raki te powodują dyskomfort w życiu pacjentów, u których nastąpiła progresja choroby [47]. Na trzecim miejscu, pod względem częstotliwości występowania nowotworów skóry znajduje się czerniak,



wykazujący istotne różnice w stosunku do przedstawionych powyżej nowotworów pochodzenia nabłonkowego [48].

Podział nowotworów występujących na skórze [49]:

1. Raki wywodzące się z:
  - a) warstwy podstawnej naskórka (BCC),
  - b) komórek warstwy Malphigiego naskórka (SCC),
2. Rak neuroendokryny Merkla (MCC),
3. Nowotwory przydatków skóry (*adnexoma cutis*),
4. Rogowiak kolczystokomórkowy (*keratoacanthoma*),
5. Choroba Bowena (SCC w stadium Cis = *carcinoma in situ*),
6. Czerniak złośliwy (*melanoma malignum*),
7. Choroba Pageta jako rak gruczołu sutkowego z przewodów mlecznych szerzący się w obrębie naskórka,
8. Mięsak Kaposiego (*sarcomatosis idiopathica haemorrhagica multiplex*) jako nowotwór pochodzenia naczyniowego szerzący się w obrębie skóry,
9. Chłoniak skóry typu T (ziarniniak grzybiasty, *mycosis fungoides*),
10. Przerzuty do skóry (najczęściej pochodzące z ognisk pierwotnych czerniaka, raka płuca, jelita grubego, jamy ustnej, nerki, żołądka oraz raka jajnika i piersi u kobiet).

Większość przypadków nowotworów skóry dotyczy odsłoniętych części ciała, tych najbardziej narażonych na działanie promieniowania słonecznego. Rak skóry bardzo często poprzedzony jest zmianami określanymi jako stany przedrakowe, do których zalicza się rogowacenie starcze (słoneczne), skórę pergaminową i barwnikową, popromienne zapalenie skóry, a także stany zapalne przebiegające z bliznowaceniem [47].

Rogowacenie starcze (słoneczne) (*keratosis senilis/actinica*) – w przypadku tej jednostki chorobowej ryzyko transformacji nowotworowej wynosi 1/1000/rok, a długoterminowe ryzyko powstawania nowotworów określa się na około 10%. Do powstania ogniska rogowacenia słonecznego dochodzi pod wpływem przewlekłej ekspozycji na promienie słoneczne, szczególnie UV-B, które działa rumieniotwórczo. Zmiany skórne w przebiegu rogowacenia słonecznego powstają przeważnie u osób w starszym wieku, na twarzy i rękach, zatem w miejscach szczególnie narażonych na kontakt z promieniowaniem słonecznym [50]. Zmiany te mają postać pojedynczych lub mnogich ognisk, które przybierają barwę żółtobrunatną, o suchej, szorstkiej, łuszczącej się powierzchni. Rogowacenie słoneczne najczęściej prowadzi do rozwoju raka kolczystokomórkowego, poprzedzonego fazą przedinwazyjną w postaci choroby Bowena.

Skóra pergaminowata i barwnikowa (*Xeroderma pigmentosum*) – to choroba genetyczna, która zwiększa częstość zapadania na raki skóry około 2000 razy. Istota choroby polega na utracie genetycznie uwarunkowanych funkcji naprawczych

DNA komórek skóry, powstałych pod wpływem promieniowania UV (defekt DNA-azy). Choroba ta pojawia się w okresie dzieciństwa i jej manifestacja zapoczątkowana jest przez ekspozycję na promieniowanie słoneczne. Zmiany nowotworowe typu raków i czerniaków występują najczęściej na nieosłoniętej skórze twarzy oraz kończyn. Choroba ta daje złe rokowania – pacjenci cierpiący z jej powodu przeważnie umierają w wieku około 20 lat [12].

Popromienne zapalenie skóry (*radiodermatitis*), prowadzi do zmian zanikowych z równoczesnym nadmiernym rogowaceniem. Rzadziej występującym podłożem dla rozwoju nowotworów skóry mogą być przewlekłe stany zapalne, które przebiegają z bliznowaceniem (np. gruźlica toczniowa), jak również przerosłe blizny poparzeniowe lub inne długo gojące się i narażone na przewlekłe drażnienia blizny. Raki wywodzące się z blizny stanowią około 3% wszystkich przypadków nowotworów skóry, powstają po około 20-30 latach i najczęściej są to raki kolczystokomórkowe [14,49].

## 1.2.2. Nieczerniakowe nowotwory skóry

Do nieczerniakowych nowotworów skóry (NMSC) zalicza się nowotwory wywodzące się z komórek nabłonkowych naskórka, do których należy rak podstawnokomórkowy (BCC) i kolczystokomórkowy (SCC) [35]. Nieczerniakowe nowotwory skóry występują około 70 razy częściej u osób o jasnej karnacji niż u ludzi czarnoskórych. U rasy czarnej, jeśli występują, to najczęściej manifestują się jako rak kolczystokomórkowy. Jednak w odróżnieniu od ludzi białoskórych, u ludzi rasy czarnej, odsetek śmiertelności nie zwiększa się wraz z wiekiem [35].

## 1.2.3. Rak podstawnokomórkowy

### 1.2.3.1. Historia i epidemiologia

Udokumentowane przypadki zachorowań na BCC znane były już za czasów faraonów. Podczas badania egipskich mumii sprzed 4000 lat zauważono obecność licznych torbieli na szczękach i zuchwach. Zwrócono również uwagę na anomalie żeber, charakterystyczne dla zespołu nabłoniaków znamionowatych, które to schorzenie jest uwarunkowane genetycznie i predysponuje do wystąpienia licznych ognisk raka podstawnokomórkowego. Późniejsze dane opisu jednostki BCC pochodzą z 1850 roku, kiedy Hermann Lebert przedstawił nieuleczalną postać raka podstawnokomórkowego, określając ją mianem wrzód gryzoni, co opisane zostało przez Gawkrödger D, Ardern-Jones MR. [18].

Rak podstawnokomórkowy jest najczęściej występującym nowotworem skóry u ludzi rasy kaukaskiej i jednocześnie stanowi niemal 30% wszystkich wykrywanych nowotworów. Zapadalność na BCC wzrasta w sposób ciągły od ponad 50 lat

i każdego roku zwiększa się o około 10-15%. Ryzyko zachorowania na raka podstawnomórkowego i kolczystokomórkowego u ludzi rasy kaukaskiej rośnie wraz z wiekiem. Szacuje się, że nieczerniakowe nowotwory skóry rozwijają się u około 50% ludzi powyżej 65 roku życia, a u 50% chorych w ciągu 5 lat przebiegu choroby powstają kolejne zmiany [35]. Dane dotyczące częstości występowania BCC nie są jednak dokładne, co wynika z braku prowadzenia ścisłej dokumentacji przez różne placówki medyczne, w których usuwane są zmiany nowotworowe we wczesnym stadium. Drugim istotnym powodem tak małej wiedzy o zapadalności na oba te nowotwory jest fakt, że nadal wielu chorych nie zgłasza się do specjalistów pomimo pojawienia się na skórze niepokojących objawów [51].

Najwięcej przypadków raka podstawnomórkowego występuje u osób w przedziale wiekowym od 60 do 69 lat. Wystąpienie raka podstawnomórkowego u osób poniżej 30 roku życia należy do rzadkości, choć w ostatnim czasie zaobserwowano obniżenie średniej wieku pojawiania się BCC, a nawet kilka przypadków wystąpienia BCC u nastolatków [52]. Badania wykazują, że częstość występowania tego nowotworu ma związek z płcią, mężczyźni mają nieznacznie większe prawdopodobieństwo zachorowania na raka podstawnomórkowego niż kobiety [35].

BCC występuje przede wszystkim u ludzi rasy białej posiadających rude lub jasne włosy [53]. Rak podstawnomórkowy najczęściej rozwija się w miejscach takich jak głowa czy szyja, na skórze powiek, nosa, czoła oraz policzków, czyli w miejscach, które są najbardziej narażone na bezpośredni kontakt z promieniowaniem słonecznym [53,54]. Natomiast nigdy nie pojawia się na dłoniach, podszewkach oraz błonach śluzowych [55].

Rak podstawnomórkowy powstaje w skórze jako płaski lub zagłębiony w środku guzek o zwartej konsystencji. BCC należy do guzów typu płodowego, komórki nowotworowe zatem ulegają różnicowaniu już na poziomie komórek tworzących zawiązki przydatków ektodermy. BCC wywodzi się z warstwy komórek podstawnych naskórka oraz mieszków włosowych [53]. Często widoczne są liczne teleangiektazje w obrębie zmiany. Ta niebolesna zmiana bywa w wielu przypadkach ignorowana przez chorych, co istotnie pogarsza dalsze rokowania co do pełnego wyleczenia. Przebieg kliniczny raka podstawnomórkowego skóry jest trudny do przewidzenia [35]. Czasem zmiana opisywana jest przez pacjentów jako ranka, która nigdy nie goi się do końca. Rak podstawnomórkowy charakteryzuje się powolnym wzrostem, zwykle nowotwór wzrasta latami [56]. Guzy BCC mają zdolność do miejscowej, ale wielokierunkowej ekspansji, gdzie w zdrowych tkankach tworzą wypustki, co znacząco utrudnia radykalną resekcję [52]. Znane są jednak przypadki, w których nowotwór rośnie bardzo szybko, zajmując głębsze warstwy [35]. Jeśli rak ten nie jest odpowiednio leczony może nastąpić naciekanie i niszczenie okolicznych tkanek w tym podskórnej tkanki tłuszczowej, mięśni, chrząstek, a nawet kości [57]. Podczas procesu naciekania, komórki nowotworo-

we muszą przejść przez różne bariery, takie jak macierz pozakomórkowa, tkaniki śródmiąższowe oraz błonę podstawną. Najczęściej BCC nie daje przerzutów, dzięki czemu zakwalifikowany został do nowotworów miejscowo złośliwych [35]. Skłonność do przerzutów w przypadku BCC oszacowano na około 0,0028–0,5% przypadków [52].

Intensywność oraz czas trwania ekspozycji na promieniowanie UV ma istotny wpływ na rodzaj zmian zachodzących w skórze [34]. Częstość występowania raka podstawnokomórkowego istotnie się zwiększa w miarę zbliżania się do równika [51]. Za słuszością tego stwierdzenia przemawia większa częstość zapadania na ten rodzaj raka na terenie Australii niż w Anglii [58]. Udowodniono, że największe ryzyko rozwoju raka podstawnokomórkowego mają osoby, które przewlekle przebywają na słońcu [33], najczęściej z powodu wykonywanej pracy oraz osoby starsze, których ekspozycja na promieniowanie UV jest zbyt duża [55].

Rak podstawnokomórkowy może rozwijać się ze stanów przedrakowych lub też powstawać na uprzednio niezmięnionej, zdrowej skórze [55]. Do stanów przedrakowych stanowiących ważny punkt dla rozwoju tego guza zalicza się rogowacenie starcze, w tym róg skórny, schorzenie określane mianem skóry pergaminowatej oraz barwnikowej, uszkodzenie rentgenowskie skóry, a także rogowacenie chemiczne (arsenowe, dziegiowe) [33].

Śmiertelność w przypadku raka podstawnokomórkowego i kolczystokomórkowego jest stosunkowo mała. Dane wskazują, że w USA liczba zgonów będących wynikiem rozwoju obu tych nowotworów wynosi 1000-2000 osób w ciągu całego roku, podczas gdy ilość wszystkich wykrywanych w tym kraju nowotworów skóry określa się na ponad milion [6,18].

### 1.2.3.2. Klasyfikacja raka podstawnokomórkowego

Klasyfikacja oparta na histologicznym wzorcu wzrostu guza przyczynia się do powstania bardzo użytecznego podziału obejmującego stopień ryzyka powikłań związanych z rozwojem poszczególnych podtypów BCC [6,59]. Postacie wysokiego ryzyka charakteryzują się zwiększonym prawdopodobieństwem rozrostu i lokalnej inwazyjności, mogącej utrudniać chirurgiczne usunięcie guza. Ponadto mają one skłonność do nawrotów, co istotnie zmniejsza szanse całkowitej regresji choroby [60,61].

Biorąc pod uwagę modele wzrostu wyróżniono następujące odmiany raka podstawnokomórkowego: BCC guzkowy, powierzchowny, twarżynopodobny oraz drobnoguzkowy (micronodular). Oprócz tego zwrócono tu uwagę na wiele innych nietypowych odmian guzów, łącznie z tymi mającymi cechy raka podstawnopłaskokomórkowego – postać mieszana (*basosquamous carcinoma*) [62].

Tymczasem większość atlasów dermatologii klinicznej przy opisie poszczególnych podtypów raka podstawnokomórkowego kieruje się głównie cechami morfologicznymi określonych odmian guzów. Przedstawiana w nich klasyfikacja obejmuje następujące postaci raka podstawnokomórkowego: rak podstawnokomórkowy guzkowy (*BCC nodosum*), barwnikowy (*BCC pigmentosum*), twardzinopodobny (*BCC morpheiforme*), torbielowaty (*BCC cysticum*) i powierzchowny (*BCC superficiale*) [35].

Najbardziej użyteczna klinicznie jest klasyfikacja opierająca się jednocześnie na analizie cech klinicznych, przebiegu choroby i oceny histopatologicznej, w której wyróżnia się następujące postaci raka podstawnokomórkowego: guzkową, naciekającą, powierzchowną, barwnikową, twardzinopodobną, wrzodzącą i wrzodzącą olbrzymią [35,63].

Najczęściej występuje postać guzkowa (stanowi około 60% przypadków) [64,65]. Postać ta pojawia się dość wcześnie, często nie zauważana, lub bagatelizowana i wzrasta przez lata. Charakterystyczne dla tej postaci jest pojawienie się błyszczącego guzka z perlistym brzegiem bez cech zapalnych. Skóra pokrywająca guzek jest cienka, co prowadzi do częstych krwawień i powstawania owrzodzeń w obrębie zmian, spowodowanych nawet delikatnym zadrapaniem.

BCC typu naciekającego, drugi pod względem częstości występowania [64], zaliczany bywa do postaci twardzinopodobnej lub guzkowej [60,65]. Zmiany te mogą ukryć się pod zdrowo wyglądającą skórą. Postać BCC typu naciekającego jest szczególnie agresywna, zwykle obserwuje się nawroty. Jest to spowodowane trudnymi do określenia brzegami i głębokością nacieku, przez co nowotwór zazwyczaj usuwany jest tylko częściowo [66,67].

Rak podstawnokomórkowy powierzchowny jest trzeci co do częstości występowania [65]. Wzrasta powoli, opisywano przypadki samoistnej regresji nowotworu. Zmiana tego typu jest umiejscowiona na tułowi lub kończynach, rzadziej na twarzy, co może świadczyć o mniejszym udziale promieniowania UV w jej rozwoju. Częściej dotyczy młodych ludzi. Charakterystyczne są liczne zmiany, połyskujące, delikatnie zaróżowione z wyraźnymi brzegami. Rzadko występuje swędzenie, krwawienia czy owrzodzenia. Nowotwór jest często mylony z chorobą Bowena. Duże zmiany tego typu zdarzają się niezwykle rzadko [12].

Postać barwnikowa jest opisywana jako brunatno-czerwona zmiana, często z owrzodzeniami i centralnym zagłębieniem. Postać ta posiada ogniska zawierające dużą ilość pigmentu.

BCC twardzinopodobny jest postacią agresywną, występuje głównie na twarzy, ma słabo widoczne brzegi i może naciekać w głąb skóry dlatego też często nie jest całkowicie usuwany, co powoduje wzrost ryzyka nawrotów. Zmiana może osiągnąć nawet kilka centymetrów w ciągu paru miesięcy lub pozostawać tej samej wielkości przez lata [60].

Postać wrzodząca ma silnie zaznaczone brzegi oraz tendencję do krwawień, często głęboko nacieka, niszcząc mięśnie czy kości. Przypadki postaci wrzodzącej olbrzymiej zdarzają się rzadziej niż postaci klasyczne nowotworu [46]. Postać ta charakteryzuje się agresywnym wzrostem i głębokim naciekaniem prowadzącym do niszczenia okolicznych struktur [59].

### 1.2.3.3. Czynniki sprzyjające powstaniu raka podstawnkomórkowego

Wymienia się wiele czynników odpowiedzialnych za powstawanie raka podstawnkomórkowego, jednak najistotniejszą rolę w procesie powstawania nowotworu odgrywa promieniowanie UV [65,68]. Promieniowanie UV charakteryzuje się wielokierunkowym wpływem na skórę. UV-B (280–320 nm) działa najsilniej i przenika warstwę naskórka, uszkadzając DNA komórek skóry, niszcząc kolagen i elastynę i tworząc nadtlenki kwasów tłuszczowych, działające mutagennie. Aktywność promieniowania UV-B jest najwyższa latem, w godzinach południowych. Przy nadmiernej ekspozycji, promieniowanie to działa silnie rumieniotwórczo, wzmacnia syntezę melaniny i wywołuje oparzenia słoneczne [69]. Promieniowanie UV-A (200–280 nm) ma mniejsze działanie rumieniotwórcze, natomiast bardziej nasila syntezę melaniny. Wysokie dawki promieniowania UV-A wzmagają niekorzystne działanie promieniowania UV-B, czego głównym efektem może być inicjowanie zmian nowotworowych w skórze [70]. Promieniowanie UV-C (200–280 nm) działa mutagennie na cząsteczki DNA, a także ma silne właściwości rumieniotwórcze, uszkadza rogówkę i ma działanie bakteriobójcze [33,34].

Wszystkie wymienione typy promieniowania powodują uszkodzenie oraz mutacje w łańcuchu DNA. Do niedawna wydawało się, że najistotniejsze znaczenie w rozwoju nieczerniakowych raków skóry ma przewlekłe narażenie na promieniowanie UV-B i jego kumulacyjny charakter. Dzisiejszy stan wiedzy pozwala sądzić, że główną przyczyną kancerogenezy, zwiększającą ryzyko rozwoju raka skóry aż pięciokrotnie, jest częste opalanie się w dzieciństwie [58].

Analiza roli promieniowania UV-A i UV-B na skórę wykazała, że promieniowanie to prowadzi do powstawania odmiennych typów mutacji w cząsteczce DNA. Mutacje zainicjowane przez promieniowanie UV-B polegają na tranzycji tyminy w miejsce cytozyny i mogą przebiegać według schematu: C---T lub CC---TT [34]. Tymczasem promieniowanie UV-A prowadzi do transwersji guaniny w miejsce tyminy i mogą być to zmiany pojedyncze T---G lub podwójne TT---GG [33].

Aktualne dane dotyczące kancerogenezy pokazują, że mutacje związane z promieniowaniem UV zarówno w BCC, jak i SCC dotyczą pojedynczych sekwencji pirymidyna---pirymidyna, przy czym w 68% jest to tranzycja cytozyna---tymina [70]. Następne 20% stanowią zmiany podwójne w postaci CC---TT. Przedstawiony tu typ mutacji występuje bardzo rzadko pod wpływem innych czynników wywo-

łujących uszkodzenia w cząsteczce DNA, a tym samym jest charakterystyczny dla promieniowania UV [33,71].

Ekspozycja na działanie promieniowania jonizującego również zwiększa ryzyko powstawania raka podstawnokomórkowego. Przedział czasowy pomiędzy działaniem tego promieniowania, a wystąpieniem objawów nowotworu skóry może wynosić nawet 20–40 lat. Największe niebezpieczeństwo rozwoju nowotworu skóry powstaje podczas stosowania licznych frakcjonowanych dawek promieniowania o niewielkiej intensywności ( $< 2$  Gy). Pojedyncze dawki o małej intensywności są już mniej szkodliwe [70]. Dodatkowo pacjenci narażeni na promieniowanie jonizujące przed 40 rokiem życia są zdecydowanie bardziej podatni na związane z nim komplikacje niż ludzie starsi. Ryzyko nawrotu nowotworu oraz powstawania przerzutów po udanej terapii, jest tu większe niż w przypadku promieniowania UV. Szczególnie wrażliwi na efekty promieniowania jonizującego są pacjenci chorujący na zespół nabłoniaków znamionowatych (zespół Gorlina-Goltza), u których rozwój licznych ognisk raka podstawnokomórkowego w obrębie naświetlanego pola jest bardzo prawdopodobny [6,12].

Ekspozycja na działanie wielu organicznych związków chemicznych może generować powstawanie nowotworów pochodzenia naskórkowego. Jako przykład czynników rakotwórczych można tu wymienić szeroko stosowane insektycydy (np. Paris Green) oraz mieszanki terapeutyczne (np. Fowler's solution) zawierające toksyczny arsen, który przypuszczalnie bierze udział w generowaniu wolnych rodników, które prowadzą do uszkodzeń łańcucha DNA [6].

Wśród biorców przeszczepów odnotowuje się znacznie zwiększoną zachorowalność na nieczerniakowe nowotwory skóry, w tym głównie raka kolczystokomórkowego. Częstość występowania raka podstawnokomórkowego jest u tych pacjentów od 5 do 10 razy większa niż w populacji generalnej, natomiast częstość zapadania na raka kolczystokomórkowego zwiększa się nawet 200-krotnie. Wartości te uzależnione są od: typu skóry pacjenta, skumulowanej ekspozycji na słońce, wieku przeszczepu oraz stopnia i długości trwania terapii immunosupresyjnej [72]. Udowodniono występowanie istotnego związku pomiędzy prowadzoną terapią immunosupresyjną, a rozwojem nowotworów skóry wśród pacjentów po przebytej transplantacji [6,12]. Postulowany jest również udział HPV w powstaniu i rozwoju NMSC, ze szczególnym uwzględnieniem SSC, ale także w przypadku BCC [73,74]. Pacjenci zakażeni wirusem HIV mają także nieznacznie zwiększone ryzyko rozwoju nowotworów pochodzenia naskórkowego [6,12,75].

Przewlekłe uszkodzenia skóry to typowy czynnik prowadzący do rozwoju raka kolczystokomórkowego, ale dotyczy także etiologii raka podstawnokomórkowego. Znane są przypadki, w których BCC zlokalizowany był w pobliżu blizny pourazowej oraz poszczepiennej, jak również pod protezami uciskającymi. Chroniczne, zapalne dermatozy, wśród których znajdują się np. zapalenie skóry spowodowane promie-

niowaniem lub gruzlicą skóry, mogą także istotnie zwiększyć ryzyko powstania wyżej wymienionego nowotworu [75]. Ponadto znane są przypadki raka podstawnokomórkowego będącego wynikiem przewlekłych owrzodzeń skóry, pojawiających się np. w ciężkim przebiegu wyprysku podudzi (*stasis dermatitis*) [12].

Zwrócono uwagę, że pacjenci, u których poziom witaminy D<sub>3</sub> znajduje się w górnej granicy normy należą do grupy zwiększonego ryzyka rozwoju nieczerniakowych nowotworów skóry. Fakt ten pozostaje w sprzeczności z dotychczasowym sądem, że składniki odżywcze, w tym witamina D<sub>3</sub>, mogą zmniejszyć prawdopodobieństwo wystąpienia raka skóry [76]. Udział witaminy D<sub>3</sub> w procesie skórnej kancerogenezy jest aktualnie tematem wielu prac badawczych i wymaga wyjaśnienia.

#### 1.2.3.4. Molekularne podłoże rozwoju raka podstawnokomórkowego

Badania molekularne procesu kancerogenezy dowodzą, że rak powstaje wówczas, gdy komórka wydostanie się spod kontroli mechanizmów decydujących o jej podziałach i lokalizacji [38]. Proces przekształcenia komórki prawidłowej w nowotworową jest wieloetapowy i zazwyczaj długotrwały [39]. Właściwy czas pojawienia się objawów choroby zależy od wielu czynników, jednak szacunkowo przeciętny okres wzrostu guza o średnicy około 1 cm trwa nawet do 5 lat. Najważniejszymi czynnikami wpływającymi na czas pojawienia się choroby nowotworowej są lokalizacja powstałej zmiany nowotworowej oraz rodzaj tkanki, z której guz powstaje [77].

Proces nowotworowy jest konsekwencją wystąpienia mutacji w genach, których produkty są istotne dla prawidłowego przebiegu proliferacji, wzrostu komórek, różnicowania się i apoptozy [77]. W inicjacji nowotworów skóry pochodzenia naskórkowego istotną rolę odgrywa uszkodzenie DNA komórek przez promieniowanie UV, szczególnie UV-B [70,78,79]. Promieniowanie UV-B prowadzi do zaburzenia replikacji oraz transkrypcji w komórkach organizmów żywych, zahamowania syntezy białek, co skutkuje również zaburzeniem szlaków energetycznych komórki [23,80]. W powstaniu i progresji raka podstawnokomórkowego istotne znaczenie mają mutacje zlokalizowane zarówno w obrębie protoonkogenów, jak i genów supresorowych [70,77].

##### 1.2.3.4.1. Rola mutacji genu RAS w patomechanizmie raka podstawnokomórkowego

W patogenezie raka podstawnokomórkowego szczególne znaczenie mają protoonkogeny, w tym rodzina genów RAS, w skład której wchodzi *H-RAS*, *K-RAS* oraz *N-RAS*. Białka P21RAS, produkty genów RAS, znajdują się na wewnętrznej powierzchni błony komórkowej i należą do tzw. białek G, mających zdolność wiązania i hydrolizy guanozynotrifosforanu (GTP), przez co biorą udział w aktywacji łańcu-



cha przekaźników wewnątrzkomórkowych, który odpowiada za regulację procesów wzrostu i różnicowania komórek [76].

Podczas transformacji nowotworowej dochodzi do mutacji punktowej genu *RAS*. Następuje zamiana guaniny (G) na tyminę (T) w ramce odczytu protoonkogenu *H-RAS*, co w rezultacie prowadzi do zastąpienia Gly znajdującej się w białku kodowanym przez ten protoonkogen, przez Val, występującą w białku powstającym na matrycy onkogenu. Dochodzi do zablokowania wewnętrznej aktywności GTPazowej białka *RAS*, co przyczynia się do ciągłego pobudzania komórki do kolejnych podziałów mitotycznych. Oprócz skierowania komórek na drogę aktywnej proliferacji, powstała nieprawidłowość w *P21RAS* stymuluje także niekontrolowany wzrost komórek, naciekanie okolicznych tkanek oraz nasilenie procesu angiogenezy [81].

Mutacja *H-RAS*, genu który bierze udział we wczesnych etapach kancerogenezy jest najczęściej ujawniającą się mutacją w nowotworach skóry. Defekt w tym genie prowadzi do wzmożonej aktywności proliferacyjnej keratynocytów i wynika z nadmiernej ekspozycji na promieniowanie UV. Mutacje genu *H-RAS* w NMSC powstają w okolicach ciała szczególnie narażonych na działanie światła słonecznego, natomiast u osób zamieszkujących obszary o małym nasłonecznieniu mutacja ta stwierdzana jest rzadko [77].

Mutacje genu *RAS* w 10–40% przypadków przyczyniają się do powstania NMSC, przy czym większość z nich prowadzi do rozwoju SCC. Prawidłowość ta jeszcze bardziej ujawnia się u pacjentów chorujących na *Xeroderma pigmentosum*. Wówczas mutacje genu *RAS* występują aż u 53% pacjentów [70,82].

#### **1.2.3.4.2. Rola mutacji w genie *P53* w patomechanizmie raka podstawnokomórkowego**

Gen *P53* należy do genów supresorowych, mających kluczową rolę w powstawaniu NMSC. U 50% chorych z BCC stwierdza się mutacje *P53*. W przypadku SCC mutacje te są obecne aż w 90% przypadków. Również w zmianach przednowotworowych, takich jak rogowacenie słoneczne i choroba Bowena potwierdzono obecność mutacji *P53* [83,84].

Prawidłowe białko *P53* uniemożliwia wejście w cykl komórkowy komórkom, które mają uszkodzony materiał genetyczny. Ekspozycja komórek skóry na promieniowanie UV wzmaga ekspresję zmutowanego białka *P53*, co prowadzi do transformacji nowotworowej i rozwoju NMSC [15,85]. Najważniejsze są tu mutacje punktowe zmiany sensu, które zaburzają tworzenie aktywnych tetramerów białka *P53*. Istotne również są insercje, mutacje nonsensowne i delecje allelu *P53* [86]. Od rodzaju i miejsca powstałej mutacji zależy funkcjonowanie zmutowanego białka *P53*. Jeśli mutacja zlokalizowana jest w domenie białka wiążącej się z DNA, wówczas

następuje deaktywacja białka, a z tego wynika niezdolność do wiązania się z DNA i tym samym następuje zahamowanie transkrypcji genów dla białek docelowych. Zmutowane białko P53 może nadal tworzyć kompleks z prawidłowym białkiem P53, jednak nie posiada już możliwości specyficznego wiązania się z DNA komórki, przez co przestaje pełnić funkcję regulatora transkrypcji [6].

Promieniowanie słoneczne, będące przyczyną powstania NMSC, najczęściej powoduje w genie *P53* uszkodzenia w odcinkach wolnej naprawy DNA, najczęściej w kodonach 175, 245, 248, 249 i 282. Zaistniałe mutacje prowadzą do utraty zdolności białka P53 do specyficznego wiązania się z cząsteczką DNA [87]. W związku z tym następuje zanik wpływu P53 na proces apoptozy, zanik kontroli nad podziałami komórkowymi oraz naprawy uszkodzonego DNA [88]. W efekcie dochodzi do kumulacji mutacji w genomie komórki, a następnie inicjacji procesu nowotworowego [6,71].

#### 1.2.3.4.3. Rola szlaku sygnałowego Hedgehog w patomechanizmie raka podstawnocomórkowego

W NMSC często dochodzi również do zaburzenia funkcjonowania szlaku sygnałowego Hedgehog, który odgrywa kluczową rolę w regulacji prawidłowego rozwoju i proliferacji komórek. Białka uczestniczące w szlaku Hedgehog kodowane są przez rodzinę genów Hedgehog oraz gen supresorowy *PATCHED* [89]. Udowodniono, że inaktywacja *PTCH* (ludzki homolog *PATCHED*) jest zjawiskiem powszechnym w przebiegu raka podstawnocomórkowego skóry [90].

Indukcja transdukcji sygnału na drodze sonic Hedgehog rozpoczyna się w błonie komórkowej, gdzie dochodzi do połączenia się białka SHH z kompleksem receptorowym *PATCHED*(*PTCH*)/*SMOOTHENED*-*SMO*. Największe powinowactwo do SHH posiada *PATCHED 1* (*PTCH 1*), będący jedną z izoform receptora *PATCH*. Połączenie się SHH z receptorem *PTCH* prowadzi do rozpadu kompleksu *PTCH*/*SMOOTHENED*-*SMO*, co powoduje aktywację *SMO*. Kiedy białko SHH jest nieobecne, *PTCH* prowadzi do konstytutywnej supresji *SMO*, kiedy natomiast SHH zostanie zaktywowane, następuje rozszczepienie w cytoplazmie białek *GLI1*, *GLI2* i *GLI3*. Powstałe w tym procesie fragmenty proteinowe dostają się do jądra komórkowego i kontrolują proces proliferacji komórkowej [91].

W prawidłowo funkcjonującej ścieżce sygnalizacyjnej stymulacja białka *SMO* pod wpływem SHH wzmacnia transkrypcję *PTCH1* poprzez cyklinę B. Efektem tego jest zahamowanie proliferacji komórek w mechanizmie pętli sprzężeń zwrotnych [91].

W warunkach patologicznych cytoplazmatyczne czynniki *GLI* nie ulegają rozszczepieniu, tylko przedostają się do jądra komórkowego i pobudzają geny odpowiedzialne za nieograniczoną proliferację komórek na drodze mitotycznej. Proces

nieprawidłowej aktywacji białka SMO może przebiegać dwukierunkowo. Z jednej strony może być wynikiem mutacji inaktywujących w genie *PATCHED*, z drugiej natomiast mutacji typu *gain of function* genu SMO. W tym ostatnim przypadku dochodzi do konstytutywnego pobudzania białka SMO. Oprócz opisanych tutaj mechanizmów, wynikających z zaburzenia procesów regulacyjnych, stwierdza się również stałą błonową nadekspresję białka SHH, które kieruje komórki nowotworowe do wejścia na drogę nieopohamowanej proliferacji [83,90,92].

W NMSC specyficzne połączenie SHH z receptorem PTCH1 prowadzi do nadmiernej stymulacji sygnałów jądrowych, w tym głównie SMOOTHENED. Dodatkowo w wyniku interakcji wspomnianego liganda z receptorem PTCH1 następuje wzmożona ekspresja jądrowych czynników transkrypcyjnych typu palce cynkowe (*zinc finger*) z rodziny GLI, w tym GLI1, GLI2 oraz GLI3 [93].

Jak wiadomo białko PTCH1 jest w stanie zahamować rozwój nowotworów skóry, a zaburzenie jego funkcjonowania odgrywa kluczową rolę w indukcji procesu powstawania nowotworu. Potwierdzono udział zaburzeń PTCH1 w zębopochodnych guzach NBCCS [94].

Ponadto udowodniono, że uszkodzenie *PTCH1* pod wpływem promieniowania UV-B prowadzi do zwiększonej ekspresji białek cyklu komórkowego, m.in. cykliny B i cykliny D – co potwierdza znaczenie promieniowania UV w etiologii powstawania nowotworów skóry [93].

W warunkach fizjologicznych białko PTCH1 pełni funkcję negatywnego regulatora przejścia komórki z fazy  $G_1$  do S oraz  $G_2$  do M i hamuje przebieg cyklu komórkowego wydłużając czas naprawy zaistniałych uszkodzeń w materiale genetycznym. W ten sposób zapobiega on kumulacji powstałych błędów i chroni organizm przed rozwojem nowotworu. Osobliwością komórek stransformowanych nowotworowo jest nadekspresja genu *PATCHED* i zaburzenie regulacji szlaku transdukcji sygnału na drodze ścieżki sonic Hedgehog. W okresie prenatalnym zjawisko to jest pozytywne, gdyż ma istotne znaczenie w procesie powstawania i kształtowania się nowego organizmu, tymczasem w sytuacji patologicznej predysponuje do rozwoju i progresji procesu powstawania nowotworu [83].

#### 1.2.3.4.4. Rola cykliny D1 w patomechanizmie raka podstawnocomórkowego

W patogenezie powstawania nowotworów, w tym raka podstawnocomórkowego istotną rolę odgrywa zaburzenie ekspresji białek kontrolujących poszczególne fazy cyklu komórkowego [95]. Wystąpienie mutacji w genach kodujących jednostki regulatorowe cyklinozależnych kinaz serynowo-treoninowych (CDK), w tym głównie cykliny D1, cykliny A oraz cykliny B1, jest ważnym czynnikiem prowadzącym do destabilizacji genetycznej komórki, a tym samym do nieograniczonej proliferacji [96]. Cyklina D1 jest białkiem jądrowym, które aktywuje kinazy CDK4 i CDK6

w późnej fazie  $G_1$  cyklu komórkowego. Utworzenie kompleksu cyklina D1-CDK4/6 prowadzi do fosforylacji P53 i PRB oraz zwiększenia ekspresji czynnika transkrypcyjnego E2F. Efektem tego jest przejście komórki z fazy  $G_1$  do fazy S cyklu komórkowego. Amplifikacja genu *PRAD* (*CCND1*) kodującego cyklinę D1 powoduje skrócenie fazy  $G_1$  i odgrywa kluczową rolę w inicjacji procesu kancerogenezy [95].

Nadekspresję cykliny D1 stwierdzono w większości przypadków NMSC, co wskazuje na jej istotne znaczenie w rozwoju i progresji raka podstawnocomórkowego. Potwierdzeniem tej teorii mogą być badania przeprowadzone przez Lianga i wsp. [95], którzy wykazali obecność komórek cyklino D1-dodatnich w 54,3% przypadków BCC. Dodatkowo potwierdzona została dodatnia korelacja pomiędzy nasileniem jej ekspresji a stopniem agresywności raka podstawnocomórkowego. Cyklina D1 uznana została za marker złośliwości guza BCC [95].

W badaniach ekspresji cyklin w odmianie powierzchniowej i guzkowej BCC, stwierdzono znaczące nasilenie cykliny D1(+) w bioptatach pobranych od osób chorujących na odmianę powierzchniową BCC. Może to świadczyć o nasileniu uszkodzeń naturalnych mechanizmów naprawczych w postaci powierzchniowej BCC oraz odmiennym mechanizmie powstawania obu typów histopatologicznych raka podstawnocomórkowego [95].

Cyklina D1 odpowiada nie tylko za namnażanie się komórek i stymulację wzrostu guza, ale bierze również udział w naprawie uszkodzeń materiału genetycznego komórki nowotworowej spowodowanych np. promieniowaniem jonizującym, czy też zastosowaną chemioterapią. Wykazano, że mechanizm tego działania polega na bezpośrednim oddziaływaniu cykliny D1 z białkami usuwającymi zaistniałe nieprawidłowości w materiale genetycznym komórki. Ich aktywacja prowadzi do zmniejszenia wrażliwości tkanki guza na zastosowane leczenie, w tym powszechnie stosowaną radioterapię. Odkrycie tej istotnej właściwości cykliny D1 może pomóc w zwalczaniu wielu nowotworów, w tym raka podstawnocomórkowego skóry. Substancje hamujące aktywność cykliny D1 są obecnie na etapie badań klinicznych [97].

W warunkach fizjologicznych cyklina A jest niezbędna do przejścia komórki przez fazę S cyklu komórkowego. Białko to łącząc się z CDK2 steruje przebiegiem syntezy DNA. Cyklina B1 wywiera istotny wpływ na fazę  $G_2$ , w której aktywny kompleks cyklina B1/CDK1 jest odpowiedzialny za rozpad otoczki jądrowej, kondensację chromosomów i organizację wrzeciona podziałowego, a tym samym pełni rolę czynnika promującego mitozę [95]. Zarówno w przypadku czerniaka, rogowacenia kolczystokomórkowego, raka kolczystokomórkowego i w chorobie Bowena wykazano zwiększoną ekspresję cykliny A i B1 [96,98].

#### 1.2.3.4.5. Rola ekspresji podjednostki *hTR* genu telomerazy w patomechanizmie raka podstawnokomórkowego

Telomeraza jest enzymem odpowiedzialnym za przeciwdziałanie starzeniu się komórek, nieograniczoną proliferację oraz nieśmiertelność. Białko to składa się z domeny odwrotnej transkryptazy (hTERT) i nici RNA (Herc/hTR). Nici RNA pełni rolę matrycy przy syntezie nowych końców chromosomu i warunkuje ekspresję oraz aktywność telomerazy [99].

Badania przeprowadzone w biopatach skórnych pobranych od pacjentów chorych na raka podstawnokomórkowego i kolczystokomórkowego wykazały zależność pomiędzy zwiększoną ekspresją podjednostki *hTR*, a rozwojem tych raków skóry. Dodatkowo udowodniono, że wzmożona aktywność transkrypcyjna *hTR* koreluje ze złośliwością tych guzów. Badania wykazały, że wyższy poziom ekspresji genu *hTR* w komórkach raka kolczystokomórkowego jest odpowiedzialny za większą stymulację telomerazy w porównaniu z rakiem podstawnokomórkowym. Można zatem podejrzewać, że nadekspresja genu *hTR* odgrywa ważną rolę w powstawaniu bardziej złośliwego fenotypu raka skóry [100].

#### 1.2.3.4.6. Rola ekspresji białka KI-67 i $\beta$ kateniny w patomechanizmie raka podstawnokomórkowego

Przeciwciała monoklonalne KI-67 jest białkiem jądrowym, którego obecność stwierdza się we wszystkich fazach cyklu komórkowego. Ekspresja KI-67 w komórce wzrasta począwszy od fazy  $G_1$  i osiąga maksymalny poziom w fazie  $G_2$  i M. Wyjątek stanowi faza spoczynku  $G_0$ , w której nie wykazano obecności tego białka. KI-67 może być zatem markerem służącym do oznaczania tempa wzrostu i progresji nowotworu [87].

Badania dotyczące udziału białka KI-67 wskazują na znaczny wzrost ekspresji tego białka w BCC, sięgający nawet 80% przypadków [101]. Zwiększony poziom KI-67 wykazuje silną korelację ze stopniem złośliwości postaci powierzchniowej i guzkowej BCC, co stanowi dowód istotnej roli KI-67 w patogenezie raka podstawnokomórkowego skóry [87].

Podobne badania dotyczyły  $\beta$ -kateniny, która w prawidłowych komórkach naskórka zlokalizowana jest w błonie komórkowej.  $\beta$ -katenina wiąże się z domeną cytoplazmatyczną E-kadheryny, przez co odgrywa główną rolę w adhezji komórkowej [102].

Oprócz tego kompleks tych dwóch cząsteczek bierze udział w przekazywaniu sygnałów międzykomórkowych uczestniczących w procesie onkogenezy. Zaburzenia ekspresji tego kompleksu mogą być związane z progresją raka podstawnokomórkowego oraz przyczyniają się do nasilenia aktywności migracyjnej komórek i zdolności BCC do tworzenia przerzutów [103].

Rodzaj ekspresji  $\beta$ -kateniny zależy od typu histopatologicznego raka podstawonokomórkowego. W odmianie twardzinopodobnej i naciekającej stwierdzono brak ekspresji błonowej tego białka z jednoczesną obecnością  $\beta$ -kateniny w jądrze komórkowym, co skutkuje większą inwazyjnością i proliferacją tych postaci guza. W praktyce klinicznej rzeczywiście są one uważane za bardziej agresywne, co potwierdza prawdziwość uzyskanych wyników. Ekspresja  $\beta$ -kateniny w postaci powierzchniowej i guzkowej BCC nie wykazuje różnic, co prawdopodobnie wiąże się z mniejszą inwazyjnością obu tych postaci BCC [80,103].

#### 1.2.3.4.7. Rola COX-2 w patomechanizmie raka podstawonokomórkowego

Cyklooksygenazy to grupa enzymów katalizujących syntezę prostaglandyn. Znałe są dwie główne izoformy cyklooksygenazy: COX-1 i COX-2, ale potwierdzona została także obecność tzw. formy mózgowej COX-3. COX-1 jest syntetyzowana konstytutywnie, gen dla tego białka zlokalizowany jest na chromosomie 9. COX-2 jest enzymem indukowanym (często przez czynniki prozapalne i proonkogenne), lecz w niektórych tkankach może występować konstytutywnie. Ekspresja COX-2 ma miejsce w: nabłonku oskrzeli, ośrodkowym układzie nerwowym, w macicy, komórkach stopowatych w nefronie i śródbłonku naczyń nerkowych. Aktywność tej izoformy powoduje obniżenie poziomu bólu związanego z reakcjami zapalnymi [104,105].

COX-2 jest obecna zarówno w zdrowej skórze, w łagodnych rozrostach naskórka a także w nowotworach złośliwych skóry [69]. COX-2 ulega ekspresji również w innych rodzajach nowotworów, a poziom ekspresji, koreluje z ich inwazyjnością. Fakt ten wskazuje na to, że COX-2, ulegająca ekspresji w komórkach nowotworowych, spełnia istotną rolę zarówno w rozwoju, jak i progresji guza [106,107,108,109].

Promieniowanie UVB powoduje zwiększoną syntezę prostaglandyny E2 (PGE2) oraz zwiększoną ekspresję COX-2 [110]. Przewlekła aktywacja komórek zapalnych zwiększa syntezę mediatorów w trakcie reakcji zapalnej. Jednym z takich mediatorów jest właśnie COX-2, która katalizuje syntezę cytokin zapalnych i prostaglandyn. COX-2 może również hamować komórkowo zależną odpowiedź immunologiczną i promować angiogenezę [110]. Wykazano, że poziom ekspresji COX-2 koreluje z angiogenezą w różnych typach BCC [45,86,111]. Badano związek pomiędzy ekspresją COX-2 a ekspresją białka P53 [112,113] i uzyskano sprzeczne wyniki. Kim i wsp. [113] twierdzą, że ekspresja COX-2 nie koreluje z ekspresją P53, natomiast Chen i wsp. [112] wykazali korelację pomiędzy tymi białkami. Wyższy poziom ekspresji COX-2 jest związany zarówno z tworzeniem nowych naczyń, jak i z głębokością naciekania raka BCC [114]. Wykazano również, że makrofagi związane z BCC mogą aktywować COX-2, co zwiększa inwazję i angiogenezę. Udowodniono, że zahamowanie syntezy prostaglandyny E2 przez inhibitory COX-2 i niesteroidowe

leki przeciwzapalne, częściowo zapobiega nowotworom skóry indukowanym przez promieniowanie UV [115].

Rola COX-1 i COX-2 w patogenezie BCC została opisana na mysim modelu, a potem także w badaniach klinicznych u ludzi [116]. Ekspresja COX-2 jest istotnie wyższa w naciekającym typie BCC w porównaniu z guzkowym i powierzchniowym. Ponadto, ekspresja COX-2 jest istotnie wyższa w nawracających BCC w porównaniu do pierwotnych raków BCC typu naciekającego, co sugeruje związek z agresywnym fenotypem raka [57]. Wykazano, że ekspresja COX-2 różni się w tkance zdrowej i zmienionej nowotworowo w przebiegu BCC. Można zatem sugerować, że COX-2 mogłoby posłużyć jako marker odróżniający tkankę guza od tkanki zdrowej przy zabiegu chirurgicznym usunięcia guza BCC [57,117].

#### **1.2.3.4.8. Rola apoptozy w rozwoju raka podstawnocomórkowego**

Zaburzenie procesu apoptozy ma ważne znaczenie w inicjacji i dalszym rozwoju nowotworu. Aktywność apoptozy w nowotworach nie stanowi czynnika różnicującego złośliwość nowotworu [118]. Jednak w przypadku agresywniejszej formy raka podstawnocomórkowego proces apoptozy wykazuje większą intensywność (BCC2) niż w formie łagodniejszej (BCC1). Potwierdziły to analizy dotyczące ekspansywności obu tych postaci raka podstawnocomórkowego. Wykazały one, że niski wskaźnik apoptozy w formie łagodniejszej przekłada się na pozytywny wskaźnik prognostyczny regresji choroby [118].

#### **1.2.3.4.9. Angiogeneza w rozwoju i progresji raka podstawnocomórkowego**

Angiogeneza jest niezwykle ważnym zjawiskiem w rozwoju i progresji raka podstawnocomórkowego. Najlepiej poznanym genem biorącym udział w tym procesie jest gen *P53*. Powstanie mutacji w *P53* prowadzi do wystąpienia fenotypu angiogenego w komórkach nowotworowych, czego efektem jest zablokowanie aktywności kodowanego przez niego białka. Zniesienie funkcji supresorowej *P53* wpływa destabilizująco na czynnik wzrostu śródbłonka VEGF oraz trombospondynę-1 [119].

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego jest jednym z najważniejszych czynników proangiogennych. Gen *VEGF* znajduje się na chromosomie 6 i składa się z 8 eksonów oraz 7 intronów [120]. Koduje on zasadową homodimeryczną glikoproteinę, będącą mediatorem podziałów mitotycznych śródbłonka naczyń tętniczych, żylnych i limfatycznych. Wykazano, że istnieje co najmniej pięć izoform tej cytokiny; są to: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i VEGF-E. Czynniki A, B, E oraz PGF uczestniczą w tworzeniu naczyń krwionośnych, natomiast pozostałe biorą udział w powstawaniu naczyń limfatycznych. Wszystkie izoformy VEGF związane są przez trzy specyficzne receptory: VEGFR-1, VEGFR-2 oraz VEGFR-3 [121].

Wykazano, że w tkance nowotworowej kluczową rolę w procesie angiogenezy odgrywa FGF-b. Oprócz wymienionych wcześniej funkcji, czynnik ten stymuluje również proliferację i migrację fibroblastów oraz zwiększa zawartość kolagenu, proteoglikanów, a także kwasu hialuronowego w guzie. Proteoglikany razem z aktywowanymi przez FGF-b integrzynami i kadherynami, są niezbędnymi składnikami potrzebnymi do tworzenia nowych naczyń krwionośnych.

Po związaniu się receptorów VEGFR i FGFR ze swoimi ligandami dochodzi do aktywacji enzymów proteolitycznych – metaloproteinaz (MMPs). Enzymy te prowadzą do degradacji błony podstawnej umożliwiając migrację komórek śródbłonna. W kolejnym etapie angiogenezy biorą udział integryny  $\alpha$  i  $\beta$ , które ułatwiają adhezję i migrację komórek śródbłonna [20]. W następnej fazie angiogenezy zachodzi proliferacja komórek śródbłonna z wytworzeniem rurkowatych struktur naczynia krwionośnego. Na samym końcu następuje dojrzewanie komórek śródbłonna, stabilizacja naczynia zachodząca przy udziale angiopoetyny-1 oraz modulowana przez płytkowy czynnik wzrostu (PDGF-BB) rekrutacja komórek przydanki [122].

W rozwoju raka podstawnokomórkowego podkreśla się rolę dwóch mechanizmów. Pierwszy z nich indukuje VEGF-zależną angiogenezę w wyniku mutacji onkogenów i genów supresorowych. W tym przypadku najważniejszą rolę odgrywa gen *P53* [122]. Świadczą o tym badania, w których udowodniono, że wprowadzenie do komórek nowotworowych prawidłowej wersji genu *P53* uniemożliwia ekspresję genu *VEGF* [81]. Wynika to z faktu, że dzikie białko *P53* jest represorem transkrypcji czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego.

Następnym kierunkiem działania zmutowanej formy *P53* jest zniesienie aktywności genu trombospondyny-1, wielofunkcyjnej glikoproteiny występującej w macierzy pozakomórkowej. W warunkach fizjologicznych białko to wpływa hamująco na proliferację i migrację komórek śródbłonna naczyń. W przypadku zmniejszenia poziomu dzikiego białka *P53*, ilość trombospondyny-1 także maleje. Zahamowanie syntezy trombospondyny-1 przyczynia się do stymulacji podziałów komórek naczyń leżących w pobliżu guza i pobudza ekspresję genów kodujących hormony, czynniki wzrostu oraz interferony. Pod wpływem wymienionych powyżej przemian następuje wzmożona angiogeneza, co umożliwia szybki wzrost tkanki nowotworowej i tworzenie nacieków [119,122].

W regulacji transkrypcji genu *VEGF* w komórkach nowotworowych ważną rolę odgrywa również hipoksja, podczas której dochodzi do syntezy czynnika indukowanego hipoksją (HIF-1). Białko to składa się z podjednostek alfa i beta [121]. Gdy ilość tlenu w tkankach jest prawidłowa, czynnik ten jest nieaktywny, gdyż jego podjednostka alfa jest degradowana w komórce na drodze ubiquityzacji. Mechanizm ten polega na hydroksylacji proliny 402 i 554 podjednostki alfa, dzięki czemu może przyłączyć się w to miejsce białko von Hippel-Lindau (VHL) będące produktem genu supresorowego *VHL*. Do powstałego w ten sposób kompleksu dołącza się na-



stępnie cząsteczka ubikwityny. Przy niedoborze tlenu w guzach nowotworowych przebieg opisanego tu procesu jest zaburzony, ponieważ HIF- $\alpha$  nie jest degradowany na drodze ubikwitynizacji. Podjednostka ta dostaje się do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z podjednostką beta i tworzy aktywną formę czynnika transkrypcyjnego. W tym etapie dochodzi do indukcji transkrypcji genu *VEGF*. W komórkach nowotworowych stwierdza się także mutację supresorowego genu *VHL*. Kodowane przez niego białko nie przyłącza się do HIF- $\alpha$ , co również powoduje pobudzenie genu *VEGF* [121].

Do niedawna wiadomo było, że VEGF w drodze interakcji ze swoimi receptorami stymuluje komórki śródbłonna do proliferacji i tworzenia nowych naczyń krwionośnych [121]. Ostatnie badania przebiegu tego procesu dostarczyły nowych informacji na temat mechanizmów, dzięki którym VEGF ma możliwość regulacji wzrostu tkanki nowotworowej [120]. Ma to związek z odkryciem nowego receptora dla VEGF, neuropiliny-1. Wykazano, że czynnik na skutek związania się ze swoimi receptorami ma wpływ na zwiększenie masy guza, dzięki dostarczeniu poprzez powstałe naczynia krwionośne substancji odżywczych, tlenu oraz czynników wzrostu. Czynnik ten dzięki specyficznemu oddziaływaniu z neutrofiliną-1 stymuluje podziały komórek macierzystych naskórka, inicjując tym samym rozwój raka podstawnokomórkowego. Oprócz tego neuropilina-1 łącząc się z wydzielanym przez komórki macierzyste guza VEGF powoduje nasilenie ich aktywności. Konsekwencją tego jest promowanie proliferacji komórek oraz jeszcze większy wzrost guza. Przedstawione tu prawidłowości mogą mieć w przyszłości istotne znaczenie dla leczenia raka podstawnokomórkowego skóry [77,120].

#### 1.2.3.5. Diagnostyka raka podstawnokomórkowego

Rak podstawnokomórkowy skóry zazwyczaj bywa rozpoznany w czasie badania podmiotowego pacjenta. Makroskopowa ocena guza, badanie dermatoskopem, połączone z wywiadem, dają trafne rozpoznanie w większości przypadków. Poprawność postawionej diagnozy potwierdza zawsze diagnostyka histopatologiczna, która jednocześnie pozwala wybrać schemat dalszego sposobu leczenia. Ciągłe jeszcze spotykane są przypadki zaawansowanych postaci BCC, zmian obecnych od wielu lat, a wówczas niezbędne jest uzupełnienie diagnostyki o badania obrazowe, takie jak zdjęcia RTG, tomografia komputerowa czy rezonans magnetyczny, pozwalające na ocenę stopnia destrukcji przyległych tkanek [52].

#### 1.2.3.6. Leczenie raka podstawnokomórkowego

Możliwości leczenia nowotworów skóry są większe niż w przypadku nowotworów narządów wewnętrznych. W wyborze metody brane są pod uwagę takie czynniki jak: odmiana histopatologiczna, umiejscowienie, wielkość guza i głębokość nacieku,

stopień zajęcia tkanek przylegających do zmiany oraz ogólny stan chorego. Brane są również pod uwagę takie czynniki jak zachowanie funkcji leczonej części ciała, możliwy do osiągnięcia efekt kosmetyczny oraz koszt leczenia [68,123].

Biorąc pod uwagę stopień zaawansowania BCC stosuje się metody bardziej lub mniej inwazyjne. Do bardziej radykalnych metod należy resekcja guza oraz chirurgia kontrolowana mikroskopowo Mohsa, co umożliwia histopatologiczną ocenę guza [59,124,125,126], a także kriochirurgię, łyżeczkowanie z kauteryzacją (elektrodesykacją) i laseroterapię.

Metody te są oparte na wycięciu lub zniszczeniu zmiany. Do metod zachowawczych leczenia BCC zalicza się radioterapię, terapię fotodynamiczną (miejscową fotochemioterapię) i immunoterapię [68]. Możliwa jest również miejscowa farmakoterapia z zastosowaniem preparatów zawierających Imiquimod lub 5-fluorouracyl, a także farmakoterapia doustna z zastosowaniem Vismodegibu [127,128,129]. Każda z metod daje dobre efekty terapeutyczne, jednak najczęściej zalecaną metodą jest usunięcie chirurgiczne (najefektywniej techniką Mohsa). Dzięki tej metodzie możliwe jest określenie marginesu zdrowej tkanki, co minimalizuje ryzyko nawrotu nowotworu [46,68,124]. W dużej liczbie przypadków leczenie chirurgiczne lub radioterapia są w stanie zapewnić zadowalające efekty leczenia. Ciągłe jednak poszukiwane są nowe metody leczenia wykorzystujące podłoże molekularne rozwoju raka BCC.

Chirurgia onkologiczna to najbardziej uniwersalna metoda leczenia raka podstawnomórkowego skóry. Znajduje ona zastosowanie w przypadku ognisk pierwotnych BCC o wielkości poniżej 3 cm, natomiast nie może być stosowana w celu usunięcia guzów nawrotowych. Metoda ta polega na resekcji guza z marginesem tkankowym różnej wielkości, przeciętnie od 3 do 4 mm. W przypadku BCC o wysokim ryzyku wznowy, margines ten powinien być większy, zwykle wynosi on 5-6 mm. Wykonana za pomocą mikroskopu weryfikacja pobranego wycinka tkanki nowotworowej umożliwia zastosowanie właściwej techniki zabiegu operacyjnego. Badanie histologiczne wykonane śródoperacyjnie umożliwia ocenę resekcji guza. Natomiast ocena mikroskopowa usuniętej zmiany po zabiegu pozwala potwierdzić typ guza i kompletność resekcji [49]. Po zastosowaniu chirurgii onkologicznej regresja choroby u pacjentów z BCC wynosi 90%, a przy guzach o średnicy poniżej 2 cm nawet 98% [49,59,130,131]. W przypadku szczególnie dużych, naciekających guzów BCC stosowane są chirurgiczne wycięcia wraz z rekonstrukcją [46].

Metodą charakteryzującą się bardzo dużą skutecznością oraz niską częstością nawrotów jest chirurgia mikrograficzna Mohsa (MMS) [125]. Technika ta została opracowana w 1941 roku przez Fryderyka Mohsa i do tej pory daje najlepsze wyniki w usuwaniu nowotworów skóry. Zabieg wykonany tą metodą zapewnia pełną kontrolę histopatologiczną obrzeża usuniętej zmiany nowotworowej oraz całkowitą resekcję guza, przy minimalnym ubytku zdrowych tkanek i jest traktowany jako

postępowanie z wyboru, szczególnie przy guzach o agresywnym wzroście, dających duże prawdopodobieństwo nawrotu. Efekty takie uzyskuje się dzięki delikatnemu wylęczkowaniu guza, a następnie wycięciu tkanki guza bez uszkodzenia prawidłowej tkanki, którą natychmiast bada się pod mikroskopem, w celu wykazania braku ognisk mikroinwazji. Chirurgia według Mohsa zarezerwowana jest dla resekcji trudnych postaci nowotworów, w krytycznych umiejscowieniach (nos, powieki, małżowina uszna, wargi, palce, narządy płciowe), w nawrotach, po zastosowaniu radioterapii, a także kiedy konieczna jest reoperacja po nieskutecznym zabiegu chirurgicznym. Według danych okres 5-letniej wyleczalności, bez widocznej wznowy wynosi powyżej 95% [49], a niektóre źródła mówią nawet o 99% [130]. Niestety pomimo podanych tutaj zalet chirurgia mikrograficzna Mohsa jest metodą bardzo powolną, żmudną i wymagającą dużego doświadczenia osoby wykonującej zabieg. Ponadto zastosowanie tej techniki wiąże się z bardzo dużymi kosztami, dlatego wiele ośrodków nie ma warunków do jej stosowania [49,59,132].

Najczęściej wykorzystywanym zabiegiem po chirurgicznym wycięciu zmiany jest elektrokoagulacja lub łyżeczkowanie z kauteryzacją (elektrodesykacją) (*curatage and electrodesiccation*). W pierwszym etapie tego zabiegu guz usuwa się w znieczuleniu ogólnym za pomocą ostrego narzędzia, z marginesem od 2 do 4 mm prawidłowej tkanki. Następnie dzięki zastosowaniu metody kauteryzacji dochodzi do zniszczenia głębiej położonych warstw skóry do około 1mm. W zależności od wielkości guza schemat ten powtarza się do trzech razy. Metoda łyżeczkowania z elektrodesykacją należy do bardzo skutecznych, a wyleczalność pacjentów, przy zastosowaniu tej metody, chorujących na raka podstawnkomórkowego skóry, waha się w granicach od 90 do 98% [124].

W usunięciu zmian nowotworowych raka podstawnkomórkowego stosuje się również należącą do technik ablacyjnych kriochirurgię. Metoda ta polega na zastosowaniu ciekłego azotu w celu zamrożenia, a następnie samoistnego odmrożenia docelowej tkanki guza. Aplikacja ciekłego azotu ma na celu wytworzenie, w tkance guza i w marginesie zdrowej tkanki, temperatury od  $-50^{\circ}\text{C}$  do  $-60^{\circ}\text{C}$ . Ciekły azot jest dozowany z odległości 1–3 cm od ogniska chorobowego. Znaczne różnice w ilości wykonywanych zabiegów oraz czasie ich trwania związane są z głębokością guza, jego wielkością oraz szybkością pojawienia się specyficznej otoczki na obwodzie zmiany nowotworowej (tzw. efekt *halo*). Kriochirurgia wykorzystywana jest najczęściej w leczeniu guzów BCC o niskim prawdopodobieństwie nawrotu. Kriochirurgia należy do terapii charakteryzujących się wysokim stopniem wyleczalności, który sięga nawet 99% u pacjentów z rakiem podstawnkomórkowym. Wadą tej metody jest powstawanie pozapalnych zmian barwnikowych i hipertroficznego rogowacenia tkanki w rejonie poddanym kriochirurgii. Bezpośrednio po zabiegu tworzy się także wypełniony osoczem pęcherz, który znika po tygodniu, niemniej jest bardzo bolesny [49,59,132]. Obie te metody nie

dają jednak możliwości histopatologicznej oceny zmiany, zatem konieczne jest wcześniejsze badanie histopatologiczne, celem potwierdzenia typu guza i kwalifikacji do wykonania powyższych metod [52].

Laseroterapia jest metodą rzadko stosowaną, można ją bowiem stosować jedynie do usuwania guzów o niewielkich rozmiarach, zlokalizowanych powierzchownie. Istotna jest wcześniejsza ocena histopatologiczna, aby wykluczyć prawdopodobieństwo nawrotu nowotworu związane z nieprawidłowym rozpoznaniem typu guza. Nie jest możliwe wykonanie ablacji laserem przy zlokalizowaniu guza na powiekach i w okolicy oczu [12].

Radioterapia jest metodą leczenia zalecaną u tych pacjentów, którzy nie mogą poddać się operacji z powodu złego stanu zdrowia (choroby serca, zaburzenia krzepialności krwi) lub podeszłego wieku. Metoda ta jest szczególnie polecana w przypadku guzów w centralnej części twarzy, w obrębie nosa, warg i powiek. Usunięcie chirurgiczne takich guzów wiąże się z poważnymi defektami kosmetycznymi i koniecznością zastosowania dodatkowych zabiegów rekonstrukcyjnych. Wskazaniem do radioterapii pooperacyjnej są zdiagnozowane pozytywne marginesy, a także naciek guza do chrząstek, kości i mięśni oraz zajęcie nerwów. Leczenie za pomocą radioterapii polega na napromieniowaniu zmian nowotworowych promieniowaniem jonizującym i efektywnym ich zniszczeniu. Istnieje kilka różnych technik takiego działania. Główne z nich to teleradioterapia (radioterapia zewnętrznymi wiązkami promieniowania – EBRT) i brachyterapia (BT). W teleradioterapii efekt terapeutyczny uzyskiwany jest dzięki zastosowaniu promieniowania cząstkowego lub fotonowego pochodzącego z przyspieszaczy liniowych, gammatronów, cyklotronów lub betatronów. Tymczasem brachyterapia polega na napromieniowaniu tkanki guza przez wykorzystanie promieniowania cząstkowego lub fotonowego, którego źródłem jest rozpad izotopów promieniotwórczych. Izotopy te mogą być umieszczone wewnątrz guza (brachyterapia śródtkankowa) lub w jego sąsiedztwie (brachyterapia kontaktowa). W zależności od zastosowanej metody radioterapii oraz stanu chorego istnieje wiele różnych schematów leczenia raka podstawnokomórkowego skóry. Najczęściej terapię prowadzi się w 10-frakcjonowanych dawkach po 50–60 Gy przez 4–8 tygodni. Dobry efekt kosmetyczny uzyskuje się natomiast przy zastosowaniu radioterapii w dawkach frakcyjnych 2–3 Gy [133].

Powikłania radioterapii są zależne od wielkości zmiany nowotworowej, może to być martwica tkanek miękkich, która rozwija się u 5% chorych poddanych radioterapii, martwica kości natomiast pojawia się u 1% chorych leczonych tą metodą [134]. Możliwe są również takie powikłania jak atrofia i występowanie przebarwień skóry, a także teleangiektazje [133]. Wyniki obserwacji dla 10-letnich miejscowych wyleczeń raka podstawnokomórkowego, zlokalizowanego w okolicy warg, nosa i powiek wynoszą 98% dla guzów o średnicy poniżej 2 cm, 79% dla guzów o średnicy 2–5 cm, natomiast dla guzów przekraczających 5 cm – 53% [133]. Średni

wskaźnik nawrotów BCC po leczeniu przy użyciu radioterapii wynosi 8,7%, a więc jest wyraźnie większy od wskaźnika dotyczącego terapii Mohsa [49,59,61,135]. Radioterapia nie jest zalecana u chorych poniżej 50. roku życia, ponieważ możliwy jest gorszy efekt kosmetyczny; wzrasta także ryzyko rozwoju guzów indukowanych promieniowaniem jonizującym [133,134].

Oprócz wyżej przedstawionych metod leczenia raka podstawnokomórkowego skóry możliwa jest również terapia fotodynamiczna, która jest szczególnie skuteczna w przypadku odmiany powierzchniowej BCC. Metoda ta nie jest jednak często wykorzystywana ze względu na czasochłonność leczenia i dyskomfort pacjenta z powodu dolegliwości bólowych w czasie naświetlania. W miejscowej fotochemioterapii stosuje się kwas metyloaminolewulinowy [136]. Nie stosuje się tej metody dla guzów o dużych rozmiarach głęboko naciekających. Zaobserwowano większą ilość wznów nowotworu w przypadku fotochemioterapii w stosunku do resekcji chirurgicznej [136].

Od kilku lat stosowany jest silny lek immunomodulujący o nazwie Imiquimod [128,137]. Terapia tym lekiem daje najlepsze rezultaty w leczeniu powierzchniowych postaci BCC [59]. Imiquimod jest preparatem aktywującym cytotoksyczne komórki T przeciwko komórkom nowotworowym, poprzez wiązanie się z powierzchniowym receptorem Toll 7 i/ lub Toll 8 leukocytów [138]. Imiquimod moduluje odpowiedź immunologiczną związaną z działaniem komórek dendrytycznych i monocytów, indukuje interferon  $\alpha$  [52]. Jednak przy zastosowaniu tej metody możliwe jest niepełne wyleczenie i pojawienie się nawrotów nowotworu. Głównymi skutkami ubocznymi odnotowanymi w trakcie 5-letniej terapii były rumień, strupy, ból, objawy grypopodobne i owrzodzenia [138]. W niektórych przypadkach objawy te miały bardzo ciężki przebieg [59,128].

Innym preparatem stosowanym miejscowo w leczeniu raka podstawnokomórkowego skóry jest 5-fluorouracyl. Lek ten należy do antymetabolitów pirymidynowych hamujących syntezę DNA. Obecnie jednak 5-fluorouracyl nie jest zalecany jako lek pierwszego rzutu u pacjentów z BCC [132].

W stadium badań klinicznych są metody oparte na wstrzykiwaniu do tkanki guza interferonu- $\alpha$  2b i interferonu- $\beta$ -1a [139].

Poznanie molekularnych podstaw wzrostu i różnicowania się komórek, apoptozy i inwazji guzów nowotworowych, pozwala na bardzo precyzyjny, oparty na oddziaływaniach cząsteczkowych, wybór leczenia konkretnej zmiany nowotworowej. Poznane mechanizmy zaburzeń szlaków sygnałowych, takich jak szlak EGFR (szlak receptora dla kinazy tyrozynowej) i szlaku Hedgehog są wykorzystywane do opracowania celowanej terapii przeciwnowotworowej [119].

Ze względu na różniczne funkcje, jakie w komórce spełnia EGFR, takie jak aktywacja apoptozy, różnicowania się komórek, naprawy DNA w komórkach, a także adhezji komórkowej i proliferacji komórek nowotworowych, należy sądzić, że

zablokowanie farmakologiczne tego receptora pozwoli na efektywne zahamowanie rozrostu guza [119]. Receptor EGFR może zostać zablokowany przez przeciwciała monoklonalne (cetuksymab, panitumumab, matuzumab), a także przez drobnocząsteczkowe inhibitory kinazy tyrozynowej (TKI) np. gefitinib i erlotinib [119].

W patogenezie raka podstawnocomórkowego występują również mutacje inaktywujące w genie *PATCHED*, co powoduje aktywację białek SMO, które wykazują bardzo dużą aktywność w tych nowotworach złośliwych, w których jest zaangażowany szlak sygnałowy sonic Hedgehog. Preparat GDC-0449, który jest inhibitorem białka SMO stosowany jest jako skuteczny lek w zaawansowanych, nieoperacyjnych postaciach BCC. Preparat GDC-0449 jest testowany klinicznie, ze względu na szereg pozytywnych aspektów, takich jak dobra odpowiedź kliniczna i długi czas utrzymywania się tej odpowiedzi, a także niewielkie działania niepożądane [140,141].

Innym drobnocząsteczkowym inhibitorem szlaku Hedgehog jest Vismodegib [129]. Lek ten, podawany doustnie, jest wskazany do stosowania u dorosłych, u których stwierdzono: objawowego raka podstawnocomórkowego z przerzutami; miejscowo zaawansowanego raka podstawnocomórkowego niespełniającego kryteriów leczenia chirurgicznego lub radioterapii.

Przekazywanie sygnałów szlakiem Hedgehog poprzez białko SMO prowadzi do aktywacji i lokalizacji w jądrze komórkowym czynników transkrypcyjnych GLI oraz indukcji docelowych genów szlaku Hedgehog. Wiele z tych genów odgrywa rolę w proliferacji, przeżyciu oraz różnicowaniu komórek. Vismodegib wiąże się z białkiem SMO i hamuje jego funkcję, tym samym prowadząc do zablokowania transdukcji sygnału przekazywanego szlakiem Hedgehog. Pozwolenie na dopuszczenie do obrotu dla tego preparatu zostało udzielone warunkowo [129].

Przeprowadzono kliniczne próby nastrzykiwania guzów BCC DNAzymem [142]. DNAzym Dz13 jest skierowany specyficznie przeciwko matrycowemu RNA (mRNA) genu *JUN* [143]. DNAzymany są syntetycznymi pojedynczoniowymi oligonukleotydami, wykazującymi aktywność katalityczną [144]. Poprzez komplementarne dopasowanie się, cząsteczki te wiążą i rozszczepiają docelowe mRNA, w obszarach flankujących, co prowadzi do reakcji deestryfikacji [145]. DNAzymany różnią się od rybozymów i małych interferujących RNA tym, że składają się w całości z DNA, a nie RNA i z oligonukleotydów antysensownych, ponieważ zawierają domenę katalityczną. Transgeniczne myszy nie posiadające genu *JUN* nie są narażone na nowotwory skóry [146]. Głównymi regulatorami ekspresji *C-JUN* są GLI1 i GLI2, które są kluczowymi czynnikami transkrypcji w szlaku Hedgehog [145]. Ekspresja *C-JUN* w zdrowych tkankach jest bardzo niska. Ekspresja tego genu znacząco wzrasta w wielu chorobach, a m.in. w guzie BCC, co stanowi właściwe miejsce docelowe dla działania Dz13. Badania przedkliniczne przeprowadzono na myszach, szczurach i małpach w rakach BCC, SCC, czerniaku oraz raku piersi i prostaty. Okazało się, że iniekcja Dz13 do guza BCC była bezpieczna i dobrze tolerowana. Eks-

presja *C-JUN*, który jest podstawowym celem Dz13 [147], ulega obniżeniu w guzie podstawukomórkowym, zmniejsza się też głębokość guza, zwiększa się ekspresja kaspaz 3, 8, 9 i P53, a ekspresja *BCL 2* obniża się. Ocena farmakodynamiczna wykazała, że ekspresja kilku czynników, które są kandydatami na biomarkery BCC (np. VEGF-A, FGF-2, MMP-2 i MMP-9) została zmniejszona przez iniekcję Dz13 do guza BCC. Geny tych biomarkerów są regulowane przez *C-JUN* i inne AP-1. Wzrosła również ilość komórek w bezpośrednim sąsiedztwie guza, które są związane z odpowiedzią przeciwzapalną i immunologiczną [143].

W aspekcie podjęcia odpowiedniego leczenia pacjentów z BCC szczególnie ważna jest właściwa diagnostyka. W obrazie histopatologicznym rozpoznawane są często zróżnicowane komórki nowotworowe. Niejednorodność komórek tworzących ogniska przerzutów nowotworowych, zróżnicowane umiejscowienie, czy wielkość zmian, determinuje wybór metody leczenia BCC. Zmiany pozostające poza czułością dostępnych metod diagnostyki obrazowej często towarzyszą rozsiały zmianom nowotworowym, a nierozpoznane przyczyniają się do opóźnionej diagnozy, niewłaściwego leczenia i ostatecznie zwiększonej umieralności wśród pacjentów onkologicznych [51].

Istotne zatem jest poszukiwanie czynników promujących powstawanie przerzutów. Markerami inwazyjności, mającymi udział w procesie metastazy, są m.in. metaloproteiny (MMPs). Dowiedzione różnice w zakresie aktywności MMPs pomiędzy tkankami zmienionymi nowotworowo a tkankami prawidłowymi [148]. Wyniki tych obserwacji stały się punktem wyjścia do wyboru nowych testów molekularnych, obejmujących enzymy proteolityczne jako markery zmian nowotworowych. Badania te prowadzone są pod kontrolą badań histopatologicznych. Dzięki takiemu działaniu możliwe stanie się stworzenie systemu klasyfikacji zmian histopatologicznych, obejmującego również zmiany molekularne, dotyczące ekspresji mRNA dla MMPs, a także ekspresji białek oraz aktywności MMPs. Poprawi to znacząco jakość odróżnienia tkanki guza od tkanki prawidłowej, co pozwoli na dobranie właściwej terapii, dzięki czemu nastąpi zmniejszenie ilości wznów nowotworowych [57]. Precyzja określenia marginesu ma szczególne znaczenie dla zmian rozwijających się w miejscach o lokalizacji uniemożliwiającej reoperowanie wznawiającej się zmiany nowotworowej.

### 1.3. Metaloproteiny macierzy pozakomórkowej

Metaloproteiny (MMPs) są rodziną zależnych od cynku endopeptydaz zdolnych do przebudowy i degradacji białek przestrzeni pozakomórkowej (ECM) i błony podstawnej naczyń [149]. Jako pierwszy enzym z rodziny metaloproteinaz została

wyizolowana kolagenaza typu I (MMP-1). Wysoki poziom ekspresji MMP-1 stwierdzono w tkankach kijanki północnoamerykańskiego gatunku żaby *Rana catesbiana*. Obecność MMP-1 stwierdzono w ogonie, skórze, jelitach i skrzelach kijanki [150]. W tkankach tych zachodzą szybkie procesy przebudowy macierzy pozakomórkowej [151]. Struktura pierwszorzędowa ludzkiej kolagenazy typu I (MMP-1), syntetyzowanej przez fibroblasty, została określona, dzięki zastosowaniu metody klonowania cDNA [152].

Klasyfikacja metaloproteinaz obejmuje obecnie 24 odrębne białka enzymatyczne, z których 23 występują w organizmie ludzkim [149]. W genomie człowieka znajduje się zatem 24 geny kodujące enzymy z grupy metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej, przy czym gen MMP-23 występuje w wersji podwójnej [153,154].

MMPs syntetyzowane są przez większość komórek organizmu, w tym leukocyty, makrofagi, komórki śródbłonna, monocyty, granulocyty obojętnochłonne, keratynocyty, fibroblasty, a w warunkach patologicznych także przez komórki nowotworowe. W warunkach fizjologicznych sekrecja enzymów z komórek pobudzana jest między innymi poprzez fagocytozę, czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), interleukinę 1 (IL-1), a także prostaglandyny D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub> $\alpha$ . Wydzielanie MMPs hamowane jest natomiast m.in. poprzez transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) oraz hormony steroidowe [155,156].

Geny MMPs wykazują wysoce konserwatywną strukturę. Geny kolagenaz MMP-1, -8, -13 oraz stromielizyn: MMP-3, 10, składają się z 10 eksonów oraz 9 intronów. Łączna długość tych genów wynosi od 8 do 12 kbp. Geny MMP-2 oraz MMP-9 charakteryzują się większą długością, ponieważ posiadają 3 dodatkowe eksony kodujące domeny typu fibronektyny II, budowane są zatem przez 26–27 kbp. MMP-9 posiada wydłużony region zawiasowy, który kodowany jest w całości przez ekson 6. Natomiast geny MMP-7 i -26 są krótsze, ponieważ nie zawierają eksonów od 7 do 10, odpowiedzialnych za kodowanie domeny hemopeksynopodobnej [157].

### 1.3.1. Budowa metaloproteinaz

Badania nad budową metaloproteinaz wykazały, że białka te posiadają strukturę wielodomenową. W skład MMPs wchodzi peptyd sygnałowy, propeptyd oraz domena katalityczna [158].

Peptyd sygnałowy zlokalizowany jest na N- końcu cząsteczki metaloproteinazy i składa się z około 20 aminokwasów. Rolą peptydu sygnałowego jest przetransportowanie prekursorowej formy metaloproteinazy do wnętrza błon retikulum endoplazmatycznego, po czym sekwencja ta zostaje usunięta [159,160,161].



Za sekwencją aminokwasów tworzących peptyd sygnałowy, znajduje się sekwencja propeptydu, która umożliwia utrzymanie cząsteczki enzymu w formie nieaktywnej (proMMP). Propeptyd tworzony jest przez około 80 aminokwasów i zawiera charakterystyczną sekwencję PRCG(X)PDV (Pro-Arg-Cys-Gly-(X)-Pro-Asp-Val) [162,163]. W skład propeptydu wchodzi trzy  $\alpha$  helisy (H1, H2, H3) połączone ze sobą pętlami, które mają zwiększoną podatność na trawienie enzymami proteolitycznymi. W strukturze propeptydu znajduje się aminokwas Cys92, który wiążąc jon  $Zn^{2+}$  powoduje deaktywację enzymu. Propeptyd występuje we wszystkich enzymach MMPs z wyjątkiem MMP-23, która w formie nieaktywnej połączona jest z błoną komórkową przez transbłonową helisę na N-końcu cząsteczki [161].

Domena katalityczna posiada około 170 aminokwasów. Struktura ta wykazuje znaczną homologię we wszystkich MMPs. W skład domeny katalitycznej wchodzi pięć struktur  $\beta$  kartki, trzy  $\alpha$  helisy oraz pętle łączące poszczególne fragmenty. Ponadto domena zawiera dwa jony  $Zn^{2+}$ , z których jeden stanowi  $Zn^{2+}$  katalityczny, drugi  $Zn^{2+}$  strukturalny, oraz od jednego do trzech jonów  $Ca^{2+}$ . W obrębie tej części znajduje się konserwatywny motyw sekwencyjny aminokwasów HEXXHXXGXXH stanowiący miejsce aktywne tego enzymu, znajdujący się w bruzdzie dzielącej domenę na dwie podjednostki: mniejszą i większą. Centrum aktywne położone jest horyzontalnie wzdłuż enzymu i wiąże substrat zaczynając od N-końca cząsteczki [164,165]. Obecne w tej części trzy cząsteczki histydyny (His) są odpowiedzialne za wiązanie atomu cynku. Czwartym ligandem katalitycznego jonu  $Zn^{2+}$  stanowi cząsteczka wody. Podczas wiązania substratu przez enzym cząsteczka wody zostaje zastąpiona grupą karbonylową [163].

Fragment zwany kieszenią S1' decyduje o specyfice substratowej enzymu [161]. W obrębie domeny katalitycznej MMP-2 (żelatynazy A) oraz MMP-9 (żelatynazy B), występują dodatkowo trzy powtórzone sekwencje aminokwasowe charakterystyczne dla fibronektyny II. Każdy z tych fragmentów składa się z 58 reszt aminokwasowych. Całość stabilizowana jest poprzez dwa wiązania disiarczkowe. Specyfika budowy domeny katalitycznej i obecność trzech fragmentów typu fibronektyny II w cząsteczce enzymu MMP-2 oraz MMP-9 warunkuje wiązanie ze specyficznymi substratami: żelatyną, białkami kolagenowymi, elastyną oraz lamininą [154,160,161,166].

Pomiędzy domeną katalityczną a domeną hemopeksynopodobną występuje tzw. region zawiasowy zbudowany z 15–65 reszt aminokwasów, region ten decyduje o specyficzności substratowej tych enzymów. Region zawiasowy ma istotne znaczenie dla utrzymania stabilnej struktury enzymu oraz degradacji substratów takich jak kolageny. Domena hemopeksynopodobna uczestniczy w rozpoznawaniu oraz wiązaniu substratów, ale także tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMPs). Domena hemopeksynopodobna występuje we wszystkich MMPs z wyjątkiem MMP-7, MMP-23 oraz MMP-26 [163,167,168,169,170].

Metaloproteinazy powstają w komórkach jako pre-pro-enzymy, a następnie wydzielane są w postaci proenzymów. Zanim proenzym zostanie uwolniony do przestrzeni pozakomórkowej konieczne jest usunięcie sekwencji sygnałowej. Sekwencja propeptydu uniemożliwia aktywację cząsteczki MMP, dzięki czemu poza komórką znajduje się ona w formie latentnej. W takim stanie cynk zablokowany jest wiązaniem koordynacyjnym utworzonym przez cysteinę znajdującą się w domenie sygnałowej N-końcowej części łańcucha białkowego. Wyjątek od tej reguły stanowią MT-MMPs, czyli metaloproteinazy typu błonowego. Po ich wydzieleniu pozostają one na powierzchni komórki i nie wykazują formy proenzymatycznej [122,171].

### 1.3.2. Regulacja ekspresji *MMPs*

Homeostaza jest podstawą sprawnego i prawidłowego funkcjonowania organizmu. Jednym z licznych elementów warunkujących homeostazę jest utrzymanie właściwego stanu macierzy pozakomórkowej [149]. Metaloproteinazy są odpowiedzialne za rozkład ECM, zatem ich synteza musi być regulowana na wielu poziomach, aby precyzja regulacji umożliwiła właściwe proporcje między syntezą a proteolizą składników macierzy pozakomórkowej [172].

Mechanizmy regulacji ekspresji genów *MMPs* nie zostały jeszcze całkowicie poznane. Istnieje wiele związków wykazujących pobudzający bądź hamujący wpływ na ekspresję genów *MMPs* [156,160,173]. Wiadomo jednak, że regulacja ekspresji *MMPs* zachodzi zarówno na poziomie transkrypcji, modyfikacji potranskrypcyjnej jak i na poziomie modyfikacji potraslacyjnej, ale także regulowana jest aktywność tych enzymów przez właściwe aktywatory i inhibitory [172]. Uwalnianie metaloproteinaz w warunkach fizjologicznych może być regulowane zatem na różne sposoby [174]. I tak przykładowo regulacja ekspresji genów zachodzi poprzez czynniki wzrostu, cytokiny, estry forbolu oraz onkogeny, które powstają z protoonkogenów *FOS* i *JUN*, a także gen *HER2* [174]. Spośród czynników wzrostu największy wpływ na syntezę i sekrecję *MMPs* posiada naskórkowy czynnik wzrostu (EGF), śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), a także interleukina 1 (IL-1) [175]. Wszystkie te endogennie wydzielane związki, jak również zaistniałe interakcje międzykomórkowe i oddziaływania komórek z macierzą pozakomórkową posiadają funkcję stymulującą wydzielanie *MMPs* [122]. W przypadku nowotworów istotną rolę w zwiększeniu poziomu metaloproteinaz odgrywa również obecność czynników kancerogennych, np. takich jak promieniowanie UV. TNF- $\beta$ , kwas retinowy oraz glikokortykoidy prowadzą natomiast do wyciszenia ekspresji genów *MMPs* [156,160,173].

Kontrola ekspresji genów na poziomie transkrypcji dotyczy wszystkich *MMPs* za wyjątkiem *MMP-2* [174]. W genie kodującym *MMP-2* u człowieka znalezione

zostały w obrębie sekwencji promotora miejsca konserwatywne, charakterystyczne dla genów metabolizmu podstawowego [173].

Zatem w warunkach fizjologicznych MMP-2 regulowana jest głównie poprzez procesy aktywacji i inhibicji na poziomie gotowego już enzymu. W niewielkim stopniu ekspresja może być modyfikowana na poziomie potranskrypcyjnej stabilizacji mRNA przez czynniki wzrostu [160,173].

Ekspresja genów dla MMPs na poziomie transkrypcji może być regulowana przez czynnik AP-1 [176,177]. Czynniki AP-1 to grupa strukturalnie i funkcjonalnie podobnych do siebie białek z motywem tzw. suwaka leucynowego, wiążących się z nicią DNA poprzez specyficzną sekwencję (5'-TGAG/CTCA-3') (178). AP-1 jest dimerem zbudowanym z białek kodowanych przez protoonkogeny *FOS* i *JUN* [179,180].

Białka z rodziny JUN wchodzące w skład AP-1 to białko C-JUN, JUNB oraz JUND [181]. Rodzina FOS czynników transkrypcyjnych zawiera białko C-FOS, FOSB, antygen-1 związany z białkiem FOS, antygen-2 związany z białkiem FOS, FOSB, FOSB2 oraz DFOSB2. Dimery białek tworzących czynnik AP-1 łączą się z nicią DNA z różnym powinowactwem, co tłumaczy występowanie odmiennych biologicznie efektów [156,173,176,182,183].

Czynniki AP-2 również mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji genów *MMPs* na poziomie transkrypcji, poprzez zwiększenie aktywności regionu promotorowego *MMP-9* [184]. Nadekspresja AP-2 została stwierdzona w różnych typach nowotworów, co ma bezpośredni związek ze zwiększoną ekspresją *MMP-2* i *MMP-9* [185,186,187,188]. W skład rodziny ludzkich czynników transkrypcyjnych AP-2 wchodzi pięć białek: AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$ , AP-2 $\gamma$ , AP-2 $\delta$  i AP-2 $\epsilon$ . Czynniki AP-2 posiadają w swojej budowie charakterystyczny motyw helisa-pętla-helisa (HLH) i wykazują zdolność rozpoznawania i wiązania palindromowej sekwencji DNA: 5'-GCCN3GGC-3' [189].

Ekspresja *MMPs* może być regulowana również na poziomie modyfikacji potranskrypcyjnej mRNA. Transkrypty mRNA dla *MMP-1* oraz *MMP-3* są stabilizowane przez estry forbolu, oraz EGF, natomiast *MMP-13* przez PDGF i glikokortykoidy. Destabilizację transkrypty mRNA kodującego *MMP-13* powoduje TGF- $\beta$  [160,190]. Regulacja ekspresji mRNA kodującego *MMP-1* na poziomie modyfikacji potranskrypcyjnej zachodzi poprzez sekwencje bogate w AU w regionie 3' nieulegającym translacji. Prawdopodobnie analogiczne sekwencje biorą udział w regulacji ekspresji mRNA dla pozostałych *MMPs* [190].

*MMPs* z wyjątkiem *MMP-11*, -23, -28, oraz wszystkie MT-*MMPs* są syntetyzowane i wydzielane na zewnątrz komórki w formie proenzymu. Procesem decydującym o poziomie aktywnych form *MMPs* w komórce jest aktywacja pro-*MMPs* [160,161,173,191]. Grupa sulfhydrylowa (-SH) cysteiny w domenie propeptydu

decyduje o braku aktywności proteolitycznej MMPs. Grupa -SH - Cys wiąże jon  $Zn^{2+}$  domeny katalitycznej, utrzymując enzym w formie proenzymu (pro-MMPs) [163,173]. Aktywacja MMPs wymaga odsłonięcia katalitycznego  $Zn^{2+}$  przez cięcie proteolityczne. W następstwie tego cięcia dochodzi do odłączenia się prodomeny, co powoduje skrócenie łańcucha polipeptydowego o około 80 reszt aminokwasowych. Masa cząsteczkowa MMPs zmniejsza się o około 10 kDa. Cząsteczka  $H_2O$  wstawiana jest w miejsce grupy -SH dzięki czemu możliwa jest hydroliza wiązania peptydowego substratów dla MMPs [156]. W takiej postaci metaloproteinazy są zdolne do pełnienia swoich regulacyjnych i strukturalnych funkcji w organizmie. W warunkach fizjologicznych aktywacja pro-MMPs zachodzi poprzez działanie proteaz serynowych, furyny, proteaz furynopodobnych, a także dzięki działaniu aktywnych form MMPs, np. pro-MMP-9 przez MMP-1,-2,-3,-7,-10, i -26 [161,173,192].

Możliwa jest też wewnątrzkomórkowa aktywacja pro-MMPs. Pro-MMP-11, -14,-15,-16,-17,-23,-24,-25 i -28 aktywowane są w aparacie Golgiego i wydzielane do ECM w postaci aktywnych enzymów [160,161,172,193]. Enzymy aktywowane wewnątrzkomórkowo posiadają w domenie propeptydu sekwencję aminokwasową rozpoznawaną przez furynę [172].

Aktywność MMPs jest również regulowana przez inhibicję [194]. Najczęściej wymienianymi inhibitorami MMPs są tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMPs),  $\alpha_2$ -makroglobulina, inhibitor zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia krwi (TFPI2) oraz wzmacniacz C-końcowej proteiny prokolagenu [161,195,196]. Poznano dotychczas strukturę czterech białek należących do rodziny TIMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 oraz TIMP-4 [160,161,197,198]. Każde z nich posiada w swojej strukturze dwie domeny. Domena N-terminalna jest identyczna we wszystkich wymienionych tu rodzajach inhibitorów. Dzięki niej TIMP wiąże się z centrum aktywnym metaloproteinaz i blokuje ich aktywność [194]. Druga domena obejmująca C-końcową część łańcucha białkowego wpływa na połączenie się inhibitora z fragmentem podobnym do hemopeksyny metaloproteinaz. Wyjątek stanowi TIMP-2, który może blokować MMP-2 i MMP-3 poprzez połączenie się z nimi właśnie tą domeną [23,199].

W tkankach najczęściej występuje TIMP-1 i TIMP-2. TIMP-1 jest rozpuszczalną glikoproteiną produkowaną przez większość komórek organizmu; TIMP-2 to białko powstające wyłącznie przy udziale fibroblastów i komórek endotelialnych [122]. Oprócz działania hamującego aktywność metaloproteinaz, oba te białka mają działanie angiogenne, poprzez bezpośrednie blokowanie migracji i proliferacji komórek śródbłonna, a ponadto są promotorami wzrostu i hamują proces apoptozy [200, 201].

Niespecyficznymi, endogennymi inhibitorami metaloproteinaz są także  $\alpha_2$ -makroglobulina,  $\alpha_1$ -antyproteaza, czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), hormony ste-

roidowe, a także cytokiny przeciwzapalne–interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) i interleukina 4 (IL-4) [171,202,203]. Syntetyzowana w wątrobie  $\alpha_2$ -makroglobulina jest proteiną o masie cząsteczkowej wynoszącej 750 kDa. Duży rozmiar cząsteczki uniemożliwia jej pełnienie optymalnego działania, gdyż ogranicza penetrację tego białka do przestrzeni pozanacyniowej i w konsekwencji zmniejsza hamowanie metaloproteinaz poza wnętrzem naczyń [171]. Mechanizm działania hamującego  $\alpha_2$ -makroglobuliny jest zupełnie inny niż ten, który posiadają tkankowe inhibitory metaloproteinaz,  $\alpha_2$ -makroglobulina pod wpływem połączenia się z MMP zmienia swoją typową strukturę i zamyka MMP w swojej cząsteczce. Proces ten uniemożliwia MMP dalsze pełnienie funkcji enzymatycznych [23,202].

Schemat działania inhibitorów metaloproteinaz należących do grupy cyklin prozapalnych także różni się od schematów przedstawionych powyżej. Badania wykazały, że proces ten polega na zmniejszaniu produkcji czynników biorących udział w wytwarzaniu MMPs, takich jak takich jak prostaglandyna E2 (PGE2) i cykliczny adenozymonofosforan (cAMP) [202].

Funkcja regulacyjna tkankowych inhibitorów metaloproteinaz sprowadza się do hamowania degradacji macierzy pozakomórkowej, zarówno poprzez rozkład, jak i dezaktywację MMPs [194].

### 1.3.3. Specyfika substratowa MMPs

W oparciu o swoistość substratową oraz różnice w strukturze czwartorzędowej łańcucha białkowego, MMPs zostały podzielone na 5 grup. Pierwszą z nich stanowią kolagenazy, do których zalicza się MMP-1 oraz MMP-8. Enzymy te odpowiadają za degradację kolagenu typu I, II i III. Kolejną grupę tworzą żelatynazy (MMP-2 i MMP-9), które swoiście rozszczepiają kolagen typu IV w błonach podstawnych, kolagen typu V i VII, a także cząsteczki żelatyny. Następne z nich czyli stromielizyny (MMP3, 10, 11, 18) mają zdolność rozkładania składników białek przestrzeni pozakomórkowej: fibronektyny, lamininy, proteoglikanów oraz tak samo jak żelatynazy, kolagenu typu IV w błonach podstawnych. Metaloproteinazy błonowe, do których zalicza się MMP-14/MT1-MMP, MMP-15/MT-2-MMP, MMP-16/MT3-MMP, /MT4-MMP aktywują niektóre pro-MMPs, w tym MT1-MMP i MT2-MMP.

Ostatnia grupa obejmuje nie wymienione wcześniej matrylizyny, czyli MMP-7 oraz MMP-12 [202,204]. Zestawienie rodzajów metaloproteinaz wraz z podziałem na grupy i lokalizacją na chromosomach przedstawia tabela 4.

Tabela 4. Rodzaje MMPs wraz z podziałem na grupy i położeniem poszczególnych genów na autosomach w genomie ludzkim [156,161,190]

RODZAJ METALOPROTEINAZY	Nr EC	NAZWA ENZYMU	LOKALIZACJA GENU NA CHROMOSOMIE
<b>Kolagenazy</b>			
MMP-1	3.4.24.7	kolagenaza śródmiąższowa, kolagenaza 1	11q22.2-22.3
MMP-8	3.4.24.34	kolagenaza neutrofilów, kolagenaza 2	11q22.2-22.3
MMP-13	3.4.24.B4	kolagenaza 3	11q22.2-22.3
<b>Żelatynazy</b>			
MMP-2	3.4.24.B7	żelatynaza A, kolagenaza typ IV	16q13- q21
MMP-9	3.4.24.35	żelatynaza B, żelatynaza 92 kDa	20q11.2-q13.1
<b>Stromielizyny</b>			
MMP-3	3.4.24.17	stromielizyna 1, proteoglikanaza	11q23
MMP-10	3.4.24.22	stromielizyna 2	11q22.3-q23
MMP-11	3.4.24.B3	stromielizyna 3	22q11.2
<b>Matrylizyny</b>			
MMP-7	3.4.24.23	matrylizyna 1,	11q21-q22
MMP-26	3.4.24.B7	matrylizyna 2, endometaza	11p15
<b>Metaloproteinazy błonowe (MT- MMPs) – MMPs transbłonowe</b>			
MMP-14	3.4.24.80	MT1-MMP	14q11-q12
MMP-15	3.4.24.B5	MT2-MMP	15q13-q21
MMP-16	nie nadano	MT3-MMP	8q21
MMP-24	nie nadano	MT5-MMP	20q11.2
<b>Metaloproteinazy błonowe (MT- MMPs) – MMPs związane z glikozylofosfatydyloinozytolem (GPI)</b>			
MMP-17	nie nadano	MT4-MMP	12q24.3
MMP-25	nie nadano	MT6-MMP	16p13.3
<b>Inne MMPs</b>			
MMP-12	3.4.24.65	metaloelastaza makrofagów, MME	11q22.2-q22.3
MMP-19	nie nadano	metaloproteinaza RASI, MMP-18	12q14
MMP-20	3.4.24.B6	enamelizyna	11q22.3
MMP-21	nie nadano	potoczna nazwa nie występuje	10q26.2
MMP-23	nie nadano	CA- MMP	1p36.3
MMP-27	nie nadano	potoczna nazwa nie występuje	11q24
MMP-28	nie nadano	epilizyna	17q21.1

\* objaśnienia wszystkich użytych w tabeli skrótów znajdują się w wykazie skrótów.

Podział enzymów opiera się na budowie strukturalnej oraz specyficy substratowej poszczególnych białek. Wykaz substratów dla poszczególnych MMPs przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Substraty dla poszczególnych rodzajów MMPs [156,161,190]

MMP	SUBSTRATY
<b>Kolagenazy</b>	
MMP-1	kolageny typu I, II, III, VII, VIII, X, żelatyna, kazeina, witronektyna, fibryna, fibrynogen, tenascyna, agrekan, brewikan, laminina, entaktyna, fibronektyna, L-selektyna, IGFBP, IL-1 $\beta$ , pro-MMP-2, pro-MMP-9, pro-TNF $\alpha$ , czynnik C1q, $\alpha_1$ -antychymotrypsyna, $\alpha_2$ -makroglobulina, inhibitor $\alpha_1$ -proteinazy
MMP-8	kolageny typu I, II, III, V, VII, VIII, XI, żelatyna, fibronektyna, fibrynogen, agrekan, brewikan, inhibitor $\alpha_1$ -proteinazy, ADAMTS
MMP-13	kolageny typu I, II, III, IV, VI, IX, X, XIV, fragment NC1 kolagenu XVIII, żelatyna, kazeina, fibronektyna, fibrynogen, fibrylina, agrekan, brewikan, perlekan, osteonektyna, tenascyna, $\alpha_2$ -makroglobulina, pro-MMP-9, czynnik C1q, czynnik XII
<b>Żelatynazy</b>	
MMP-2	kolageny typu I, IV, V, VII, X, XI, XIV, żelatyna, elastyna, fibronektyna, elastyna, entaktyna, fibrylina, agrekan, brewikan, dekoryna, fibulina, IGFBP, laminina-1, laminina-5, białko podstawowe mieliny, osteonektyna, tenascyna, witronektyna, $\alpha_1$ -antychymotrypsyna, inhibitor $\alpha_1$ -proteinazy, ADAMTS-1, czynnik C1q, endotelina, FGFR1, fibryna, fibrynogen, galektyna-3, IL-1 $\beta$ , pro-MMP1, pro-MMP-9, pro-MMP-13, plazminogen, substancja P, latentna forma TGF $\beta$ , pro-TNF $\alpha$
MMP-9	kolageny typu IV, V, VII, X, XI, XIV, fragment NC1 kolagenu XVIII, żelatyna, kazeina, agrekan, dekoryna, elastyna, fibryna, fibrynogen, fibrylina, IGFBP, laminina, białko podstawowe mieliny, osteonektyna, witronektyna, $\alpha_2$ -makroglobulina, inhibitor $\alpha_1$ -proteinazy, czynnik C1q, endotelina, galektyna-3, IL-1 $\beta$ , IL2Ra, pro-MMP-2, plazminogen, latentna forma TGF $\beta$ , pro-TNF $\alpha$
<b>Stromielizyny</b>	
MMP-3	kolageny typu III, IV, V, VII, IX, X, XI, fragment NC1 kolagenu XVIII, żelatyna, kazeina, agrekan, brewikan, witronektyna, fibryna, fibrynogen, dekoryna, elastyna, entaktyna, fibrylina, fibronektyna, IGFBP, laminina, białko podstawowe mieliny, osteonektyna, osteopontyna, perlekan, tenascyna, plazminogen, kininogen T, $\alpha_1$ -antychymotrypsyna, $\alpha_2$ -makroglobulina, inhibitor $\alpha_1$ -proteinazy, czynnik C1q, E-kadheryna, IL-1 $\beta$ , L-selektyna, kompleks MMP-2/TIMP-2, pro-MMP1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13, PAI-1, pro-TNF $\alpha$
MMP-10	kolageny typu III, IV, V, żelatyna, kazeina, agrekan, fibronektyna, fibrynogen, brewikan, elastyna, pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9
MMP-11	kolagen IV, kazeina, laminina IGFBP, $\alpha_2$ -makroglobulina, inhibitor $\alpha_1$ -proteinazy
<b>Matrylizyny</b>	
MMP-7	kolageny typu IV, X, żelatyna, agrekan, brewikan, dekoryna, elastyna, entaktyna, fibronektyna, fibulina, laminina, białko podstawowe mieliny, osteonektyna, osteopontyna, tenascyna, witronektyna, plazminogen, transferyna, inhibitor $\alpha_1$ -proteinazy, kazeina, E-kadheryna, ligand FAS, fibrynogen, pro-HB-EGF, $\beta$ 4-integryna, pro-MMP-1, pro-MMP-2, pro-MMP-9, kompleks MMP-9/TIMP-1, pro-TNF $\alpha$

MMP-26	kolagen IV, żelatyna, fibronektyna, fibrynogen, witronektyna, kazeina, inhibitor $\alpha_1$ -proteinazy, pro-MMP-9
<b>Metaloproteinazy błonowe</b>	
MMP-14	kolageny typu I, II, III, żelatyna, agrekan, entaktyna, fibrylina, fibryna, fibrynogen, fibronektyna, perlekan, witronektyna, inhibitor $\alpha_1$ -proteinazy, $\alpha_2$ -makroglobulina, tenascyna, transglutaminaza tkankowa, czynnik XII, pro-MMP-2, pro-MMP-13, pro-TNF $\alpha$
MMP-15	fibronektyna, entaktyna, laminina, agrekan, perlekan, entaktyna, pro-MMP-2, ADAMTS-1, transglutaminaza tkankowa
MMP-16	kolagen typu III, żelatyna, kazeina, fibronektyna, pro-MMP-2, tkankowa transglutaminaza
MMP-17	żelatyna, fibryna, fibrynogen, pro-TNF $\alpha$ , pro-MMP-2
MMP-24	żelatyna, fibronektyna, pro-MMP-2
MMP-25	kolagen typu IV, żelatyna, fibrynogen, fibryna, fibronektyna, pro-MMP-2
<b>Inne MMPs</b>	
MMP-12	kolageny typu I, IV, fragment NC1 kolagenu XVIII, żelatyna, agrekan, fibrynogen, fibrylina, fibronektyna, plazminogen, laminina, elastyna, entaktyna, białko podstawowe mieliny, witronektyna, $\alpha_2$ -makroglobulina, inhibitor $\alpha_1$ -proteinazy, czynnik XII, IgG, pro-TNF $\alpha$
MMP-19	kolageny typu I, IV, żelatyna, kazeina, agrekan, fibronektyna, laminina, entaktyna, tenascyna,
MMP-20	fragment NC1 kolagenu XVIII, agrekan, amelogenina,
MMP-21	elastyna, agrekan
MMP-23	elastyna, agrekan
MMP-27	elastyna, agrekan
MMP-28	kazeina, elastyna, agrekan

\*objaśnienia wszystkich użytych w tabeli skrótów znajdują się w wykazie skrótów.

Miejscem działania MMPs w cząsteczkach substratów jest wiązanie peptydowe w pozycji poprzedzającej występowanie hydrofobowych aminokwasów, takich jak Leu, Ile, Met, Pro, a także Tyr. Na hydrolizę tak położonych wiązań pozwala przede wszystkim przestrzenna konfiguracja kieszeni S1' [161,169].

MMPs degradują składniki ECM, a także są odpowiedzialne za selektywną proteolizę receptorów komórkowych, czynników adhezyjnych oraz czynników wzrostu i cytokin oraz utrzymanie prawidłowych funkcji komórek tkanki łącznej [158]. Dzięki temu MMPs regulują strukturę macierzy pozakomórkowej. MMPs jako jedyne enzymy posiadają zdolność do degradacji kolagenu typu IV, będącego podstawowym składnikiem błony podstawnej (BM) naczyń krwionośnych. Głównymi enzymami katalizującymi hydrolizę kolagenu IV są MMP-2 oraz MMP-9. Możliwe jest to dzięki obecności domeny typu fibronektyny II w cząsteczkach tych enzymów [150,154,169].



MMPs umożliwiają migrację komórek poprzez degradowanie składników ECM w tym kolagenów, proteoglikanów i laminin [153,205]. Efektem enzymatycznego działania metaloproteinaz jest zaburzenie struktury macierzy pozakomórkowej, dzięki czemu zwiększona zostaje objętość przestrzeni pomiędzy komórkami. Białka macierzy posiadają bardzo istotne funkcje nie tylko w prawidłowej organizacji mikroarchitektury tkanek, ale również biorą udział w przewodzeniu sygnałów ze środowiska zewnętrznego komórek do ich wnętrza, pełnią funkcję ligandów dla integryn oraz komórkowych receptorów adhezyjnych. Dodatkowo wiążą substancje obecne w przestrzeni międzykomórkowej w postaci latentnej, w tym także czynniki wzrostu [156].

#### 1.3.4. Fizjologiczna aktywność MMPs

W warunkach fizjologicznych MMPs biorą aktywny udział m.in. w: migracji komórek w czasie wzrostu organizmu, przebudowie tkanki podporowej, rozwoju szkieletu, angiogenezie, agregacji płytek krwi oraz gojeniu ran i tworzeniu blizn [151,160,206,207]. Oprócz tego warunkują cykliczne zmiany w endometrium macicy, które mają miejsce w czasie ciąży, porodu i połogu [160], regulują gospodarkę elektrolitową, a w rozwoju prenatalnym są ważnym czynnikiem wpływającym na embriogenezę [151,206]. Szczególną rolę przypisuje się metaloproteinazom MMP-2 i MMP-9. MMP-2 odgrywa istotną rolę w regulacji czynności płytek krwi poprzez stymulację agregacji niezależną od tromboksanu A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Natomiast MMP-9 hamuje proagregacyjne działanie MMP-2 [208]. Hemostaza naczyniowa utrzymywana jest zatem m. in. dzięki antagonistycznemu działaniu MMP-2 i MMP-9 [206].

#### 1.3.5. Aktywność MMPs w stanach patologicznych

Aktywność metaloproteinaz ujawnia się jednak nie tylko w procesach fizjologicznych, ale także widoczna jest podczas zmian patologicznych zachodzących w organizmie [43,209]. Kluczową rolę metaloproteinaz udowodniono także w takich stanach jak procesy zapalne, choroby degeneracyjne (choroba Alzheimera, stwardnienie rozsiane, stwardnienie zanikowe boczne), choroby o podłożu immunologicznym (reumatoidalne zapalenie stawów), a także w chorobach układu sercowo-naczyniowego [210,211]. Wielu autorów podkreśla również udział metaloproteinaz w inicjacji rozwoju nowotworów skóry, np. czerniaku złośliwym, raku podstawno-komórkowym, raku kolczystokomórkowym, a także w glejakach, chorobach nowotworowych płuc, żołądka, macicy oraz piersi [112,212,213,214,215,216,217,218].

### 1.3.6. Rola MMPs w procesie rozwoju nowotworu

Metaloproteiny wytwarzane są zarówno przez komórki zdrowe, jak i te zmienione nowotworowo [219]. Komórki nowotworowe syntetyzują specyficzny czynnik, który stymuluje syntezę MMPs przez fibroblasty (EMMPRIN), który znajduje się na powierzchni stransformowanych komórek i oddziałując ze znajdującymi się w pobliżu fibroblastami pobudza syntezę kolagenazy, żelatynazy A oraz stromielizyny [220]. Oprócz tego cząsteczka EMMPRIN zwiększa ekspresję aktywatorów prożelatynazy A, MT-1-MMP oraz MT-2-MMP w okolicy, gdzie zlokalizowane są komórki nowotworowe [122]. EMMPRIN jest glikoproteiną należącą do nadrodziny immunoglobulin. Obecność tego białka została stwierdzona między innymi w raku płuc, pęcherza moczowego, skóry, jajnika oraz piersi [221,222,223].

Zmiana pierwotnej aktywności metaloproteinaz w komórkach nowotworowych prowadzi do nadmiernej aktywacji proteolizy zewnątrzkomórkowej [224]. Proces ten pozwala na inwazję nowotworu, ponieważ ułatwia komórkom nowotworowym przenikanie przez bariery [204].

Dzięki proteolizie białek macierzy pozakomórkowej i połączeń międzykomórkowych metaloproteiny umożliwiają komórkom nowotworowym migrację oraz inwazję. Niektóre MMPs mogą obniżać skuteczność przeciwnowotworowych reakcji immunologicznych przez niszczenie receptorów dla IL-2 na limfocytach T.

Udział metaloproteinaz w rozroście nowotworów potwierdza wzrost wydzielania i aktywności metaloproteinaz niemal we wszystkich typach nowotworów u ludzi [225]. Stwierdzenie podwyższonego poziomu MMPs koreluje ze stopniem zaawansowania, wyższą inwazyjnością, szybkością dawania przerzutów odległych i krótszym okresem przeżycia chorego [226]. Nasiloną miejscową ekspresją MMPs uważana jest za nowy, istotny czynnik prognostyczny, który może decydować o wdrożeniu leczenia uzupełniającego [226,227]. Podczas rozwoju choroby nowotworowej MMPs uczestniczą w procesach patologicznej angiogenezy, odpowiedzi immunologicznej organizmu, regulacji wzrostu i apoptozy komórek nowotworowych oraz inwazji nowotworu i tworzeniu przerzutów [112,153,157,228].

Metaloproteinazami uczestniczącymi w procesie angiogenezy są głównie: MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, trawiące kolagen typu IV [225]. Proces ten jest konieczny do przerywania ciągłości błony naczyń krwionośnych. Przerwanie błony podstawnej naczyń pozwala na migrację komórek śródbłonna naczyń do macierzy pozakomórkowej. Tam w przygotowanej przez metaloproteiny przestrzeni komórki śródbłonna naczyń mogą tworzyć nowe kapilary dla rosnącego guza. Z rozwojem guza nowotworowego, który wymaga nowych naczyń krwionośnych do swojego wzrostu musi być związana choć jedna z wymienionych wyżej metaloproteinaz [229].

Tkankowe inhibitory metaloproteinaz mogą skutecznie hamować aktywność proteolityczną MMPs, a tym samym odgrywają ważną rolę w ustalaniu równowa-

gi pomiędzy degradacją i syntezą macierzy pozakomórkowej [158]. Wykazano, że nadmierne wydzielanie MMPs przez komórki nowotworów złośliwych stymuluje zwiększoną syntezę TIMPs i zapewnia utrzymanie prawidłowej struktury białek przestrzeni pozakomórkowej. Funkcja tkankowych inhibitorów metaloproteinaz jest zachowana wyłącznie wtedy, gdy ich stosunek jest znacząco większy w porównaniu do MMPs. W sytuacji przeciwnej dochodzi do modulacji wzrostu komórek guza, jego migracji, inwazji okolicznych tkanek, tworzeniu przerzutów oraz nowych naczyń krwionośnych, czyli szeroko rozumianej progresji nowotworu. Ma to związek nie tylko z wpływem metaloproteinaz na degradację białek przestrzeni pozakomórkowej, ale także zależnym od MMPs napływem czynników wzrostu i cytokin [202].

### 1.3.7. Rola MMPs w patogenezie raka podstawnokomórkowego

W progresji raka podstawnokomórkowego główną rolę odgrywają należące do grupy żelatynaz MMP-2 i MMP-9, a także ich inhibitory [230,231,232]. W domenie katalitycznej tych enzymów obecny jest fragment powtarzających się sekwencji aminokwasów, który umożliwia połączenie się cząsteczki MMP-2 i MMP-9 z kolagenem i elastyną [122,208]. Dzięki możliwości degradacji kolagenu typu IV przez wymienione metaloproteinazy, komórki nowotworowe mają możliwość migracji poza tkankę guza i tworzenia odległych przerzutów [233]. Kluczową rolę w tym procesie przypisuje się MMP-9, która działa jako promotor inwazji nowotworu [234,235]. Zwiększona ekspresja MMP-9 koreluje ze stopniem zaawansowania raka podstawnokomórkowego i odpowiada za groźniejszy przebieg tej choroby [117,148,233].

Oprócz tego istnieją również doniesienia o roli MMP-9 w procesie neoangiogenezy, gdyż bierze ona udział we wroście komórek śródbłonna i aktywacji czynników proangiogennych [171,202,220,232,233].

Aktywność MMP-2 oraz MMP-9 może być hamowana tak przez TIMP-1, jak i TIMP-2 poprzez wiązanie tych cząsteczek z rejonami aktywnymi obu enzymów [208]. Należy podkreślić, że TIMP-2 ma większe powinowactwo do MMP-2 i MMP-9 niż TIMP-1. Funkcja TIMP-2 nie ogranicza się tylko do ochrony składników macierzy pozakomórkowej, lecz przyczynia się również do hamowania wzrostu guza raka podstawnokomórkowego poprzez zamykanie jego struktury w sieci śródmiąższowego kolagenu, a także blokuje proces angiogenezy i tworzenie się przerzutów odległych [202]. Jednak niektóre wyniki badań wskazują, że zwiększenie poziomu TIMP-2 w tkance nowotworowej BCC promuje rozwój i progresję nowotworu, a tym samym pogarsza rokowanie u chorych na raka podstawnokomórkowego [148]. Należy podkreślić, że mechanizm tego zjawiska nadal pozostaje niejasny i wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań [45,202].



## 2. Cel pracy

Nadrzędnym celem niniejszej pracy było wykazanie i porównanie ekspresji transkryptów mRNA dla kolagenu typu I, III, IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w biopsjach skórnych pobranych od chorych na raka podstawnocomórkowego skóry oraz w biopsjach skóry zdrowej pobranej z marginesu guza, od tych samych pacjentów.

Dla realizacji nadrzędnego celu pracy przyjęto następujące zadania badawcze:

1. Wykazanie zależności pomiędzy poziomem ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, III, IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w biopsjach skórnych pobranych od chorych na raka podstawnocomórkowego skóry a wiekiem pacjentów, miejscem lokalizacji guza, rodzajem fototypu skóry pacjenta, a także płcią pacjentów.
2. Wykazanie, czy istnieje różnica w ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, III, IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 pomiędzy tkanką nowotworową w raku podstawnocomórkowym naciekającym a tkanką nowotworową w raku guzkowym.
3. Wykazanie, czy istnieje zależność pomiędzy ekspresją mRNA dla MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnocomórkowym naciekającym i guzkowym a ekspresją mRNA dla kolagenu typu IV, odpowiednio, w tych samych typach raka.
4. Wykazanie, czy istnieje zależność pomiędzy ekspresją mRNA dla MMP-2 podstawnocomórkowym naciekającym i guzkowym i ekspresją mRNA dla kolagenu typu I, odpowiednio w tych samych typach raka.



# 3. Materiał i metody

## 3.1. Pacjenci

Materiałem do badań były biopsje tkanki nowotworowej guzów podstawnokomórkowych skóry uzyskanych od chorych z Oddziału Klinicznego Dermatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Grupę kontrolną stanowiły biopsje zdrowej tkanki, pochodzącej z marginesu guza, od tych samych pacjentów. Materiał został pobrany chirurgicznie, w trakcie zabiegu usunięcia guza, od 85 pacjentów. Uzyskano pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego dotyczącą przeprowadzenia badań w pozyskanych biopsjach skóry nr KBET/37/B/2009, a następnie nr KBET/74/B/20011. Badania wykonano w Zakładzie Analityki Biochemicznej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum UJ w latach 2009(czerwiec) – 2011(sierpień), a następnie w Zakładzie Kosmetologii Medycznej Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego w Krakowie.

Badaniem objęto 85 pacjentów, a w tym 34 kobiety i 51 mężczyzn, u których zdiagnozowano raka podstawnokomórkowego skóry. Pacjenci zostali podzieleni na grupy wiekowe. W wieku poniżej 68 lat było 30 badanych, w przedziale 69-78 lat było 32 badanych, w wieku +79 było 23 badanych. Średni wiek pacjentów wynosił  $71,7 \pm 9,4$  lat.

Typ guzkowy raka podstawnokomórkowego skóry zdiagnozowany został u 45 pacjentów, a odmianę naciekającą BCC zdiagnozowano u 40 pacjentów. W każdym przypadku znany był fototyp skóry pacjenta oceniony wg klasyfikacji Fitzpatricka (7) oraz lokalizacja zmiany nowotworowej na skórze chorego. Fototyp II został określony u 15 badanych, fototyp III u 46 badanych, a fototyp IV reprezentowało 24 chorych. U 71 badanych osób zmiany nowotworowe były zlokalizowane na głowie, a u 14 na tułowiu. Obecność nowotworu oraz jego typ zostały rozpoznane badaniem klinicznym i potwierdzone badaniem histopatologicznym.

Badano ekspresję mRNA dla kolagenu typu I (KOL I), dla kolagenu typu III (KOL III), dla kolagenu typu IV (KOL IV), dla metaloproteinazy 2 (MMP-2), a także metaloproteinazy 9 (MMP-9). Oznaczenia wykonano zarówno w tkankach pobranych bezpośrednio z guza BCC, które oznaczono jako T (tumor), jak i w tkankach zdrowych pochodzących z marginesu guza od tych samych pacjentów, które

oznaczone zostały jako NT (non-tumor). Wyniki znamienne statystycznie przedstawiono w tabelach wytłuszczonym drukiem.

Bezpośrednio po pobraniu tkanki nowotworowej i tkanki zdrowej, materiał został umieszczony w jałowych probówkach z roztworem RNAlater. Celem takiego działania było zabezpieczenie RNA przed rozpadem, przez zahamowanie aktywności RNAz. Do czasu wykonania oznaczeń materiał przechowywany był w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 3.2. Metody

W biopsjach skóry pobranych od chorych na raka podstawnokomórkowego skóry wykonano oznaczenie ekspresji mRNA dla genów kolagenu typu I (*COL1A1*), kolagenu typu III (*COL3A1*), kolagenu typu IV (*COL4A4*), metaloproteinazy 2 (*MMP-2*), metaloproteinazy 9 (*MMP-9*) oraz genu reporterowego dla  $\beta$ -aktyny (*ACTB*). Oznaczenia wykonano zarówno w tkankach pobranych z guza BCC, które oznaczono jako T (tumor), jak i w tkankach zdrowych, pochodzących z marginesu guza od tych samych pacjentów, które oznaczono jako NT (non-tumor). Z wszystkich pobranych biopsji wyizolowano całkowite RNA. Zestawienie odczynników i aparatury niezbędnej do wykonania powyższych oznaczeń, a także zasady wykorzystanych metod przedstawione zostały w Aneksie (patrz s. 141–149).

### 3.2.1. Izolacja RNA z biopsji skóry pobranych od pacjentów

Z każdego wycinka skóry znajdującego się w odczynniku RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Niemcy) pobrano po 30 mg badanej tkanki. Tkanki pulweryzowano w ciekłym azocie, a następnie przeprowadzono ekstrakcję całkowitego RNA z tkanek guza oraz z tkanek zdrowych, zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego i Sacchi (236), w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ . Izolację całkowitego RNA wykonano w komorze DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR (Biosan, Łotwa). Po ekstrakcji, oznaczano stężenie RNA w próbkach, a także oceniano czystość uzyskanych preparatów metodą spektrofotometryczną, przez pomiar przy długości fali 260 i 280 nm.

### 3.2.2. Pomiar stężenia całkowitego RNA i ocena czystości próbek

Stężenie uzyskanego całkowitego RNA, wyizolowanego z tkanek nowotworowych guzów BCC oraz z tkanek zdrowych oceniono przez pomiar absorbancji światła UV przy długości 260 i 320 nm. Pomiar absorbancji RNA przy  $\lambda = 260$  i 320 wykonano korzystając ze spektrofotometru Cary 100 Bio UV-Visible (Varian Medical Systems,



USA) z oprogramowaniem Win UV RNA-DNA Estimation Application. Pomiar ten umożliwia ocenę zawartości RNA w każdej próbce w odniesieniu do jednostkowej absorbancji (przy drodze optycznej 1 cm), która reprezentuje stężenie RNA równe 40µg/ml. Otrzymane wyniki zostały wykorzystane do obliczenia stężenia RNA w poszczególnych próbkach wg wzoru:

$C (\mu\text{g/ml}) = (A_{260} - A_{320}) \times 40 \times \text{współczynnik rozcieńczenia}$ . Wyliczone stężenie stanowiło podstawę do obliczenia objętości (w µl) danego roztworu całkowitego RNA, zawierającego 0,2µg RNA używanego jako matryca do reakcji RT-PCR.

W celu potwierdzenia czystości uzyskanego preparatu RNA wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 260 i 280 nm. Stosunek wartości absorbancji  $A_{260}$  do  $A_{280}$  pozwala na ocenę stopnia zanieczyszczenia preparatu RNA przez kwas deoksyrybonukleinowy i białka. Wysoka czystość preparatu RNA gwarantowana jest, gdy wartość współczynnika  $A_{260}/A_{280}$  zawiera się w przedziale pomiędzy 1.8-2.0 (237).

### 3.2.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji RT (*Reverse Transcription*)

Przygotowanie próbek do reakcji odwrotnej transkrypcji zostało przeprowadzone w komorze DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR (Biosan, Łotwa). Reakcję odwrotnej transkrypcji wykonano przy użyciu zestawu: Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Litwa). W zestawie tym występuje rekombinowana odwrotna transkryptaza M-MuLV, wykazująca termostabilność do temperatury 60°C. W zestawie znajdują się również primery Oligo(dT)18, które wiążą się specyficznie z końcem 3' odcinka poliadenylowego, poly(A) RNA. Primery te inicjują syntezę cDNA tylko z mRNA zakończonym poly(A). Do zestawu należy także inhibitor RNaz Ribolock™, który zabezpiecza RNA przed działaniem RNaz A, B, C w temperaturze do 55°C.

Każdorazowo przygotowano, w sterylnych próbkach o pojemności 200 µl, mieszaninę reakcyjną w składzie: 0,2 µg matrycy RNA, 1 µl roztworu primera oligo (dT) (0,5 µg/ µl), 10,8 µl H<sub>2</sub>O DEPC, składniki te inkubowano w komorze grzewczej termocyklera Mastercycler Gradient EP 5331 (Eppendorf, Niemcy) w temperaturze 70°C przez 5 minut, a następnie dodawano 4 µl buforu reakcyjnego 5x stężonego, 1 µl inhibitora rybonukleaz Ribolock™ (20 u/µl) i 2 µl 10mM mix dNTPs, i inkubowano w temp. 37°C przez 5 minut.

Reakcja RT umożliwia przeprowadzenie na matrycy wyizolowanego RNA efektywnej reakcji syntezy nici cDNA. Otrzymane cDNA przechowywano w temp. -20°C. Uzyskane cDNA następnie amplifikowano w reakcji PCR, do której wykorzystywano odpowiednie primery.

### 3.2.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Do przeprowadzenia reakcji PCR użyto polimerazy Opti Taq hot start (Eur<sub>x</sub>, Polska). Jest ona mieszaniną: termostabilnej polimerazy DNA Taq wyizolowanej z *Thermus aquaticus* (Taq), polimerazy DNA Pfu o aktywności naprawczej wyizolowanej z *Pyrococcus furiosus* (Pfu), przeciwciał monoklonalnych anty-Taq, odwracalnych inhibitorów, czynników stymulujących do zajścia reakcji hot start PCR. Mieszanina taka daje pewność powielenia fragmentów DNA, o długości nawet do 20 kbp, zachowując wysoką wierność matrycy, co podnosi wydajność oraz specyficzność reakcji PCR. Dodatkowo obecne w mieszaninie przeciwciała anty-Taq charakteryzują się wysoką stabilnością w podwyższonych temperaturach. Dzięki temu zapobiegają niespecyficznemu polimeryzacji, która może zachodzić w przedziale temperatur od 20°C aż do 70°C. Polimeraza Opti Taq i przeciwciała anty-Taq tworzą kompleksy zabezpieczające mieszaninę składników reakcji PCR przed zajściem amplifikacji w temperaturze pokojowej. Tym samym składniki te eliminują ryzyko utworzenia niespecyficznego produktu, co stanowi podstawę reakcji hot start PCR. Jest to także zaleta podczas wykonywania dużej ilości próbek jednocześnie. Polimeraza Opti Taq hot start ma aktywność syntezującą w kierunku od 5' do końca 3' przy obecności jonów Mg<sup>2+</sup> i jednocześnie aktywność egzonukleazową prowadzoną od końca 3' do 5'.

Przygotowanie próbek do reakcji PCR zostało każdorazowo przeprowadzone w komorze DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR (Biosan, Łotwa). W jałowych probówkach o pojemności 200 µl przygotowywano mieszaninę o składzie: 1,2 µl matrycy cDNA, 1,6 µl buforu 10xAmpliBuffer C, 1,6 µl dNTPs o stężeniu 2mM, 8,2 µl wody traktowanej DEPC, 1,6 µl startera R, 1,6 µl startera L i 0,2 µl polimerazy Opti Taq hot start. Tak przygotowane próbki umieszczano w termocyklerze Mastercycler Gradient EP 5331 (Eppendorf, Niemcy).

#### 3.2.4.1. Amplifikacja fragmentu genu *COL1A1*

Do amplifikacji fragmentu genu *COL1A1* wykorzystano primery zaprojektowane w programie Primer 4, HU COL1A1 F 5'- ACGCATGAGCGGACGCTAACC -3' HU COL1A1 R 5'- AGTGTCTCCCTTGGGTCCCTCG -3' (DNA Gdańsk, Polska). Primery stosowano w stężeniu 10µM.

Profil temperaturowy reakcji PCR dla powielenia fragmentu genu *COL1A1* był następujący: 95°C – 10 minut, 96°C – 15 sekund, 53,8°C – 30 sekund, 72°C – 45 sekund; 35 cykli, a następnie inkubacja w temp. 61°C przez 30 minut i 4°C – ∞ (utrzymywane, aż do wyjęcia próbek z termocyklera). W wyniku reakcji uzyskano produkt o wielkości 414kbp.

#### 3.2.4.2. Amplifikacja fragmentu genu *COL3A1*

Do amplifikacji fragmentu genu *COL3A1* wykorzystano primery zaprojektowane w programie Primer 4, HU COL3A1 F 5'-GGACACAGAGGCTTCGATGGACGA-3' HU COL3A1 R 5'-GGGGATCCAGGGAATCCGGCA-3' (DNA Gdańsk, Polska). Primery stosowano w stężeniu 6μM.

Profil temperaturowy reakcji PCR dla powielenia fragmentu genu *COL3A1* był następujący: 95°C – 10 minut, 96°C – 15 sekund, 60°C – 30 sekund, 72°C – 45 sekund; 35 cykli, a następnie inkubacja w temp. 61°C przez 30 minut i 4°C – ∞ (utrzymywane, aż do wyjęcia próbek z termocyklera). W wyniku reakcji uzyskano produkt o wielkości 251kbp.

#### 3.2.4.3. Amplifikacja fragmentu genu *COL4A4*

Do amplifikacji fragmentu genu *COL4* wykorzystano primery zaprojektowane w programie Primer 4, HU COL4A4 F 5'-CCC CTC AGG ACC AGG GTG CAA-3', HU COL4A4 R 5'-AGG GGC GGATCGCCTCTTCCA-3' (DNA Gdańsk, Polska). Primery stosowano w stężeniu 4μM.

Profil temperaturowy reakcji PCR dla powielenia fragmentu genu *COL4A4* był następujący: 95°C – 10 minut, 96°C – 15 sekund, 65°C – 30 sekund, 72°C – 45 sekund; 35 cykli, a następnie inkubacja w temp. 61°C przez 30 minut i 4°C – ∞ (utrzymywane, aż do wyjęcia próbek z termocyklera). W wyniku reakcji uzyskano produkt o wielkości 482kbp.

#### 3.2.4.4. Amplifikacja fragmentu genu *MMP-2*

Do amplifikacji fragmentu genu *MMP-2* wykorzystano primery zaprojektowane w programie Primer 4, HU MMP-2 F 5'-CACTTTCCTGGGCAACAAAT-3', HU MMP-2 R 5'-CTCCTCAATGCCCTTGATGT-3' (DNA Gdańsk, Polska). Primery stosowano w stężeniu 10μM.

Profil temperaturowy reakcji PCR dla powielenia fragmentu genu *MMP-2* był następujący: 95°C – 10 minut, 96°C – 15 sekund, 56°C – 30 sekund, 72°C – 45 sekund; 35 cykli, a następnie inkubacja w temp. 61°C przez 30 minut i 4°C – ∞ (utrzymywane, aż do wyjęcia próbek z termocyklera). W wyniku reakcji uzyskano produkt o wielkości 271kbp.

#### 3.2.4.5 Amplifikacja fragmentu genu *MMP-9*

Do amplifikacji fragmentu genu *MMP-9* wykorzystano primery zaprojektowane w programie Primer 4, HU MMP-9 F 5'-TCCCTGGAGACC TGAGAACC-3' HU MMP-9 R 5'-GTCGTCCGGTGTCTAGTTGG-3' (DNA Gdańsk, Polska). Primery stosowano w stężeniu 10μM.

Profil temperaturowy reakcji PCR dla powielenia fragmentu genu *MMP-9* był następujący: 95°C – 10 minut, 96°C – 15 sekund, 63°C – 30 sekund, 72°C – 45 sekund; 35 cykli, a następnie inkubacja w temp. 61°C przez 30 minut i 4°C – ∞ (utrzymywane, aż do wyjęcia próbek z termocyklera). W wyniku reakcji uzyskano produkt o wielkości 659kbp.

#### 3.2.4.6. Amplifikacja fragmentu genu *ACTB*

Do amplifikacji fragmentu genu *ACTB*, użytego jako gen reporterowy, wykorzystano primery zaprojektowane w programie Primer 4, HU *ACTB* F5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3' HU *ACTB* R 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3' (DNA Gdańsk, Polska). Primery stosowano w stężeniu 6μM.

Profil temperaturowy reakcji PCR dla powielenia fragmentu genu *ACTB* był następujący: 95°C – 10 minut, 96°C – 15 sekund, 58°C – 30 sekund, 72°C – 45 sekund; 35 cykli, a następnie inkubacja w temp. 61°C przez 30 minut i 4°C – ∞ (utrzymywane, aż do wyjęcia próbek z termocyklera). W wyniku reakcji uzyskano produkt o wielkości 234kbp.

#### 3.2.5. Elektroforeza produktów uzyskanych w wyniku reakcji PCR w żelu agarozowym

Otrzymane w wyniku reakcji PCR produkty amplifikacji fragmentów genów dla *COL1A1*, *COL3A1*, *COL4A4*, *MMP-2*, *MMP-9* i *ACTB* rozdzielono kolejno w 1.5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Wykorzystano zestaw do elektroforezy horyzontalnej firmy Kucharczyk (Polska). Każdorazowo, do 2 μl uzyskanych próbek DNA dodawano 3 μl buforu obciążającego 6x Orange Loading Dye Solution (Fermentas, Litwa). Na każdym żelu umieszczano również marker wielkości GeneRuler™ 1kb Plus DNA ladder (Fermentas, Litwa), o zakresie wielkości produktów 75-20 000 kbp, w ilości 5μl/studzienkę. Elektroforezę prowadzono w buforze TBE przez 0,5 godziny, stosując napięcie prądu 100V oraz natężenie 0,07A.

Elektroforegramy dokumentowano przy użyciu aparatu cyfrowego (Olympus, USA) i transluminatora UV (Vilber Lourmat, Francja) z wykorzystaniem systemu dokumentacji i analizy obrazu żeli PolyDoc. Cyfrowy zapis elektroforegramu poddano analizie densytometrycznej przy użyciu programu Quantity One 4.2.1. (Bio-Rad, USA). Analizowano gęstość densytometryczną uzyskanych produktów reakcji RT PCR. Przyjęto, że wartość gęstości densytometrycznej otrzymanych produktów odpowiada ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV, *MMP-2*, *MMP-9*, i β-aktyny. Uzyskane wyniki ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz *MMP-2* i *MMP-9* przeliczono względem wartości ekspresji mRNA dla genu reporterowego *ACTB*.

### 3.2.6. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano program SPSS 18 (IBM, USA). W celu sprawdzenia rozkładów badanych prób wykorzystano test Kołmogorowa – Smirnowa. Zastosowano parametryczny test t Studenta dla prób zależnych w celu porównania pomiarów oraz test t Studenta dla prób niezależnych, by porównać grupy ze względu na wartości badanych parametrów. W celu zbadania związków pomiędzy pomiarami wykorzystano parametryczny test korelacji Pearsona. W celu szacowania przedziałów ufności zastosowano 95% kryterium. Hipotezę zerową dla testu odrzucano i przyjmowano alternatywną przy wyniku  $p \leq 0,05$ .



## 4. Wyniki

### 4.1. Rozkłady badanych parametrów

W celu wybrania metody weryfikacji celu pracy i zadań badawczych przeprowadzono serię analiz testem normalności rozkładu Kołmogorowa – Smirnowa w różnych konfiguracjach grup. Analiza wykazała, że istotnie, od kształtu rozkładu normalnego, różniły się wartości ekspresji mRNA dla MMP-2, dla próbek pobranych z ognisk guza (T) w raku naciekającym  $Z=2,12$ ;  $p<0,001$ . Wartości ekspresji mRNA dla MMP-2 w raku naciekającym, dla próbek pobranych z ognisk guza (T) u kobiet  $Z=1,38$ ;  $p=0,044$  oraz u mężczyzn  $Z=1,46$ ;  $p=0,029$  również nie wykazały rozkładu normalnego. Rozkład normalny nie miał miejsca również w grupie badanych w wieku młodszym niż 68 lat, dla wartości ekspresji mRNA dla MMP-2 dla próbek pobranych z ognisk guza (T). Rozkład pomiarów MMP-2 dla próbek pobranych z ognisk guza (T) w raku naciekającym w grupie, gdzie guz lokalizował się na głowie  $Z=2,12$ ;  $p<0,001$  również był istotnie różny od normalnego. Istotnie inny od normalnego okazał się także pomiar MMP-9 dla próbek pobranych z ognisk guza (T) w raku guzkowym, w grupie badanych w wieku 79+  $Z=1,67$ ;  $p<0,01$ . Analiza wykazała również, że inny od normalnego okazał się rozkład wyników w pomiarze ekspresji mRNA dla MMP-9 dla próbek pobranych z ognisk guza (T) w raku guzkowym w grupie pacjentów, gdzie guz lokalizował się na głowie  $Z=1,38$ ;  $p=0,045$ . We wszystkich pozostałych wyróżnionych grupach, dla każdego z analizowanych parametrów, wystąpił rozkład normalny.

W celu weryfikacji postawionych problemów badawczych przeprowadzono testy parametryczne przyjmując próg istotności równy lub mniejszy niż 0,05. Wyniki testów Kołmogorowa – Smirnowa przedstawione zostały w tabelach 6, 7, 8, 9 oraz 10.

Tabela 6. Statystyki opisowe oraz rozkłady badanych pomiarów w podziale na typ raka – guzkowy i naciekający

TEST \ BADANY PARAMETR		KOL I T	KOL I NT	KOL III T	KOL III NT	KOL IV T	KOL IV NT	MMP-2 T	MMP-2 NT	MMP-9 T	MMP-9 NT
GUZKOWY	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,892	,748	,866	,682	,610	1,256	,820	,745	1,555	,925
	Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,405	,630	,441	,742	,851	,085	,513	,635	,016	,359
NACIEKAJĄCY	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,746	,967	1,187	,532	,607	,749	<b>2,119</b>	1,107	,983	,678
	Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,634	,307	,119	,940	,855	,628	<b>,000</b>	,172	,289	,748
Testowana jest zgodność z rozkładem normalnym.											



Tabela 7. Statystyki opisowe oraz rozkłady badanych pomiarów w podziale na typ raka dla każdej z płci

TEST		BADANY PARAMETR	KOL	KOL	KOL	KOL	KOL	KOL IV	MMP-2	MMP-2	MMP-9	MMP-9
			IT	INT	III T	III NT	IV T	NT	T	NT	T	NT
GUZKOWY	KOBIECY	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,659	,393	,709	,582	,482	,526	,713	,614	1,115	1,034
		Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,778	,998	,697	,887	,974	,945	,690	,845	,166	,236
	MEŹCZYŹNI	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,644	,870	,521	,612	,757	1,140	,764	,609	1,268	1,007
		Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,801	,436	,949	,848	,616	,148	,604	,852	,080	,263
NACIEKAJĄCY	KOBIECY	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,690	,703	,731	,496	,489	,834	<b>1,380</b>	,845	,801	,551
		Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,729	,706	,659	,967	,970	,491	<b>,044</b>	,474	,543	,922
	MEŹCZYŹNI	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,513	,790	,967	,635	,459	,584	<b>1,456</b>	,839	,754	,581
		Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,955	,561	,307	,815	,984	,885	<b>,029</b>	,482	,621	,889
Testowana jest zgodność z rozkładem normalnym.												

Tabela 8. Statystyki opisowe oraz rozkłady badanych pomiarów w podziale na typ raka w każdej z grup wiekowych

GRUPA			KOL I T	KOL I NT	KOL III T	KOL III NT	KOL IV T	KOL IV NT	MMP-2 T	MMP-2 NT	MMP-9 T	MMP-9 NT
GUZKOWY	≤68 LAT	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,429	,691	,591	,671	,432	,474	,468	,702	,862	,744
		Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,993	,727	,876	,759	,992	,978	,981	,709	,448	,637
	69-78 LAT	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,558	,758	,697	,688	,785	1,331	,854	,939	1,305	,988
		Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,915	,615	,716	,732	,568	,058	,460	,341	,066	,283
	79+ LAT	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,716	,616	,635	,457	,466	,547	,983	,693	<b>1,674</b>	1,046
		Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,684	,842	,814	,985	,982	,926	,289	,723	<b>,007</b>	,224
NACIEKAJĄCY	≤68 LAT	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,734	,861	,940	,656	,557	,593	<b>1,607</b>	,782	,545	,694
		Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,655	,449	,340	,783	,916	,873	<b>,011</b>	,574	,928	,721
	69 - 78 LAT	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,805	,718	,539	,471	,650	,822	1,055	,922	,734	,856
		Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,537	,681	,933	,979	,792	,509	,215	,363	,654	,457
	79+ LAT	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,632	,487	,436	,345	,543	,340	,745	,828	,655	,790
		Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,819	,972	,991	1,000	,930	1,000	,635	,499	,784	,560
<b>Testowana jest zgodność z rozkładem normalnym.</b>												

Tabela 9. Statystyki opisowe oraz rozkłady badanych pomiarów w podziale na typ raka w każdej z grup lokalizacji (G – guz zlokalizowany na głowie, Tł – guz zlokalizowany na tułowiu)

GRUPA		KOL I T	KOL I NT	KOL III T	KOL III NT	KOL IV T	KOL IV NT	MMP-2 T	MMP-2 NT	MMP-9 T	MMP-9 NT	
GUZKOWY	LOKALIZACJA G	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,764	,632	,821	,808	,769	1,235	,664	,756	<b>1,379</b>	,856
		Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,603	,819	,510	,532	,595	,095	,771	,617	<b>,045</b>	,457
	LOKALIZACJA Tł	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,468	,514	,678	,441	,564	,553	,914	,579	,590	1,148
		Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,981	,954	,748	,990	,908	,920	,374	,891	,877	,143
NACIEKAJĄCY	LOKALIZACJA G	Z Kołmogorowa-Smirnowa	,746	,967	1,187	,532	,607	,749	<b>2,119</b>	1,107	,983	,678
		Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,634	,307	,119	,940	,855	,628	<b>,000</b>	,172	,289	,748
<b>Testowana jest zgodność z rozkładem normalnym.</b>												

Tabela 10. Statystyki opisowe oraz rozkłady badanych pomiarów w podziale na typ raka w każdej z grup w podziale na rodzaj fototypu

GRUPA		KOL I T	KOL I NT	KOL III T	KOL III NT	KOL IV T	KOL IV NT	MMP-2 T	MMP-2 NT	MMP-9 T	MMP-9 NT	
GUZKOWY	FOTOTYP II	Z Kołmogoro- wa-Smirnowa	,503	,551	,639	,664	,430	,525	,672	,602	,850	,541
		Istotność asympotyczna (dwustronna)	,962	,921	,809	,770	,993	,945	,757	,862	,465	,931
	FOTOTYP III	Z Kołmogoro- wa-Smirnowa	1,088	,611	,639	,558	,747	1,071	,791	,685	1,200	,692
		Istotność asympotyczna (dwustronna)	,188	,849	,808	,915	,632	,202	,559	,736	,112	,724
	FOTOTYP IV	Z Kołmogoro- wa-Smirnowa	,388	,685	,668	,625	,722	,741	,586	,813	,547	,978
		Istotność asympotyczna (dwustronna)	,998	,736	,763	,829	,674	,643	,883	,522	,926	,294
NACIEKAJĄCY	FOTOTYP II	Z Kołmogoro- wa-Smirnowa	,567	,691	,676	,485	,491	,453	,810	,823	,576	,539
		Istotność asympotyczna (dwustronna)	,904	,727	,750	,973	,969	,986	,528	,508	,895	,934
	FOTOTYP III	Z Kołmogoro- wa-Smirnowa	1,009	,688	,921	,503	,506	,713	,989	,906	,609	,683
		Istotność asympotyczna (dwustronna)	,261	,731	,365	,962	,960	,690	,282	,385	,852	,739
	FOTOTYP IV	Z Kołmogoro- wa-Smirnowa	,644	,677	,821	,469	,721	,566	,988	,639	1,211	,778
		Istotność asympotyczna (dwustronna)	,802	,749	,510	,980	,675	,906	,283	,810	,106	,581
<b>Testowana jest zgodność z rozkładem normalnym.</b>												

## 4.2. Zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC pomiędzy próbkami tkanki nowotworowej (T), a próbkami tkanki zdrowej pobranej z marginesu guza (NT) od tych samych pacjentów

W celu weryfikacji problemu badawczego, przeprowadzono serię analiz testem t Studenta dla prób zależnych, w obydwu grupach pacjentów z rakiem podstawnokomórkowym guzkowym i odmianą naciekającą BCC, podzielonych wg typu raka. Analiza wykazała, że istotna różnica pomiędzy pomiarami wystąpiła w każdym z parametrów w obydwu grupach.

W grupie pacjentów z rakiem guzkowym ekspresja mRNA dla KOL I z ognisk guza (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla KOL I ze skóry zdrowej otoczenia guza (NT); ekspresja mRNA dla KOL III (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla KOL III (NT); ekspresja mRNA dla KOL IV (T) była niższa niż dla KOL IV (NT); ekspresja mRNA dla MMP-2 (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla MMP-2 (NT); ekspresja mRNA dla MMP-9 (T) była wyższa niż MMP-9 (NT).

W grupie pacjentów z rakiem podstawnokomórkowym odmiany naciekającej analiza testem t Studenta wykazała wyniki podobne: ekspresja mRNA dla KOL I (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla KOL I (NT); ekspresja mRNA dla KOL III (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla KOL III (NT); ekspresja mRNA dla KOL IV (T) była niższa niż dla KOL IV (NT); ekspresja mRNA dla MMP-2 (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla MMP-2 (NT); ekspresja mRNA dla MMP-9 (T) była wyższa niż MMP-9 (NT).

Wyniki przedstawia tabela 11 i 12.

Tabela 11. Statystyki opisowe badanych parametrów ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC

GRUPA		ŚREDNIA	ODCHYLENIE STANDARDOWE	BŁĄD STANDARDOWY ŚREDNIEJ
GUZKOWY	KOL I T	1,47	,25	,04
	KOL I NT	,41	,12	,02
	KOL III T	,56	,12	,02
	KOL III NT	,12	,03	,00
	KOL IV T	13,64	2,57	,38
	KOL IV NT	19,51	4,12	,61
	MMP-2 T	,84	,12	,02
	MMP-2 NT	,29	,08	,01
	MMP-9 T	,34	,16	,02
	MMP-9 NT	,07	,03	,00
NACIEKAJĄCY	KOL I T	,85	,23	,04
	KOL I NT	,46	,21	,03
	KOL III T	,26	,09	,01
	KOL III NT	,11	,03	,01
	KOL IV T	14,40	2,75	,44
	KOL IV NT	42,11	12,43	1,97
	MMP-2 T	,94	,28	,04
	MMP-2 NT	,23	,09	,01
	MMP-9 T	,52	,16	,03
	MMP-9 NT	,06	,01	,00

Tabela 12. Różnice pomiędzy pomiarami ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 pod względem badanych parametrów w grupie T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC wraz z wynikami testu t Studenta i istotnością

GRUPA		RÓŻNICE W PRÓBACH ZALEŻNYCH					T	ISTOTNOŚĆ (DWU- STRONNA)
		ŚREDNIA	ODCHYLE- NIE STAN- DAROWE	BŁĄD STANDAR- DOWY ŚREDNIEJ	95% PRZEDZIAŁ UFNOŚCI DLA RÓŻNICY ŚREDNICH			
					DOLNA GRANICA	GÓRNA GRANICA		
GUZKOWY	KOL I T – KOL I NT	1,06	,27	,04	,98	1,14	26,58	,000
	KOL III T – KOL III NT	,44	,13	,02	,40	,48	23,33	,000
	KOL IV T – KOL IV NT	5,87	3,27	,49	4,89	6,85	12,05	,000
	MMP-2 T – MMP-2 NT	,55	,12	,02	,51	,58	31,26	,000
	MMP-9 T – MMP-9 NT	,27	,16	,02	,22	,32	11,64	,000
NACIEKAJĄCY	KOL I T – KOL I NT	,39	,20	,03	,33	,45	12,60	,000
	KOL III T – KOL III NT	,15	,09	,01	,12	,18	10,44	,000
	KOL IV T – KOL IV NT	27,71	12,83	2,03	23,61	31,82	13,66	,000
	MMP-2 T – MMP-2 NT	,71	,31	,05	,61	,81	14,42	,000
	MMP-9 T – MMP-9 NT	,45	,16	,03	,40	,51	17,84	,000

### 4.3. Zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 oznaczanych w tkance nowotworowej (T), w raku podstawnokomórkowym guzkowym w stosunku do raka naciekającego oraz tych samych parametrów oznaczanych w tkance zdrowej pobranej z marginesu guza (NT) raka guzkowego w stosunku do raka naciekającego

W celu weryfikacji problemu badawczego przeprowadzono analizę testem t Studenta dla prób niezależnych. Analiza wykazała, że poziom ekspresji mRNA dla KOL I (T) i KOL III (T) u chorych z rakiem guzkowym był istotnie wyższy niż u chorych z odmianą naciekającą. W przypadku ekspresji mRNA dla KOL IV (T) badani z rakiem guzkowym mieli niższy jego poziom niż w odmianie naciekającej w próbkach (T), a istotnie niższy w próbkach (NT). Poziom ekspresji mRNA dla MMP-2 (T) w raku guzkowym był istotnie niższy niż poziom ekspresji mRNA dla MMP-2 (T) w odmianie naciekającej.

Natomiast ekspresja mRNA dla MMP-2 (NT) w raku guzkowym wykazała istotnie wyższy poziom niż ekspresja mRNA dla MMP-2 (NT) w odmianie naciekającej BCC. Kolejna analiza wykazała, że badani w grupie z rakiem guzkowym mieli istotnie niższy poziom ekspresji mRNA dla MMP-9 (T) niż był poziom ekspresji mRNA dla MMP-9 (T) w raku naciekającym.

Wyniki analiz przedstawia tabela 13 oraz 14.



Tabela 13. Statystyki opisowe badanych parametrów ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC

PARAMETR	RODZAJ BCC	ŚREDNIA	ODCHYLENIE STANDARDOWE	BŁĄD STANDARDOWY ŚREDNIEJ
KOL I T	GUZKOWY	<b>1,47</b>	<b>,25</b>	<b>,04</b>
	NACIEKAJĄCY	<b>,85</b>	<b>,23</b>	<b>,04</b>
KOL I NT	GUZKOWY	,41	,12	,02
	NACIEKAJĄCY	,46	,21	,03
KOL III T	GUZKOWY	<b>,56</b>	<b>,12</b>	<b>,02</b>
	NACIEKAJĄCY	<b>,26</b>	<b>,09</b>	<b>,01</b>
KOL III NT	GUZKOWY	,12	,03	,00
	NACIEKAJĄCY	,11	,03	,01
KOL IV T	GUZKOWY	13,64	2,57	,38
	NACIEKAJĄCY	14,40	2,75	,44
KOL IV NT	GUZKOWY	<b>19,51</b>	<b>4,12</b>	<b>,61</b>
	NACIEKAJĄCY	<b>42,11</b>	<b>12,43</b>	<b>1,97</b>
MMP-2 T	GUZKOWY	<b>,84</b>	<b>,12</b>	<b>,02</b>
	NACIEKAJĄCY	<b>,94</b>	<b>,28</b>	<b>,04</b>
MMP-2 NT	GUZKOWY	<b>,29</b>	<b>,08</b>	<b>,01</b>
	NACIEKAJĄCY	<b>,23</b>	<b>,09</b>	<b>,01</b>
MMP-9 T	GUZKOWY	<b>,34</b>	<b>,16</b>	<b>,02</b>
	NACIEKAJĄCY	<b>,52</b>	<b>,16</b>	<b>,03</b>
MMP-9 NT	GUZKOWY	,07	,03	,00
	NACIEKAJĄCY	,06	,01	,00

Tabela 14. Różnice pomiędzy pomiarami ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 pod względem badanych parametrów w grupie T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC wraz z wynikami testu t Studenta i istotnością

PARAMETR	T	ISTOTNOŚĆ (DWUSTRONNA)	RÓŻNICA ŚREDNICH	BŁĄD STANDARDOWY RÓŻNICY	95% PRZEDZIAŁ UFNOŚCI DLA RÓŻNICY ŚREDNICH	
					Dolna granica	Górna granica
KOL I T	<b>12,06</b>	<b>,000</b>	,62	,05	,52	,72
KOL I NT	-1,22	,224	-,04	,04	-,12	,03
KOL III T	<b>12,49</b>	<b>,000</b>	,30	,02	,25	,34
KOL III NT	,89	,373	,01	,01	-,01	,02
KOL IV T	-1,32	,191	-,76	,58	-1,91	,39
KOL IV NT	<b>-11,52</b>	<b>,000</b>	-22,60	1,96	-26,51	-18,70
MMP-2 T	<b>-2,06</b>	<b>,043</b>	-,09	,05	-,19	,00
MMP-2 NT	<b>3,61</b>	<b>,001</b>	,07	,02	,03	,10
MMP-9 T	<b>-5,05</b>	<b>,000</b>	-,18	,04	-,25	-,11
MMP-9 NT	1,49	,139	,01	,01	,00	,02

#### 4.4. Zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej pomiędzy tkanką nowotworową (T), a tkanką zdrową, pobraną z marginesu guza (NT) u pacjentów w poszczególnych przedziałach wiekowych

W celu weryfikacji problemu badawczego, przeprowadzono serię analiz testem t Studenta dla prób zależnych, w obydwu grupach raka podstawnokomórkowego skóry tj. w grupie chorych z rakiem podstawnokomórkowym guzkowym i w odmianie naciekającej BCC.

Analiza ta wykazała, że istotna różnica pomiędzy pomiarami wystąpiła w każdym z parametrów, tzn. w ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV, MMP-2 i MMP-9 w obydwu grupach raka BCC oraz w każdej grupie wiekowej. Wśród chorych z rakiem guzkowym badani zakwalifikowani do grupy wiekowej osób mających mniej niż 68 lat, mieli wyższy poziom ekspresji mRNA dla KOL I (T) niż ekspresja mRNA dla KOL I (NT), ekspresja mRNA dla KOL III (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla KOL III (NT), ekspresja mRNA dla KOL IV (T) była niższa niż dla KOL IV (NT), ekspresja mRNA dla MMP-2 (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla MMP-2 (NT), ekspresja mRNA dla MMP-9 (T) była wyższa niż dla MMP-9 (NT).

Analiza wykazała, że podobne wyniki różnic pomiędzy pomiarami miały osoby w przedziale wiekowym 69-78 lat oraz w wieku powyżej lat 79. We wszystkich grupach wiekowych poziom wszystkich parametrów T był wyższy niż NT, z wyjątkiem ekspresji mRNA dla KOL IV.

W grupie badanych z rakiem naciekającym, chorzy mający mniej niż 68 lat, osoby w przedziale wiekowym 69-78 lat oraz osoby w wieku powyżej lat 79 miały zawsze wyższe wartości parametrów oznaczanych w tkance nowotworowej (T) niż wartości parametrów oznaczanych w tkance zdrowej pochodzącej z marginesu guza (NT) u tych samych pacjentów, z wyjątkiem ekspresji mRNA dla KOL IV.

Wyniki przedstawia tabela 15 oraz 16.

Tabela 15. Statystyki opisowe badanych parametrów ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC w podziale na grupy wiekowe

GRUPA		ŚREDNIA	ODCHYLENIE STANDARDOWE	BŁĄD STANDARDOWY ŚREDNIEJ	
GUZKOWY	≤68 LAT	KOL I T	1,50	,20	,07
		KOL I NT	,45	,13	,04
		KOL III T	,56	,16	,05
		KOL III NT	,10	,02	,01
		KOL IV T	13,04	2,12	,71
		KOL IV NT	19,63	3,43	1,14
		MMP-2 T	,79	,13	,04
		MMP-2 NT	,24	,06	,02
		MMP-9 T	,32	,09	,03
		MMP-9 NT	,06	,02	,01
	69-78 LAT	KOL I T	1,49	,26	,06
		KOL I NT	,38	,11	,02
		KOL III T	,56	,11	,02
		KOL III NT	,13	,02	,01
		KOL IV T	13,95	3,00	,66
		KOL IV NT	19,69	4,74	1,03
		MMP-2 T	,83	,10	,02
		MMP-2 NT	,30	,07	,01
		MMP-9 T	,38	,17	,04
		MMP-9 NT	,07	,03	,01
	79+ LAT	KOL I T	1,43	,25	,06
		KOL I NT	,45	,14	,04
		KOL III T	,55	,13	,03
		KOL III NT	,12	,03	,01
		KOL IV T	13,55	2,23	,58
		KOL IV NT	19,19	3,78	,98
		MMP-2 T	,90	,14	,04
		MMP-2 NT	,32	,09	,02
		MMP-9 T	,30	,18	,05
		MMP-9 NT	,07	,03	,01

GRUPA		ŚREDNIA	ODCHYLENIE STANDARDOWE	BŁĄD STANDARDOWY ŚREDNIEJ	
NACIEKAJĄCY	≤68 LAT	KOL I T	,89	,20	,04
		KOL I NT	,48	,20	,04
		KOL III T	,25	,09	,02
		KOL III NT	,11	,03	,01
		KOL IV T	14,89	2,40	,52
		KOL IV NT	42,48	12,48	2,72
		MMP-2 T	,94	,29	,06
		MMP-2 NT	,22	,07	,02
		MMP-9 T	,51	,14	,03
		MMP-9 NT	,07	,01	,00
	69 - 78 LAT	KOL I T	,82	,30	,09
		KOL I NT	,42	,22	,07
		KOL III T	,23	,07	,02
		KOL III NT	,12	,04	,01
		KOL IV T	14,38	3,70	1,12
		KOL IV NT	40,04	11,50	3,47
		MMP-2 T	,94	,36	,11
		MMP-2 NT	,27	,13	,04
		MMP-9 T	,55	,20	,06
		MMP-9 NT	,05	,01	,00
	79+ LAT	KOL I T	,78	,18	,06
		KOL I NT	,46	,22	,08
		KOL III T	,31	,10	,04
		KOL III NT	,12	,05	,02
		KOL IV T	13,14	1,94	,69
		KOL IV NT	44,00	14,68	5,19
		MMP-2 T	,92	,05	,02
		MMP-2 NT	,18	,04	,02
		MMP-9 T	,51	,17	,06
		MMP-9 NT	,07	,01	,00

Tabela 16. Różnice pomiędzy pomiarami ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 pod względem badanych parametrów w grupie T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC wraz z wynikami testu t Studenta w poszczególnych grupach wiekowych wraz z wynikami testu t Studenta i istotnością

GRUPA		RÓŻNICE W PRÓBACH ZALEŻNYCH					T	ISTOTNOŚĆ (DWUSTRONNA)	
		Średnia	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej	95% przedział ufności dla różnicy średnich				
					Dolna granica	Górna granica			
GUZKOWY	≤68 LAT	KOL I T - KOL I NT	1,05	,24	,08	,87	1,24	<b>13,03</b>	<b>,000</b>
		KOL III T - KOL III NT	,46	,17	,06	,33	,59	<b>8,36</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T - KOL IV NT	6,58	3,52	1,17	3,88	9,29	<b>5,62</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T - MMP-2 NT	,55	,09	,03	,48	,61	<b>18,89</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T - MMP-9 NT	,26	,10	,03	,18	,34	<b>7,77</b>	<b>,000</b>
	69-78 LAT	KOL I T - KOL I NT	1,11	,28	,06	,99	1,24	<b>18,48</b>	<b>,000</b>
		KOL III T - KOL III NT	,43	,11	,02	,38	,48	<b>17,66</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T - KOL IV NT	5,74	3,10	,68	4,32	7,15	<b>8,47</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T - MMP-2 NT	,52	,10	,02	,48	,57	<b>22,86</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T - MMP-9 NT	,31	,17	,04	,23	,38	<b>8,29</b>	<b>,000</b>
	79+ LAT	KOL I T - KOL I NT	,98	,27	,07	,83	1,13	<b>14,31</b>	<b>,000</b>
		KOL III T - KOL III NT	,44	,13	,03	,37	,51	<b>13,37</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T - KOL IV NT	5,64	3,52	,91	3,69	7,58	<b>6,21</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T - MMP-2 NT	,58	,15	,04	,50	,66	<b>15,52</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T - MMP-9 NT	,23	,16	,04	,14	,32	<b>5,46</b>	<b>,000</b>

GRUPA			RÓŻNICE W PRÓBACH ZALEŻNYCH					T	ISTOTNOŚĆ (DWU- STRONNA)
			Śred- nia	Odchyle- nie stan- dardowe	Błąd stan- dardowy średniej	95% przedział ufności dla różnicy średnich			
						Dolna granica	Górna granica		
NACIEKAJĄCY	≤68 LAT	KOL I T – KOL INT	,41	,19	,04	,33	,50	<b>9,97</b>	<b>,000</b>
		KOL III T – KOL III NT	,15	,08	,02	,11	,19	<b>8,17</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T – KOL IV NT	27,59	13,04	2,85	21,65	33,53	<b>9,70</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T – MMP-2 NT	,72	,31	,07	,58	,86	<b>10,47</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T – MMP-9 NT	,44	,13	,03	,38	,50	<b>15,02</b>	<b>,000</b>
	69-78 LAT	KOL I T – KOL INT	,40	,25	,07	,23	,57	<b>5,34</b>	<b>,000</b>
		KOL III T – KOL III NT	,11	,06	,02	,07	,15	<b>6,02</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T – KOL IV NT	25,66	12,38	3,73	17,34	33,97	<b>6,88</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T – MMP-2 NT	,67	,42	,13	,39	,94	<b>5,31</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T – MMP-9 NT	,49	,20	,06	,36	,63	<b>8,07</b>	<b>,000</b>
	79+ LAT	KOL I T – KOL INT	,32	,13	,05	,21	,43	<b>7,06</b>	<b>,000</b>
		KOL III T – KOL III NT	,19	,12	,04	,09	,29	<b>4,51</b>	<b>,003</b>
		KOL IV T – KOL IV NT	30,86	13,97	4,94	19,18	42,53	<b>6,25</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T – MMP-2 NT	,74	,06	,02	,69	,79	<b>35,20</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T – MMP-9 NT	,44	,18	,06	,30	,59	<b>7,09</b>	<b>,000</b>

#### 4.5. Zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i naciekającym pomiędzy tkanką nowotworową (T), a tkanką zdrową pobraną z marginesu guza (NT) u pacjentów wg podziału na rodzaje fototypów w skali Fitzpatricka (fototyp II, fototyp III, fototyp IV)

W celu weryfikacji problemu badawczego przeprowadzono serię analiz testem t Studenta dla prób zależnych w obydwu grupach raka. Analiza wykazała, że istotna różnica pomiędzy pomiarami wystąpiła w każdym z parametrów w obydwu grupach raka oraz w każdej grupie fototypowej.

Wśród badanych, u których zdiagnozowano raka guzkowego, osoby z fototypem II miały istotnie wyższy wynik ekspresji mRNA dla KOL I (T) niż ekspresji mRNA dla KOL I (NT), ekspresja mRNA dla KOL III (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla KOL III (NT), ekspresja mRNA dla KOL IV (T) była niższa niż dla KOL IV (NT), ekspresja mRNA dla MMP-2 (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla MMP-2 (NT), ekspresja mRNA dla MMP-9 (T) była wyższa niż MMP-9 (NT). Wykazano, że podobne wyniki istotnych różnic pomiędzy pomiarami miały osoby w grupie fototypu III oraz w grupie fototypu IV.

Stwierdzono, że podobne wyniki istotnych różnic pomiędzy pomiarami miały osoby w grupie fototypu II, fototypu III oraz w grupie fototypu IV wśród badanych ze zdiagnozowaną odmianą naciekającą BCC.

Wyniki przedstawia tabela 17 oraz 18.



Tabela 17. Statystyki opisowe badanych parametrów ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC w podziale na grupy fototypów

GRUPA		ŚREDNIA	ODCHYLENIE STANDARDOWE	BŁĄD STANDARDOWY ŚREDNIEJ	
GUZKOWY	FOTOTYP II	KOL I T	1,47	,14	,05
		KOL I NT	,47	,11	,04
		KOL III T	,50	,13	,05
		KOL III NT	,13	,03	,01
		KOL IV T	12,84	1,96	,69
		KOL IV NT	17,79	2,54	,90
		MMP-2 T	,88	,06	,02
		MMP-2 NT	,32	,04	,02
		MMP-9 T	,31	,09	,03
	MMP-9 NT	,07	,01	,00	
	FOTOTYP III	KOL I T	1,51	,27	,05
		KOL I NT	,41	,12	,02
		KOL III T	,55	,11	,02
		KOL III NT	,11	,02	,00
		KOL IV T	14,46	2,73	,56
		KOL IV NT	20,28	4,64	,95
		MMP-2 T	,86	,12	,02
		MMP-2 NT	,29	,08	,02
		MMP-9 T	,38	,21	,04
	MMP-9 NT	,07	,03	,01	
	FOTOTYP IV	KOL I T	1,40	,26	,07
		KOL I NT	,39	,14	,04
		KOL III T	,59	,13	,04
		KOL III NT	,12	,03	,01
		KOL IV T	12,60	2,18	,61
		KOL IV NT	19,14	3,71	1,03
		MMP-2 T	,79	,15	,04
		MMP-2 NT	,28	,08	,02
		MMP-9 T	,29	,04	,01
	MMP-9 NT	,06	,03	,01	

GRUPA		ŚREDNIA	ODCHYLENIE STANDARDOWE	BŁĄD STANDARDOWY ŚREDNIEJ	
NACIEKAJĄCY	FOTOTYP II	KOL I T	,88	,32	,12
		KOL I NT	,44	,21	,08
		KOL III T	,25	,13	,05
		KOL III NT	,11	,02	,01
		KOL IV T	14,49	3,05	1,15
		KOL IV NT	44,80	15,25	5,76
		MMP-2 T	,93	,32	,12
		MMP-2 NT	,26	,13	,05
		MMP-9 T	,53	,17	,06
		MMP-9 NT	,07	,02	,01
	FOTOTYP III	KOL I T	,85	,23	,05
		KOL I NT	,43	,19	,04
		KOL III T	,27	,09	,02
		KOL III NT	,11	,04	,01
		KOL IV T	13,86	2,29	,49
		KOL IV NT	43,39	12,51	2,67
		MMP-2 T	,88	,09	,02
		MMP-2 NT	,22	,09	,02
		MMP-9 T	,55	,18	,04
		MMP-9 NT	,06	,01	,00
	FOTOTYP IV	KOL I T	,83	,17	,05
		KOL I NT	,53	,23	,07
		KOL III T	,25	,08	,02
		KOL III NT	,11	,03	,01
		KOL IV T	15,42	3,35	1,01
		KOL IV NT	37,83	10,28	3,10
		MMP-2 T	1,06	,45	,14
		MMP-2 NT	,22	,07	,02
		MMP-9 T	,44	,10	,03
		MMP-9 NT	,06	,01	,00

Tabela 18. Różnice pomiędzy pomiarami ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 pod względem badanych parametrów w grupie T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC w poszczególnych grupach fototypów wraz z wynikami testu t Studenta i istotnością

GRUPA			RÓŻNICE W PRÓBACH ZALEŻNYCH					T	ISTOTNOŚĆ (DWUSTRONNA)
			Średnia	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej	95% przedział ufności dla różnicy średnich			
						Dolna granica	Górna granica		
GUZKOWY	FOTOTYP II	KOL I T – KOL I NT	1,01	,20	,07	,84	1,17	<b>14,50</b>	<b>,000</b>
		KOL III T – KOL III NT	,38	,13	,05	,27	,49	<b>8,11</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T – KOL IV NT	4,95	1,72	,61	3,50	6,39	<b>8,11</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T – MMP-2 NT	,56	,03	,01	,54	,59	<b>49,68</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T – MMP-9 NT	,24	,08	,03	,17	,30	<b>8,13</b>	<b>,000</b>
	FOTOTYP III	KOL I T – KOL I NT	1,10	,29	,06	,98	1,22	<b>18,90</b>	<b>,000</b>
		KOL III T – KOL III NT	,44	,11	,02	,39	,49	<b>19,09</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T – KOL IV NT	5,82	3,34	,68	4,40	7,23	<b>8,52</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T – MMP-2 NT	,56	,11	,02	,51	,61	<b>24,03</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T – MMP-9 NT	,30	,20	,04	,22	,39	<b>7,36</b>	<b>,000</b>
	FOTOTYP IV	KOL I T – KOL I NT	1,01	,27	,08	,84	1,17	<b>13,34</b>	<b>,000</b>
		KOL III T – KOL III NT	,47	,14	,04	,39	,56	<b>12,04</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T – KOL IV NT	6,55	3,87	1,07	4,21	8,88	<b>6,10</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T – MMP-2 NT	,51	,15	,04	,42	,61	<b>12,17</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T – MMP-9 NT	,23	,04	,01	,21	,25	<b>21,89</b>	<b>,000</b>

GRUPA			RÓŻNICE W PRÓBACH ZALEŻNYCH					T	ISTOTNOŚĆ (DWUSTRONNA)
			Średnia	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej	95% przedział ufności dla różnicy średnich			
						Dolna granica	Górna granica		
NACIEKAJĄCY	FOTOTYP II	KOL I T – KOL I NT	,44	,22	,08	,24	,64	<b>5,30</b>	<b>,002</b>
		KOL III T – KOL III NT	,13	,12	,05	,02	,25	<b>2,85</b>	<b>,029</b>
		KOL IV T – KOL IV NT	30,31	15,25	5,77	16,20	44,42	<b>5,26</b>	<b>,002</b>
		MMP-2 T – MMP-2 NT	,67	,35	,13	,35	,99	<b>5,08</b>	<b>,002</b>
		MMP-9 T – MMP-9 NT	,47	,16	,06	,32	,62	<b>7,70</b>	<b>,000</b>
	FOTOTYP III	KOL I T – KOL I NT	,43	,19	,04	,34	,51	<b>10,53</b>	<b>,000</b>
		KOL III T – KOL III NT	,16	,08	,02	,12	,19	<b>8,57</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T – KOL IV NT	29,54	12,95	2,76	23,80	35,27	<b>10,70</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T – MMP-2 NT	,65	,12	,03	,60	,71	<b>25,62</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T – MMP-9 NT	,49	,18	,04	,41	,57	<b>13,02</b>	<b>,000</b>
	FOTOTYP IV	KOL I T – KOL I NT	,29	,18	,05	,17	,41	<b>5,45</b>	<b>,000</b>
		KOL III T – KOL III NT	,14	,08	,02	,09	,19	<b>5,88</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T – KOL IV NT	22,41	10,39	3,13	15,43	29,39	<b>7,15</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T – MMP-2 NT	,84	,50	,15	,51	1,17	<b>5,61</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T – MMP-9 NT	,37	,10	,03	,31	,44	<b>12,54</b>	<b>,000</b>

#### 4.6. Zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC pomiędzy tkanką nowotworową (T), a tkanką zdrową pobraną z marginesu guza (NT) u pacjentów, w zależności od lokalizacji guza na głowie (G) i tułowie (Tł)

W celu weryfikacji problemu badawczego, przeprowadzono serię analiz testem t Studenta dla prób zależnych w obydwu grupach pacjentów z rakiem BCC guzkowym i odmianą naciekającą BCC. Analiza wykazała, że istotna różnica pomiędzy pomiarami wystąpiła w każdym z parametrów, w obydwu grupach raka oraz w każdej lokalizacji.

Wśród badanych, u których zdiagnozowano BCC guzkowy, zlokalizowany na głowie (lokalizacja G) występował istotnie wyższy wynik ekspresji mRNA dla KOL I (T) niż ekspresji mRNA dla KOL I (NT), ekspresja mRNA dla KOL III (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla KOL III (NT), ekspresja mRNA dla KOL IV (T) była niższa niż dla KOL IV (NT), ekspresja mRNA dla MMP-2 (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla MMP-2 (NT), ekspresja mRNA dla MMP-9 (T) była wyższa niż MMP-9 (NT). Analiza wykazała, że podobne wyniki istotnych różnic pomiędzy pomiarami miały osoby z rakiem guzkowym, u których guz występował na tułowie (lokalizacja Tł).

U badanych z odmianą naciekającą BCC guz zlokalizowany był wyłącznie na głowie (lokalizacja G) i chorzy ci mieli istotnie wyższy wynik ekspresji mRNA dla KOL I (T) niż ekspresja mRNA dla KOL I (NT), ekspresja mRNA dla KOL III (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla KOL III (NT), ekspresja mRNA dla KOL IV (T) była niższa niż dla KOL IV (NT), ekspresja mRNA dla MMP-2 (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla MMP-2 (NT), ekspresja mRNA dla MMP-9 (T) była wyższa niż MMP-9 (NT).

Wyniki przedstawiają tabele 19 oraz 20.

Tabela 19. Statystyki opisowe badanych parametrów ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC w podziale na lokalizację guza na głowie (G) i tułowiu (Tł)

GRUPA		ŚREDNIA	ODCHYLENIE STANDARDOWE	BŁĄD STANDARDOWY ŚREDNIEJ	
GUZKOWY	LOKALIZACJA G	KOL I T	1,49	,25	,05
		KOL I NT	,40	,11	,02
		KOL III T	,58	,12	,02
		KOL III NT	,12	,02	,00
		KOL IV T	13,57	2,68	,48
		KOL IV NT	19,94	4,35	,78
		MMP-2 T	,83	,11	,02
		MMP-2 NT	,28	,06	,01
		MMP-9 T	,37	,18	,03
		MMP-9 NT	,07	,03	,01
	LOKALIZACJA TŁ	KOL I T	1,43	,23	,06
		KOL I NT	,45	,15	,04
		KOL III T	,51	,12	,03
		KOL III NT	,12	,03	,01
		KOL IV T	13,78	2,42	,65
		KOL IV NT	18,55	3,49	,93
		MMP-2 T	,88	,15	,04
		MMP-2 NT	,32	,10	,03
		MMP-9 T	,26	,05	,01
MMP-9 NT	,06	,03	,01		

GRUPA		ŚREDNIA	ODCHYLENIE STANDARDOWE	BŁĄD STANDARDOWY ŚREDNIEJ	
NACIEKAJĄCY	LOKALIZACJA G	KOL I T	,85	,23	,04
		KOL I NT	,46	,21	,03
		KOL III T	,26	,09	,01
		KOL III NT	,11	,03	,01
		KOL IV T	14,40	2,75	,44
		KOL IV NT	42,11	12,43	1,97
		MMP-2 T	,94	,28	,04
		MMP-2 NT	,23	,09	,01
		MMP-9 T	,52	,16	,03
		MMP-9 NT	,06	,01	,00

Tabela 20. Różnice pomiędzy pomiarami ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 pod względem badanych parametrów w grupie T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC w poszczególnych lokalizacjach wraz z wynikami testu t Studenta i istotnością

GRUPA			RÓŻNICE W PRÓBACH ZALEŻNYCH					T	ISTOTNOŚĆ (DWUSTRONNA)
			Średnia	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej	95% przedział ufności dla różnicy średnich			
						Dolna granica	Górna granica		
GUZKOWY	LOKALIZACJA G	KOL I T - KOL I NT	1,09	,26	,05	,99	1,19	<b>22,95</b>	<b>,000</b>
		KOL III T - KOL III NT	,46	,12	,02	,42	,51	<b>21,49</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T - KOL IV NT	6,37	3,41	,61	5,12	7,62	<b>10,40</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T - MMP-2 NT	,54	,11	,02	,50	,58	<b>27,65</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T - MMP-9 NT	,30	,18	,03	,24	,37	<b>9,37</b>	<b>,000</b>
	LOKALIZACJA TŁ	KOL I T - KOL I NT	,98	,26	,07	,83	1,13	<b>13,96</b>	<b>,000</b>
		KOL III T - KOL III NT	,39	,13	,03	,31	,46	<b>11,27</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T - KOL IV NT	4,77	2,73	,73	3,19	6,35	<b>6,54</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T - MMP-2 NT	,56	,14	,04	,48	,63	<b>15,09</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T - MMP-9 NT	,20	,03	,01	,18	,22	<b>22,10</b>	<b>,000</b>
NACIEKAJĄCY	LOKALIZACJA G	KOL I T - KOL I NT	,39	,20	,03	,33	,45	<b>12,60</b>	<b>,000</b>
		KOL III T - KOL III NT	,15	,09	,01	,12	,18	<b>10,44</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T - KOL IV NT	27,71	12,83	2,03	23,61	31,82	<b>13,66</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T - MMP-2 NT	,71	,31	,05	,61	,81	<b>14,42</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T - MMP-9 NT	,45	,16	,03	,40	,51	<b>17,84</b>	<b>,000</b>



#### 4.7. Zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej pomiędzy tkanką nowotworową (T), a tkanką zdrową pobraną z marginesu guza (NT) u pacjentów w zależności od płci

W celu weryfikacji problemu badawczego przeprowadzono serię analiz testem t Studenta dla prób zależnych w obydwu grupach chorych. Analiza wykazała, że istotna różnica pomiędzy pomiarami ekspresji mRNA wystąpiła w każdym z parametrów, w obydwu grupach raka oraz dla każdej z płci.

U kobiet, u których zdiagnozowano rak guzkowy występował istotnie wyższy wynik ekspresji mRNA dla KOL I (T) niż ekspresji mRNA dla KOL I (NT), ekspresja mRNA dla KOL III (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla KOL III (NT), ekspresja mRNA dla KOL IV (T) była niższa niż dla KOL IV (NT), ekspresja mRNA dla MMP-2 (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla MMP-2 (NT), ekspresja mRNA dla MMP-9 (T) była wyższa niż MMP-9 (NT).

Analiza wykazała, że podobne wyniki istotnych różnic pomiędzy pomiarami mieli mężczyźni.

W przypadku raka naciekającego kobiety miały istotnie wyższy wynik ekspresji mRNA dla KOL I (T) niż ekspresji mRNA dla KOL I (NT), ekspresja mRNA dla KOL III (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla KOL III (NT), ekspresja mRNA dla KOL IV (T) była niższa niż dla KOL IV (NT), ekspresja mRNA dla MMP-2 (T) była wyższa niż ekspresja mRNA dla MMP-2 (NT), ekspresja mRNA dla MMP-9 (T) była wyższa niż MMP-9 (NT).

Analiza wykazała, że podobne wyniki istotnych różnic pomiędzy pomiarami mieli mężczyźni.

Wyniki przedstawiają tabele 21 oraz 22.

Tabela 21. Statystyki opisowe badanych parametrów ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnocomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC w grupie kobiet i mężczyzn

GRUPA		ŚREDNIA	ODCHYLENIE STANDARDOWE	BŁĄD STANDARDOWY ŚREDNIEJ	
GUZKOWY	KOBIECY	KOL I T	1,50	,23	,05
		KOL I NT	,41	,10	,02
		KOL III T	,54	,13	,03
		KOL III NT	,12	,03	,01
		KOL IV T	13,91	2,06	,49
		KOL IV NT	19,07	2,56	,60
		MMP-2 T	,82	,16	,04
		MMP-2 NT	,27	,08	,02
		MMP-9 T	,32	,10	,02
		MMP-9 NT	,07	,03	,01
	MĘŻCZYŹNI	KOL I T	1,45	,26	,05
		KOL I NT	,42	,14	,03
		KOL III T	,57	,12	,02
		KOL III NT	,12	,02	,00
		KOL IV T	13,45	2,89	,56
		KOL IV NT	19,80	4,92	,95
		MMP-2 T	,86	,10	,02
		MMP-2 NT	,31	,07	,01
		MMP-9 T	,35	,19	,04
		MMP-9 NT	,07	,03	,01

GRUPA		ŚREDNIA	ODCHYLENIE STANDARDOWE	BŁĄD STANDARDOWY ŚREDNIEJ	
NACIEKAJĄCY	KOBIECY	KOL I T	,83	,25	,06
		KOL I NT	,47	,20	,05
		KOL III T	,25	,08	,02
		KOL III NT	,12	,04	,01
		KOL IV T	15,28	3,47	,87
		KOL IV NT	37,96	7,99	2,00
		MMP-2 T	1,00	,36	,09
		MMP-2 NT	,26	,12	,03
		MMP-9 T	,52	,20	,05
		MMP-9 NT	,06	,01	,00
	MEŹCZYŹNI	KOL I T	,86	,21	,04
		KOL I NT	,45	,21	,04
		KOL III T	,27	,10	,02
		KOL III NT	,11	,03	,01
		KOL IV T	13,81	2,03	,42
		KOL IV NT	44,88	14,15	2,89
		MMP-2 T	,90	,21	,04
		MMP-2 NT	,21	,06	,01
		MMP-9 T	,52	,13	,03
		MMP-9 NT	,06	,01	,00

Tabela 22. Różnice pomiędzy pomiarami ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 pod względem badanych parametrów w grupie T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC u kobiet i mężczyzn wraz z wynikami testu t Studenta i istotnością

GRUPA			RÓŻNICE W PRÓBACH ZALEŻNYCH					T	ISTOTNOŚĆ (DWUSTRONNA)
			Średnia	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej	95% przedział ufności dla różnicy średnich			
						Dolna granica	Górna granica		
GUZKOWY	KOBIETY	KOL I T – KOL I NT	1,09	,18	,04	1,00	1,18	25,08	,000
		KOL III T – KOL III NT	,42	,14	,03	,35	,49	13,17	,000
		KOL IV T – KOL IV NT	5,16	2,52	,59	3,90	6,41	8,68	,000
		MMP-2 T – MMP-2 NT	,55	,15	,03	,47	,62	15,77	,000
		MMP-9 T – MMP-9 NT	,25	,10	,02	,20	,30	10,74	,000
	MĘŻCZYŹNI	KOL I T – KOL I NT	1,03	,31	,06	,91	1,16	17,28	,000
		KOL III T – KOL III NT	,45	,12	,02	,40	,50	19,42	,000
		KOL IV T – KOL IV NT	6,35	3,65	,70	4,90	7,79	9,03	,000
		MMP-2 T – MMP-2 NT	,55	,10	,02	,51	,59	29,69	,000
		MMP-9 T – MMP-9 NT	,28	,18	,04	,21	,36	7,97	,000

GRUPA			RÓŻNICE W PRÓBACH ZALEŻNYCH					T	ISTOT- NOŚĆ (DWU- STRONNA)
			Śred- nia	Odchylenie standardowe	Błąd stan- dardowy średniej	95% przedział ufności dla róż- nicy średnich			
						Dolna granica	Górna granica		
NACIEKAJĄCY	KOBIECY	KOL I T – KOL I NT	,36	,24	,06	,23	,49	<b>6,04</b>	<b>,000</b>
		KOL III T – KOL III NT	,13	,08	,02	,09	,17	<b>6,69</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T – KOL IV NT	22,68	8,94	2,23	17,92	27,44	<b>10,15</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T – MMP-2 NT	,74	,41	,10	,52	,96	<b>7,15</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T – MMP-9 NT	,46	,20	,05	,35	,57	<b>9,07</b>	<b>,000</b>
	MEŻCZYŹNI	KOL I T – KOL I NT	,41	,16	,03	,34	,48	<b>12,28</b>	<b>,000</b>
		KOL III T – KOL III NT	,16	,10	,02	,12	,20	<b>8,16</b>	<b>,000</b>
		KOL IV T – KOL IV NT	31,07	14,07	2,87	25,13	37,01	<b>10,82</b>	<b>,000</b>
		MMP-2 T – MMP-2 NT	,69	,23	,05	,59	,79	<b>14,84</b>	<b>,000</b>
		MMP-9 T – MMP-9 NT	,45	,13	,03	,40	,51	<b>16,78</b>	<b>,000</b>

#### 4.8. Zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-2 i spadkiem ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV, w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC

W celu weryfikacji problemu badawczego przeprowadzono serię analiz testem korelacji Pearsona. Analiza wykazała w grupie raka guzkowego brak związku poziomu ekspresji mRNA dla MMP-2 (T) z poziomem ekspresji mRNA dla KOL IV (T). Stwierdzono także brak istotnego związku pomiędzy ekspresją mRNA dla MMP-2 (NT) a ekspresją mRNA dla KOL IV (NT).

W przypadku raka naciekającego analiza wykazała brak związku pomiędzy ekspresją mRNA dla MMP-2 (T) a ekspresją mRNA dla KOL IV (T). Stwierdzono jednak związek pomiędzy ekspresją mRNA dla MMP-2 (NT) a ekspresją mRNA dla KOL IV (NT)  $r=-0,35$ ;  $p=0,027$ , wraz ze spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla KOL IV (NT) rósł poziom ekspresji mRNA dla MMP-2 (NT). Siła tego związku była umiarkowana. Rezultaty analizy przedstawia tabela 23.

Tabela 23. Zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-2 i spadkiem ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV, w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC

GRUPA			KOL IV T	KOL IV NT
GUZKOWY	MMP-2 T	Korelacja Pearsona	,103	-
		Istotność (dwustronna)	,500	-
	MMP-2 NT	Korelacja Pearsona	-	,060
		Istotność (dwustronna)	-	,697
NACIEKAJĄCY	MMP-2 T	Korelacja Pearsona	,068	-
		Istotność (dwustronna)	,677	-
	MMP-2 NT	Korelacja Pearsona	-	-,350*
		Istotność (dwustronna)	-	,027
** . Korelacja jest istotna na poziomie 0.01 (dwustronnie).				
* . Korelacja jest istotna na poziomie 0.05 (dwustronnie).				

## 4.9. Zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-9 i spadkiem ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV, w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC

W celu weryfikacji problemu badawczego przeprowadzono serię analiz testem korelacji Pearsona. Analiza wykazała, że ekspresja mRNA dla KOL IV nie była powiązana z poziomem ekspresji mRNA dla MMP-9 w próbkach T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC. Wyniki przedstawiono w tabeli 24.

Tabela 24. Zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-9 i wzrostem ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV, w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC

GRUPA		KOL IV T	KOL IV NT	
GUZKOWY	MMP-9 T	Korelacja Pearsona	,100	-
		Istotność (dwustronna)	,513	-
	MMP-9 NT	Korelacja Pearsona	-	,191
		Istotność (dwustronna)	-	,210
NACIEKAJĄCY	MMP-9 T	Korelacja Pearsona	-,103	-
		Istotność (dwustronna)	,529	-
	MMP-9 NT	Korelacja Pearsona	-	,171
		Istotność (dwustronna)	-	,291
**. Korelacja jest istotna na poziomie 0.01 (dwustronnie).				
*. Korelacja jest istotna na poziomie 0.05 (dwustronnie).				

#### 4.10. Zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-2 i wzrostem ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, w raku guzkowym i naciekającej odmianie BCC

W celu weryfikacji problemu badawczego przeprowadzono serię analiz testem korelacji Pearsona. Analiza wykazała, że ekspresja mRNA KOL I nie była powiązana z poziomem ekspresji mRNA dla MMP- 2 w próbkach T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC. Wyniki przedstawiono w tabeli 25.

Tabela 25. Zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-2 i wzrostem ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC

GRUPA			KOL I T	KOL I NT
GUZKOWY	MMP-2 T	Korelacja Pearsona	-,049	-
		Istotność (dwustronna)	,749	-
	MMP-2 NT	Korelacja Pearsona	-	,202
		Istotność (dwustronna)	-	,183
NACIEKAJĄCY	MMP-2 T	Korelacja Pearsona	-,130	-
		Istotność (dwustronna)	,425	-
	MMP-2 NT	Korelacja Pearsona	-	,004
		Istotność (dwustronna)	-	,978
**. Korelacja jest istotna na poziomie 0.01 (dwustronnie).				
*. Korelacja jest istotna na poziomie 0.05 (dwustronnie).				



# 5. Dyskusja

## 5.1. Rak podstawnokomórkowy

Nowotwory stanowią istotny problem dla współczesnej medycyny [38]. Schorzenia te zajmują drugie miejsce wśród przyczyn zgonów na świecie [40,43]. Mimo wielu przeprowadzonych badań i stale wzrastającej wiedzy, patomechanizm choroby nowotworowej nadal nie jest do końca poznany. Trwają badania nad przyczynami oraz możliwościami diagnozy i leczenia. W tej grupie chorób znajdują się również nieczerniakowe raki skóry (NMSC), które są najczęściej występującymi nowotworami złośliwymi i stale notowany jest wzrost liczby zachorowań [49,52,125]. Spośród całej grupy raków NMSC duży odsetek, bo aż 75–80%, stanowi rak podstawnokomórkowy skóry (BCC) [6,59,67]. W Europie, Stanach Zjednoczonych i Australii częstość diagnozowania BCC w ostatnich latach dynamicznie wzrasta, szczególnie wśród osób rasy białej [35,58]. Pomimo wiarygodnych danych, że BCC najczęściej występuje w wieku starszym, współcześnie średnia wieku zachorowania na BCC ciągle się obniża, zdarza się nawet występowanie tego raka u nastolatków [52].

BCC charakteryzuje się powolnym wzrostem, a podstawową cechą kliniczną tego guza jest naciekanie okolicznych tkanek i niszczenie sąsiadujących struktur. W większości przypadków rak ten wykazuje niski stopień miejscowej złośliwości [14,67]. Guz BCC bardzo rzadko daje przerzuty i równie rzadko zagraża życiu pacjenta, mimo to przy kilkuletnim przebiegu choroby, znaczne zaawansowanie miejscowe guza może doprowadzić do zajęcia sąsiadujących tkanek, co jest szczególnie widoczne w obrębie twarzy [33,62]. BCC stanowi istotny problem ze względu na liczbę notowanych przypadków oraz lokalizację guza, głównie na twarzy, co w konsekwencji po szerokim wycięciu zaniedbanej zmiany, doprowadzić może do znacznych zniekształceń i deformacji anatomicznych [49,133]. Z tego powodu BCC staje się przyczyną poważnych defektów kosmetycznych, mających istotny wpływ na jakość życia chorych [18,63].

Ważny element stanowi diagnostyka BCC. Rak ten wykryty we wstępnym stadium choroby jest wyleczalny. Rak podstawnokomórkowy skóry z dużym prawdopodobieństwem zostaje rozpoznany podczas badania pacjenta [3,52]. Makroskopowa ocena guza najczęściej pozwala na trafne rozpoznanie. W przypadku jednak wątpliwości, co do słuszności postawionej diagnozy, pozostaje potwierdzenie poprzez analizę histopatologiczną [67]. Pobranie bioptatu ze zmiany ułatwia podjęcie

właściwej decyzji co do dalszego sposobu leczenia i przede wszystkim umożliwia wybór odpowiedniej techniki chirurgicznego usunięcia zmiany. Niestety, guz często nie jest usuwany w całości, co prowadzi do nawrotu choroby [61]. Przyczyną tego faktu są trudności w ocenie marginesu zmiany. Rozwój biologii molekularnej pozwolił na wprowadzenie nowego podejścia, zarówno do diagnostyki, jak i leczenia nowotworów [119,238]. Pobranie bioptatu pozwala również na wdrożenie technik biologii molekularnej w ocenie stopnia zaawansowania zmiany nowotworowej, a także umożliwia wyznaczenie granicy tkanki prawidłowej.

W niniejszej pracy badano ekspresję transkryptów mRNA dla kolagenów typu I, III i IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym skóry. Prowadzono ilościową ocenę dojrzałych transkryptów mRNA, co pozwala właściwie oceniać ekspresję białek, ponieważ biosynteza tych białek jest regulowana przede wszystkim na etapie transkrypcji i modyfikacji potranskrypcyjnej. Ekspresja genów rozpoczyna się od przepisania informacji genetycznej z genomowego DNA na RNA, a kończy biosyntezą białka na matrycy mRNA. Obecność mRNA w badanych tkankach jest zatem potwierdzeniem ekspresji genu. W wyniku translacji powstaje na matrycy mRNA białko, spełniające w komórce funkcje biologiczne. W trakcie ekspresji genu występują dwa etapy regulacji biosyntezy białka – modyfikacja potranskrypcyjna i modyfikacja potranslacyjna. Badanie transkryptów mRNA pozwala na ocenę jakości ekspresji genu po modyfikacji potranskrypcyjnej. Ocena ekspresji na poziomie RNA jest możliwa przy użyciu wielu metod biologii molekularnej.

W niniejszej pracy zastosowano szczególnie przydatną w tym zakresie technikę RT-PCR. Dzięki metodzie tej możliwe jest oszacowanie ekspresji RNA poprzez ilościową ocenę dojrzałych transkryptów mRNA (dzięki wykorzystaniu odpowiednich primerów). Stosowana w tym celu technika RT-PCR charakteryzuje się wysoką czułością, pozwalając na wykrycie śladowych nawet ilości mRNA.

W celu wykonania analiz pobrano bioptaty z ognisk guzów BCC guzkowego i odmiany naciekającej oraz z marginesu zdrowej tkanki u tych samych pacjentów. Na podstawie otrzymanych wyników oceniono jakość rozkładu dla wszystkich użytych parametrów. Dla zdecydowanej większości badanych parametrów stwierdzono rozkład normalny, stąd do analizy statystycznej użyto parametryczny test t Studenta. W przypadku oznaczeń poziomu ekspresji mRNA dla MMP-2 w odmianie naciekającej dla próbek pobranych z ognisk guza, w kilku wariantach tego oznaczenia (szczegółowe dane przedstawiono w rozdziale Wyniki na s. 71) oraz dla oznaczeń poziomu ekspresji mRNA dla MMP-9, próbek pobranych z ognisk guza w raku guzkowym w kilku wariantach tego oznaczenia (s. 71) uzyskano rozkład inny od normalnego. Jednakże nie zastosowano tu testu nieparametrycznego, ponieważ zawsze w parze oznaczanych parametrów tylko jeden pomiar nie wykazywał rozkładu normalnego.

Ponadto ze względu na liczebność prób, przy próbach  $N > 30$ , wraz ze wzrostem liczebności, większość parametrów zmierzała do rozkładu normalnego.

## 5.2. Ekspresja mRNA dla kolagenu typu I, III, IV i MMP-2 i MMP-9

Badano zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III i kolagenu typu IV oraz dla MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC pomiędzy próbkami tkanki nowotworowej, a próbkami tkanki zdrowej pobranej z marginesu guza od tych samych pacjentów.

W grupie pacjentów z rakiem guzkowym, ekspresja mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III oraz dla MMP-2 i MMP-9 była zawsze istotnie wyższa w tkankach guza niż w tkance zdrowej pobranej z marginesu guza u tych samych pacjentów. Natomiast poziom ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV był istotnie niższy w tkance guza niż w tkance pochodzącej z marginesu guza u tych samych pacjentów.

W grupie pacjentów z rakiem podstawnokomórkowym typu naciekającego analiza statystyczna wykazała wyniki podobne. Ekspresja mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III oraz dla MMP-2 i MMP-9 była zawsze istotnie wyższa w tkankach guza niż w tkance zdrowej pobranej z marginesu guza u tych samych pacjentów. Natomiast poziom ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV był istotnie niższy w tkance guza niż w tkance pochodzącej z marginesu guza u tych samych pacjentów.

Uzyskane dane wynikają z faktu, że kolagen typu IV stanowi barierę pomiędzy komórkami naskórka a strukturą skóry właściwej [5]. Bariera ta jest zabezpieczeniem przed naciekaniem poprzez komórki nowotworowe kolejnych warstw skóry i rozprzestrzenianiem się komórek nowotworowych w organizmie. Zarówno w raku guzkowym, jak i odmianie naciekającej, rozwijający się guz niszczy strukturę błony podstawnej, w tym przede wszystkim kolagen typu IV. Wiadomo, że kolagen typu IV jest składnikiem tkanki łącznej, buduje błony i blaszki podstawne w tkankach, tworzy struktury sieciowe w błonie podstawnej naskórka, a także znajduje się wokół włókien nerwowych i mięśniowych zawartych w skórze [17]. Największe ilości tego białka znajdują się w skórze i śródbłonku naczyń krwionośnych.

Enzymami katalizującymi proteolizę kolagenu typu IV, a tym samym niszczącymi barierę błony podstawnej są metaloproteinazy MMP-2 i MMP-9. Tworzące grupę żelatynaz, MMP-2 i MMP-9 posiadają charakterystyczną domenę katalityczną, dzięki której zdolne są do trawienia wszystkich składników błony podstawnej. Komórki nowotworowe, szczególnie nowotworów złośliwych, mogą wydzielać metaloproteinazy lub stymulować prawidłowe komórki do ich produkcji np. poprzez białko EMMPRIN [221,222]. Ponadto same transformowane komórki mają zdol-

ność syntezy metaloproteinaz [154]. Zwiększona proteoliza składników macierzy pozakomórkowej umożliwia wzrost guza, a także warunkuje przechodzenie komórek nowotworowych. Degradacja kolagenu typu IV, będącego głównym składnikiem błony podstawnej warunkuje migrację komórek nowotworowych do naczyń krwionośnych, a następnie do odległych tkanek i narządów, co w przypadku raka podstawnokomórkowego skóry ma miejsce rzadko [52]. Ponadto hydroliza białek ECM, w tym białek adhezyjnych, takich jak E-kadheryna powoduje zmniejszenie przylegania komórek nowotworowych do błony podstawnej. Zmiany w genotypie komórki, warunkujące odmienny fenotyp komórek nowotworowych, mogą być oceniane przez oznaczanie molekularnych markerów nowotworowych.

Struktura przestrzeni pozakomórkowej ulega ciągłym przemianom warunkowanym aktywnością enzymów proteolitycznych, w tym MMPs. Przeprowadzono wiele badań, które wykazały podwyższoną ekspresję metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w licznych przypadkach nowotworów złośliwych [45,112,148,216,217,239,240]. Zdaniem cytowanych Autorów ekspresja MMP-2 i MMP-9 może stanowić marker zmian nowotworowych. W obecnie przeprowadzonych badaniach uzyskano podobne wyniki, które pozwalają na formowanie takich samych wniosków. Według Vempati i wsp. [208], Zlatarovej i wsp. [148], Fu i wsp. [216], El-Khalawany i wsp. [117] i Vanjaka-Rogošić i wsp. [240] oznaczanie MMP-9 w BCC może stanowić marker molekularny dla zmian toczących się w tkance nowotworowej BCC. Ciurea i wsp. [103] natomiast uważają, że MMP-9 jest wskaźnikiem mało przydatnym w odróżnieniu guza od tkanki zdrowej i wskazują na inne markery molekularne, takie jak  $\beta$ -katenina czy MMP-13, szczególnie dla odróżniania typów BCC.

Innym markerem molekularnym w raku BCC wydaje się być COX -2, która jest obecna zarówno w zdrowej skórze, w łagodnych rozrostach naskórka, a także w nowotworach złośliwych skóry [69]. COX-2 ulega ekspresji również w innych rodzajach nowotworów, a poziom ekspresji, koreluje z ich inwazyjnością. Fakt ten wskazuje na to, że COX-2, spełnia istotną rolę zarówno w rozwoju jak i progresji guza [106,107,108,109]. Można zatem sugerować, że oznaczanie COX-2 mogłoby posłużyć jako marker odróżniający tkankę guza od tkanki zdrowej przy zabiegu chirurgicznym usunięcia guza BCC [57,117].

Varani i wsp. [241] podjęli się oceny aktywności MMPs względem lokalizacji, biorąc pod uwagę: naskórek, tkankę łączną oraz tkankę guza BCC. Zaobserwowano wysoką ekspresję MMP-9 w komórkach naskórka przylegających bezpośrednio do guza w stosunku do obecności tego enzymu w tkance guza czy tkance łącznej. Wydaje się to ważne z dwójakiego powodu. Po pierwsze lokalizacja MMP-9 w tkance otaczającej guz może świadczyć o tym, że ten enzym odpowiada za okołoguzową proteolizę tkanek warunkującą inwazyjność BCC. Jednak z drugiej strony niska obecność MMP-9 w pozostałych dwóch lokalizacjach może świadczyć o inhibicji

tego enzymu poprzez efektywne działanie TIMP-1, który to reguluje aktywność tego enzymu na skutek wytworzenia kompleksu enzym-inhibitor lub eliminację MMP-9. W niniejszej pracy poziom ekspresji mRNA dla MMP-9 był również wysoki w guzie. Może to wynikać z faktu, że Varani i wsp. [241] badali ekspresję białek, a w przedstawionej obecnie pracy badana była ekspresja mRNA – matrycy, na której po translacji powstaje białko, podlegające jeszcze modyfikacji potranslacyjnej poprzez TIMPs. W procesie powstawania nowotworu następuje zwiększenie ekspresji genów MMPs oraz wzrost aktywności enzymatycznej MMPs. Wzrost ekspresji genów związany jest z regulacją na poziomie transkrypcji poprzez czynniki transkrypcyjne takie jak AP-1 i AP-2. W komórkach nowotworowych dochodzi do nasilenia procesów aktywacji nieczynnych form MMPs. Dodatkowo zmniejsza się ekspresja inhibitorów metaloproteinaz takich jak TIMPs czy  $\alpha_2$ -makroglobulina [191].

Varani i wsp. [241] rozpatrując lokalizacje MMP-2 zauważyli obecność tego enzymu zarówno w błonie podstawnej, jak i w komórkach zdrowego naskórka oraz guza BCC. Być może brak obecności TIMP-2 blokującego aktywność tej metaloproteiny determinuje tak rozległą lokalizację tego enzymu. Wyniki tych samych badań, wykonanych przez Varani i wsp. [241] potwierdzają, iż w tkance guza podobnie jak w tkance zdrowej występują zarówno formy latentne, jak i aktywne formy enzymu. W tkance guza dominuje głównie forma aktywna MMP-2 i MMP-9; natomiast w tkance zdrowej występują głównie formy latentne. Ekspresja genu *MMP-2* jest jedynie w ograniczony sposób modyfikowana przez czynniki transkrypcyjne, dlatego gen ten można traktować jako gen referencyjny. W obrębie sekwencji promotora *MMP-2* występują miejsca konserwatywne, charakterystyczne dla genów metabolizmu podstawowego czyli tzw. *housekeeping genes* [150,156,173]. W niniejszych badaniach potwierdzono, że ekspresja genu *MMP-2* pozostaje w komórkach zdrowych otaczających guz na porównywalnym poziomie w obu typach BCC, stąd też *MMP-2* może być traktowany w tkankach zdrowych jako gen referencyjny. Orimoto i wsp. [217] twierdzą, że MMP-2 jest wskaźnikiem bardzo przydatnym dla odróżnienia tkanki guza BCC od tkanek zdrowych otaczających guz. Chen i wsp. [230] natomiast uważają, że ekspresja MMP-2 jest hamowana w guzach BCC, stąd przydatność diagnostyczna oznaczeń dla MMP-2 zdaniem cytowanych Autorów jest dyskusyjna.

Wiadomo, że zarówno kolagen typu IV jak i metaloproteiny MMP-2 i MMP-9 biorą udział w procesie angiogenezy, który ma duże znaczenie w rozwoju zmian nowotworowych i tworzeniu nacieków [165,227]. Wzrost ekspresji mRNA dla metaloproteinaz, odzwierciedlający ekspresję tych enzymów w ECM, prowadzi do nadmiernej degradacji macierzy pozakomórkowej [156].

W prawidłowych warunkach proces degradacji składników ECM jest ściśle kontrolowany przez regulację ekspresji oraz aktywności enzymów proteolitycznych [154]. W warunkach patologicznych występujących w przypadku raka pod-

stawnokomórkowego kontrola ekspresji i aktywacji metaloproteinaz jest zaburzona [67].

W obecnej pracy stwierdzono, że ekspresja mRNA dla MMP-2 i MMP-9 była zawsze istotnie wyższa w tkankach guza raka BCC guzkowego oraz odmiany naciekającej BCC, niż w tkankach zdrowych pobranych z marginesu guza od tych samych pacjentów, co jednoznacznie sugeruje udział metaloproteinaz w procesie powstawania nowotworu. Powyższe zmiany w ekspresji metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 (odzwierciedlone ekspresją mRNA dla tych enzymów) powodują występowanie zaburzeń w równowadze błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej [225], przez co komórki śródbłonna mogą swobodnie wędrować, a ich kumulacja w obrębie nowotworu odzwierciedla się powstawaniem nowych naczyń krwionośnych. Przez te nowo powstałe naczynia dostarczane są do guza składniki odżywcze niezbędne do jego wzrostu [122,242].

### 5.3. BCC guzkowy a odmiana naciekająca

W niniejszej pracy badano również zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III i kolagenu typu IV oraz dla metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9, oznaczanych w tkance nowotworowej pobranej z ognisk guza BCC, w raku podstawnokomórkowym guzkowym w stosunku do odmiany naciekającej oraz tych samych parametrów oznaczanych w tkance zdrowej pobranej z marginesu guza raka guzkowego w stosunku do raka naciekającego.

Na podstawie analizy statystycznej uzyskanych wyników stwierdzono, że w grupie pacjentów z rakiem guzkowym poziom ekspresji mRNA dla kolagenów typu I i III w tkankach pobranych z ognisk guza był istotnie wyższy niż u chorych z odmianą naciekającą. Stan ten wynika z faktu, że BCC typu guzkowego jest odizolowany od reszty tkanek otoczką kolagenową, która ogranicza złośliwość tego guza, co ma przełożenie na poziom syntezy mRNA dla tych typów kolagenów. W skórze występuje najwięcej kolagenu typu I i III. Kolagen typu I stanowi 80% masy całego kolagenu skóry, a kolagen typu III stanowi 15% masy kolagenu skóry [2]. Kolagen typu III występuje w postaci włókien siateczkowych, aktywnie utrzymując połączenia między naskórkiem a skórą właściwą. Kolagen typu III zlokalizowany jest najczęściej koncentrycznie wokół naczyń krwionośnych oraz adipocytów. Włókna kolagenu typu III i kolagenu typu I tworzą gęstą sieć [6]. Powyższe proporcje poszczególnych typów kolagenów skóry zaobserwowano również w przedstawionej pracy w ocenie poziomów transkryptów mRNA, w tkankach pobranych z marginesu guza, w obu typach raka BCC.

W przypadku ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV w tkance nowotworowej chorzy z rakiem guzkowym mieli nieznacznie niższy poziom ekspresji niż w raku

naciekającym w próbkach pochodzących z ognisk guza [243,244]. Świadczy to o równoważeniu ekspresji kolagenu IV w związku ze znacząco większą inwazyjnością odmiany naciekającej BCC, w stosunku do BCC guzkowego [6], który odizolowany jest od otaczających tkanek otoczką z kolagenów typu I i III i dzięki temu nie ma tak dużego potencjału inwazyjnego, jak odmiana naciekająca BCC. Ponadto wykazano istotnie niższy poziom ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV w próbkach pobranych z marginesu guza w raku guzkowym w stosunku do naciekającego, co może sugerować, że w odmianie naciekającej BCC, komórki zdrowe sąsiadujące z tkanką nowotworową zwiększają ekspresję mRNA dla kolagenu typu IV, w celu ochrony przed naciekaniem komórek nowotworowych.

Ekspresja mRNA dla MMP-2 w ogniskach guza BCC guzkowego wykazała istotnie niższy poziom niż ekspresja mRNA dla MMP-2 oznaczona w ogniskach guza w odmianie naciekającej. Potwierdza to inwazyjny charakter odmiany naciekającej BCC, gdyż metaloproteinazy, katalizując proteolizę błon podstawnych umożliwiają komórkom nowotworowym naciekanie przyległych tkanek. Natomiast ekspresja mRNA dla MMP-2 w próbkach pobranych z marginesu guza u chorych z BCC guzkowym wykazała istotnie wyższy poziom niż ekspresja mRNA dla MMP-2 w marginesie guza w odmianie naciekającej BCC, co sugeruje znaczące wyciszenie ekspresji mRNA w komórkach sąsiadujących z BCC naciekającym. Wzrost ekspresji mRNA dla MMP-2 w tkankach przyległych do BCC typu guzkowego może sugerować mechanizm przeciwwagi włączany przez komórki nowotworowe, otoczonego kolagenem guza, przez stymulację komórek zdrowych otaczających guz do produkcji MMP-2 przez białko EMMPRIN [222].

W pracy wykazano również, że chorzy w grupie z rakiem guzkowym mieli istotnie niższy poziom ekspresji mRNA dla MMP-9 w ogniskach guza niż chorzy z odmianą naciekającą. Potwierdza to liczne spostrzeżenia, mówiące, że potencjał inwazyjny odmiany naciekającej zależy od ekspresji MMP-9 [45,166,208,241].

Według El-Bahrawy i wsp. [245] za większą inwazyjność odmiany naciekającej BCC, która uznawana jest za bardziej agresywną niż guzkowa, odpowiada brak błonowej ekspresji  $\beta$ -kateniny z jednoczesną jej ekspresją w jądrze komórkowym. Kompleks  $\beta$ -kateniny wraz z E-kadheryną prawidłowo jest zlokalizowany w błonie i odpowiada za regulację przekazywania sygnałów komórkowych. Uszkodzenie tego kompleksu może stanowić o większej inwazyjności i przerzutowości nowotworu [102,103].

## 5.4. Wiek pacjentów

Badano zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórko-

wym guzkowym i odmianie naciekającej pomiędzy tkanką nowotworową, a tkanką zdrową, pobraną z marginesu guza u pacjentów w poszczególnych przedziałach wiekowych. Analiza wykazała, że istotna różnica pomiędzy pomiarami wystąpiła w każdym z parametrów, tzn. w ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2, MMP-9, w obydwu grupach raka BCC oraz w każdej grupie wiekowej. U chorych z rakiem guzkowym we wszystkich grupach wiekowych – tzn. w grupie osób mających mniej niż 68 lat, osób w przedziale wiekowym 69-78 lat oraz w wieku powyżej lat 79 – poziom wszystkich parametrów oznaczonych w tkance nowotworowej był wyższy niż poziom parametrów oznaczonych w tkance stanowiącej margines guza, z wyjątkiem ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV.

Podobnie w grupie badanych z rakiem naciekającym, chorzy mający mniej niż 68 lat, osoby w przedziale wiekowym 69-78 lat oraz osoby w wieku powyżej lat 79 miały zawsze wyższe wartości parametrów oznaczanych w tkance nowotworowej niż wartości parametrów oznaczanych w tkance zdrowej pochodzącej z marginesu guza u tych samych pacjentów, z wyjątkiem ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV.

Ryzyko zachorowania na BCC wzrasta po 55 roku życia [6,246]. Potwierdzają to badania przeprowadzone w niniejszej pracy oraz badania opublikowane przez Deję i wsp. [247], w których najliczniejszą grupą wiekową była grupa 60–69 lat oraz 70–79 lat. Również Stojanovic i wsp. [248] podają, że pacjenci w szóstej i siódmej dekadzie życia stanowią większość przypadków wśród ogółu chorych z BCC. W przedstawionej pracy w szóstej i siódmej dekadzie życia było 62 pacjentów, a ósmej tylko 23. Podobne wyniki badań uzyskali Hakverdi i wsp. [65] i Dahl i wsp. [246].

## 5.5. Fototyp skóry

Badano zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej pomiędzy tkanką nowotworową, a tkanką zdrową pobraną z marginesu guza u pacjentów wg podziału na rodzaje fototypów w skali Fitzpatricka (fototyp II, fototyp III, fototyp IV). Analiza wykazała, że istotna różnica pomiędzy pomiarami wystąpiła w każdym z parametrów w obydwu grupach raka oraz w każdej grupie fototypowej.

Wśród badanych, u których zdiagnozowano raka guzkowego, osoby z fototypem II miały istotnie wyższy wynik ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, MMP-2 i MMP-9 w próbkach pobranych z ognisk guza w porównaniu do poziomu tych parametrów w próbkach pobranych z marginesu guza u tych samych pacjentów. Ekspresja mRNA dla kolagenu typu IV natomiast była istotnie niższa w tkankach guza w porównaniu do tkanek zdrowych. Podobne wyniki istotnych



różnic pomiędzy pomiarami miały osoby w grupie fototypu III oraz w grupie fototypu IV.

Analiza wykazała, że podobne wyniki istotnych różnic pomiędzy pomiarami miały osoby w grupie fototypu II, fototypu III oraz w grupie fototypu IV wśród badanych ze zdiagnozowaną odmianą naciekającą BCC.

BCC zaliczany jest do niemelanocytowych nowotworów skóry (NMSC), które najczęściej występują w populacji ludzi z I, II, III fototypem skóry. Częstość występowania tego typu nowotworów jest 19-krotnie większa w populacji białej względem czarnej [65]. Najczęściej BCC występuje u osób z fototypem II i III, co również potwierdzone zostało w niniejszej pracy, gdzie fototyp II występował u 15 osób a fototyp III u 46 osób. Promieniowanie słoneczne jest najważniejszym czynnikiem środowiskowym wpływającym na zjawisko fotoimmunosupresji oraz fotokancerogenezy, promując tym samym rozwój nowotworów skóry, w wyniku nagromadzenia w genomie zmian mutacyjnych [47]. W związku ze stale wzrastającą liczbą zachorowań na NMSC prowadzone są liczne badania w celu zarówno poznania patogenezы tych nowotworów, jak i opracowania skutecznych metod terapeutycznych.

## 5.6. Lokalizacja guza

Badana była także zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC pomiędzy tkanką nowotworową, a tkanką zdrową pobraną z marginesu guza u pacjentów, w zależności od lokalizacji guza na głowie i tułowiu.

Wykazano, że istotna różnica pomiędzy pomiarami wystąpiła w każdym z parametrów, w obydwu grupach raka oraz w każdej lokalizacji.

Wśród badanych, u których zdiagnozowano BCC guzkowy, zlokalizowany na głowie, występował istotnie wyższy poziom ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, MMP-2 i MMP-9 w próbkach pobranych z ognisk guza w porównaniu do poziomu tych parametrów w próbkach pobranych z marginesu guza u tych samych pacjentów. Ekspresja mRNA dla kolagenu typu IV natomiast była istotnie niższa w tkankach guza w porównaniu do tkanek zdrowych. Stwierdzono, że podobne wyniki istotnych różnic pomiędzy pomiarami miały osoby z rakiem guzkowym, u których guz występował na tułowiu.

U badanych z odmianą naciekającą BCC guz zlokalizowany był wyłącznie na głowie i chorzy ci mieli istotnie wyższy wynik ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, MMP-2 i MMP-9 w próbkach pobranych z ognisk guza w porównaniu do poziomu tych parametrów w próbkach pobranych z marginesu guza u tych samych pacjentów. Ekspresja mRNA dla kolagenu typu IV natomiast była istotnie niższa w tkankach guza, w porównaniu do tkanek zdrowych.

Intensywność oraz czas trwania ekspozycji na promieniowanie UV ma istotny wpływ na rodzaj zmian zachodzących w skórze [34]. BCC rozwija się w częściach ciała szczególnie narażonych na ekspozycję słoneczną. Odmiana guzkowa raka podstawnkomórkowego częściej lokalizuje się na skórze głowy niż ciała, tak samo jak typ naciekający BCC jest częściej spotykany na skórze głowy niż reszty ciała. Zauważona zależność jest zbieżna z wynikami badań przeprowadzonymi przez Deję i wsp. [247], którzy przebadali grupę 374 pacjentów pod względem częstości występowania poszczególnych typów histologicznych raka podstawnkomórkowego i lokalizacji zmian. Za najczęstszą lokalizację uznano nieowłosioną skórę głowy [247,249]. Powyższą prawidłowość stwierdzono także wśród badanych chorych, u których BCC guzkowy zlokalizowany był na głowie u 31 pacjentów, natomiast odmiana naciekająca występowała wyłącznie na głowie u wszystkich 40 chorych.

## 5.7. Płeć pacjentów

Badano zależność ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnkomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej pomiędzy tkanką nowotworową, a tkanką zdrową pobraną z marginesu guza u pacjentów w zależności od płci. Analiza wykazała, że istotna różnica pomiędzy pomiarami ekspresji mRNA wystąpiła w każdym z parametrów, w obydwu grupach raka oraz dla każdej z płci.

U kobiet, u których zdiagnozowano rak guzkowy występował istotnie wyższy wynik ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, MMP-2 i MMP-9 w próbkach pobranych z ognisk guza w porównaniu do poziomu tych parametrów w próbkach pobranych z marginesu guza u tych samych pacjentów. Ekspresja mRNA dla kolagenu typu IV natomiast była istotnie niższa w tkankach guza w porównaniu do tkanek zdrowych. Stwierdzono, że podobne wyniki istotnych różnic pomiędzy pomiarami mieli mężczyźni.

W przypadku raka naciekającego kobiety miały istotnie wyższy wynik ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, MMP-2 i MMP-9 w próbkach pobranych z ognisk guza w porównaniu do poziomu tych parametrów w próbkach pobranych z marginesu guza u tych samych pacjentów. Ekspresja mRNA dla kolagenu typu IV natomiast była istotnie niższa w tkankach guza w porównaniu do tkanek zdrowych. Analiza wykazała, że podobne wyniki istotnych różnic pomiędzy pomiarami mieli mężczyźni.

Rak ten występuje częściej u mężczyzn i potwierdzają to niniejsze badania gdzie w grupie 85 osób, były tylko 34 kobiety i 51 mężczyzn, pomimo iż pacjenci dobierani byli losowo. Podobne wyniki uzyskali Deja i wsp. [247] i Hakverdi i wsp. [65].

## 5.8. Wzrost ekspresji mRNA dla MMP-2 a spadek ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV

Badano zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-2 i spadkiem ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV, w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC.

Analiza korelacji Pearsona wykazała w grupie raka guzkowego brak związku poziomu ekspresji mRNA dla MMP-2 z poziomem ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV, zarówno w tkankach nowotworowych, jak i tkankach zdrowych. W przypadku raka naciekającego analiza wykazała brak związku pomiędzy ekspresją mRNA dla MMP-2 a ekspresją mRNA dla kolagenu typu IV w tkankach nowotworowych. Stwierdzono jednak związek pomiędzy ekspresją mRNA dla MMP-2 a ekspresją mRNA dla kolagenu typu IV w tkankach zdrowych. Wraz ze spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV rósł poziom ekspresji mRNA dla MMP-2 w tkankach zdrowych otaczających guz nowotworowy. Siła tego związku była umiarkowana.

W układzie białko-białko, kolagen IV stanowi substrat dla MMP-2, stąd potrzeba poznania zależności pomiędzy poziomami ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV i MMP-2. Szczególnie interesującym faktem była stwierdzona znamienna zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-2 i równoczesnym spadkiem ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV w tkance traktowanej jako zdrowa w badaniu histopatologicznym. Świadczy to o widocznym zaburzeniu struktury macierzy pozakomórkowej i błony podstawnej, co może wskazywać na wstępny rozwój procesu nowotworowego toczący się już na poziomie molekularnym, pomimo zaklasyfikowania tkanki jako prawidłowej poprzez badanie histopatologiczne.

## 5.9. Wzrost ekspresji mRNA dla MMP-9 a spadek ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV

Badano zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-9 i spadkiem ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV, w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC.

W celu weryfikacji problemu badawczego przeprowadzono serię analiz testem korelacji Pearsona. Analiza wykazała, że ekspresja mRNA dla kolagenu typu IV nie była powiązana z poziomem ekspresji mRNA dla MMP-9 w próbkach T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC. Zależność enzym-substrat pomiędzy MMP-9 a kolagenem typu IV nie są odzwierciedlone na poziomie mRNA w badanych tkankach.

## 5.10. Wzrost ekspresji mRNA dla MMP-2 a wzrost ekspresji mRNA dla kolagenu typu I

Badano zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-2 i wzrostem ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, w raku guzkowym i naciekającej odmianie BCC.

W celu weryfikacji problemu badawczego przeprowadzono serię analiz testem korelacji Pearsona. Analiza wykazała, że ekspresja mRNA kolagenu typu I nie była powiązana z poziomem ekspresji mRNA dla MMP-2 w próbkach T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC. Możliwa jest kompensacja syntezy kolagenu typu I w odpowiedzi na wzrost poziomu ekspresji MMP-2, lecz zależność ta nie jest istotna statystycznie.

## 5.11. Molekularne markery procesu powstawania nowotworu

Jak wiadomo proteoliza macierzy pozakomórkowej jest wynikiem działania poszczególnych metaloproteinaz produkowanych przez różne typy komórek, zarówno nowotworowych, jak i prawidłowych [194]. Nie bez znaczenia jest również udział licznych hormonów, cytokin czy czynników wzrostu indukujących syntezę enzymów proteolitycznych czy ich inhibitorów [156].

W guzach złośliwych obecne są komórki wykazujące cechy fenotypu inwazyjnego, który charakteryzuje się występowaniem czynników, warunkujących zdolność guza do wzrostu, migracji oraz patologicznej angiogenezy. Poznanie markerów świadczących o nabyciu przez komórkę fenotypu inwazyjnego jest szczególnie istotne dla prawidłowego odróżniania tkanek guza od tkanek prawidłowych. Diagnostyka nowotworów polega obecnie na badaniu histopatologicznym. Określenie komórek o fenotypie inwazyjnym pozwala na precyzyjne wyznaczenie granicy pomiędzy tkanką nowotworową, a tkanką zdrową na poziomie molekularnym.

W związku z faktem, że występuje czasem niewłaściwe rozpoznanie marginesu guza poprzez analizę histopatologiczną, zmiany BCC nie zawsze są usuwane w całości. Rozpoznanie komórek nowotworowych na podstawie ich cech fenotypu umożliwia radykalne usunięcie zmiany nowotworowej. Pozwala to uniknąć pozostawiania komórek, które według oceny histopatologicznej klasyfikowane są jako prawidłowe, a w istocie rozpoczął się już w nich proces karcynogenezy, zatem komórki te są przyczyną wznowy procesu chorobowego.

W przypadku wystąpienia BCC, poszerzenie diagnostyki zmian nowotworowych o badania porównujące ekspresję mRNA i/lub białek MMPs w zmianie nowotwo-

rowej w odniesieniu do tkanki prawidłowej, mogłoby znacznie zwiększyć prawdziwość oceny marginesu zmiany, a tym samym zwiększyłyby przydatność oznaczeń dla potwierdzenia lub wykluczenia rozwoju procesu nowotworowego na bardzo wczesnych etapach [250]. W przypadku działań terapeutycznych, u chorych z BCC stosuje się najczęściej chirurgiczne usunięcie zmiany. Stąd też stale poszukiwane są markery molekularne umożliwiające odróżnienie tkanki zmienionej nowotworowo od marginesu tkanki zdrowej. Za takie markery mogą być uznane metaloproteinazy MMP-2 i MMP-9. Uzyskane obecnie wyniki dotyczące ekspresji mRNA dla MMP-2 i MMP-9 potwierdzają przydatność tych oznaczeń dla diagnostyki molekularnych zmian nowotworowych w raku podstawnokomórkowym skóry.



## 6. Wnioski

1. W przebiegu raka podstawnocomórkowego skóry występują istotnie odmienne poziomy ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV i MMP-2 oraz MMP-9 w porównaniu do tkanek zdrowych pobranych z marginesu guza od tych samych pacjentów.
2. W odmianie naciekającej raka podstawnocomórkowego skóry występuje istotnie wyższa ekspresja mRNA dla metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9, co świadczy o bardziej inwazyjnym charakterze tej postaci guza.
3. W obrębie guza BCC guzkowego występuje znamienne wyższa ekspresja mRNA dla kolagenu typu I i III, co warunkuje otoczenie guza przez białka kolagenowe, tym samym zapewniając mniejszy potencjał inwazyjny guza w BCC guzkowym niż w odmianie naciekającej.
4. W podziale pacjentów według wieku, fototypu skóry, lokalizacji guza na ciele oraz płci, w każdej z grup występują zawsze istotnie wyższe poziomy ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, III oraz MMP-2 i MMP-9, a także zawsze niższy poziom ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV w tkance guza w porównaniu do tkanki marginesu guza pobranych od tych samych pacjentów, w obu typach guza BCC. Postrzegane różnice świadczą o odmiennej roli kolagenów I i III oraz kolagenu IV w patomechanizmie raka BCC.
5. Metaloproteinazy MMP-2 i MMP-9 mogą być wykorzystane jako molekularne markery toczącego się procesu nowotworowego w przebiegu raka podstawnocomórkowego skóry.





# Piśmiennictwo

1. **Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, Lush MJ, Wright MW, Povey S.** Guidelines for Human Gene Nomenclature. *Genomics*. 2002, 79, 4, 464–470.
2. **Cichocki T, Litwin JA, Mirecka J.** *Kompendium histologii*. Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2009.
3. **Sterry W, Paus R, Burgdorf W.** *Dermatologia*. Lublin: Wydawnictwo Czelej, 2009.
4. **Bochenek A, Reicher M.** *Anatomia człowieka*. Warszawa: Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, 2010.
5. **Jabłońska S, Majewski S.** *Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PWZL, 2005.
6. **Bologna JN, Jorizzo JL, Rapini RP.** *Dermatology*. Rio de Janeiro: Mosby, 2012.
7. **Chabior A.** Wartość fototypu skóry w przewidywaniu odczynu fototoksycznego po doustnym i kąpielowym zastosowaniu psoralenu u pacjentów przed planowaną PUVA-terapią. *Przeł Derm*. 2009, 96, 255–263.
8. **Young B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW.** *Histologia. Podręcznik i atlas*. Wrocław: Elsevier Urban & Partner, 2010.
9. **Bańkowski E.** *Biochemia*. Wrocław: Elsevier Urban & Partner, 2009.
10. **Fitzpatrick TB.** The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988, 124, 6, 869–71.
11. **Adamski Z, Kaszuba A.** *Dermatologia dla kosmetologów*. Wrocław: Elsevier Urban & Partner, 2010.
12. **Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M, (red. pol.) Gliński Wiesław.** *Dermatologia*. Lublin: Wydawnictwo Czelej, 2010.
13. **Martini MC.** *Kosmetologia i farmakologia skóry*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PWZL, 2009.
14. **Błaszczyk-Kostanecka M, Wolska H.** *Dermatologia w praktyce*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PWZL, 2009.
15. **Epstein RJ.** *Biologia molekularna człowieka*. Lublin: Wydawnictwo Czelej, 2005.
16. **Proksch E, Brandner JM, Jensen JM.** The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*. 2008, 17, 1063–1072.

17. **Xu J, Rodriguez D, Petitclerc E, Kim JJ, Hangai M, Yuen SM, Davis GE, Brooks PC.** Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Cell Biol.* 2001, 154, 1069–1080.
18. **Gawkrodger D, Ardern-Jones MR.** *Dermatology: An Illustrated Colour Text.* London: Elsevier – Health Sciences Division, 2012.
19. **Murray RK, Granner DK, Rodwell VW.** *Harper's Biochemistry.* Stamford: Appleton & Lange, 2010.
20. **Savoia P, Cremona O, Trusolino L, Pepino E, Marchisio PC.** Integrins and Basement Membrane Proteins in Skin Carcinomas. *Pathol Res Pract.* 1994, 190, 9–10, 950–954.
21. **Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC.** Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J Biol Chem.* 2001, 276, 10134–10144.
22. **Kłyszajko-Stefanowicz L.** *Biochemia niektórych struktur komórkowych.* Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2002.
23. **Kołomecki K.** Hamowanie funkcji metaloproteinaz – możliwości zastosowania klinicznego. *Onkol Pol.* 2000, 3, 3, 163–167.
24. **Jaszczuk A, Ostrowska J, Kleszczewska E.** Kwas hialuronowy – jego właściwości oraz wykorzystanie w kosmetyce i medycynie. *Pol J Cosmetol.* 2009, 3, 12, 185–189.
25. **Kozłowska J.** Kwas hialuronowy jako surowiec kosmetyczny. *Pol J Cosmetol.* 2011, 1, 34–38.
26. **Patkowska D, Ruszczyk A.** *Kwas hialuronowy – odkrycie na miarę przełomu tysięcyleci.* Warszawa: PZWL, 2010.
27. **Zegarska B, Woźniak M.** Wpływ estrogenów na zmiany zachodzące w skórze. *Przeegl Menopauz.* 2007, 4, 233–238.
28. **Rosen ED, Spiegelman BM.** Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006, 444, 847–853.
29. **Trayhurn P, Wood I.** Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004, 92, 3, 347–355.
30. **Kershaw EE, Flier JS.** Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89, 6, 2548–2556.
31. **Ahn J, Lee H, Kim S, Park J, Ha T.** The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem. Biophys Res Commun.* 2008, 373, 545–549.
32. **Poulos SP, Hausman DB, Hausman GJ.** The development and endocrine functions of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 2010, 323, 20–34.
33. **Rigel D.** Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *J Am Acad Dermatol.* 2008, (5 Suppl. 2), 58, S129–S132.

34. **Rittie L, Fisher G.** UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev.* 2002, 1, 4, 705–720.
35. **Weedon D.** Tumors of the epidermis. *Weedon's Skin Pathology.* New York: Elsevier (Churchill Livingstone), 2010.
36. **Wojas-Pelc A, Nastalek M, Sułowicz J.** Estrogeny a skóra – spowolnienie procesu starzenia. *Przegl Menopauz.* 2008, 6, 314–318.
37. **Rokowska-Waluch A, Kałużńska K, Chojnicki M, Pawlaczyk M.** Wpływ zmian hormonalnych zachodzących w organizmie kobiety na stan skóry. *Przegl Dermatol.* 2009, 96, 205–210.
38. **Kułakowski A, Skowrońska-Gardas A.** *Onkologia.* Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2007.
39. **Epstein EH Jr.** Mommy—where do tumors come from? *J Clin Invest.* 2011, 121, 1681–1683.
40. **Stachura J, Domagała W.** *Patologia znaczy słowo o chorobie.* Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008.
41. **Domagała W, Chosia M, Urbańska E.** *Podstawy patofizjologii.* Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2009.
42. **Gronowski J, Krusia S.** *Podstawy patomorfologii.* Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1991.
43. **Kumar V, Cotran RS, Robbins SL.** *Patologia.* [red.] Olszewski red. Włodzimirz T. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, 2005.
44. **Kordek R, (red.).** *Onkologia.* Gdańsk: VM Media Sp z o.o. VM Group sp. k., 2013.
45. **O'Grady A, O'Kelly P, Murphy GM, Leader M, Kay E.** Differential expression of matrix metalloproteinase MMP-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumor progression. *Histopatologia.* 2007, 51, 793–804.
46. **Fattah A, Pollock J, Maheshwar A, Britto JA.** Big Bad BCCs: Craniofacial resection and reconstruction for atypical basal cell carcinoma ta. *J Plast Reconstr Aest Surg.* 2010, 63, 5, e433–e441.
47. **Bowden G.** Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. *Nat Rev Cancer.* 2004, 1, 4, 23–35.
48. **Bilewicz R.** Przypadek zaawansowanego raka kolczystokomórkowego okolicy skroniowej. *Przegl Dermatol.* 2009, 96, 221–225.
49. **Chicheł A, Skowronek J.** Współczesne leczenie raka skóry-dermatologia, chirurgia czy radioterapia? *Contemp Oncol.* 2005, 9, 10, 429–435.
50. **Bender K, Blattner C, Knebel A, Lordanov M, Herrlich P, Rahmsdorf H.** UV-induced signal transduction. *J Photochem Photobiol B.* 1997, 37, 1–2, 1–17.
51. **Brougham ND, Dennett ER, Tan ST.** Non-melanoma skin cancers in New Zealand—a neglected problem. *N Z Med J.* 2010, 123, 59–65.

52. **Pabiańczyk R, Cieślik K, Tuleja T.** Metody leczenia raka podstawnokomórkowego skóry. *Chir Pol.* 2011, 13, 1, 48–58.
53. **Sartore L, Lancerotto L, Salmaso M, Giatsidis G, Paccagnella O, Alaibac M, Bassetto F.** Facial basal cell carcinoma: Analysis of recurrence and follow-up strategies. *Oncol Rep.* 2011, 26, 1423–9.
54. **Schlecht NF, Brandwein-Gensler M, Smith RV, Kawachi N, Broughel D, Lin J, Keller CE, Reynolds PA, Gunn-Moore FJ, Harris T, Childs G, Belbin TJ, Prystowsky MB.** Cytoplasmic ezrin and moesin correlate with poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2012, 6, 232–43.
55. **Dummer R, Karpova MB, Barysch MJ.** Basal cell carcinomas: molecular abnormalities and molecularly targeted therapies. *Expert Rev Dermatol.* 2009, 4, 335–369.
56. **Elghissassi I, Mikou A, Inrhaoun H, Ennouhi A, Gamra L, Errihani H.** Metastatic basal cell carcinoma to the bone and bone marrow. *Int J Dermatol.* 2009, 48, 481–3.
57. **Karahan N, Baspinar S, Bozkurt KK, Caloglu E, Ciris IM, Kapucuoglu N.** Increased expression of COX-2 in recurrent basal cell carcinoma of the skin: a pilot study. *Indian J Pathol Microbiol.* 2011, 54, 3, 526–31.
58. **Staples MP, Elwood M, Burton RC, Williams JL, Marks R, Giles GG.** Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust.* 2006, 184, 6–10.
59. **Baran E.** *Nowotwory skóry. Klinika, patologia, leczenie.* Warszawa: Wydawnictwo Galaktyka, 2008. 56–65.
60. **Staibano S, Boscaino A, Salvatore G, Orabona P, Palombini L, De Rosa G.** The prognostic significance of tumor angiogenesis in nonaggressive and aggressive basal cell carcinoma of the human skin. *Hum Pathol.* 1996, 27, 7, 695–700.
61. **Bartoš V, Pokorný D, Zacharová O, Haluska P, Doboszová J, Kullová M, Adamicová K, Pěč M, Pěč J.** Recurrent basal cell carcinoma: A clinicopathological study and evaluation of histopathological findings in primary and recurrent lesions. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2011, 20, 67–75.
62. **Saldanha G, Fletcher A, Slater DN.** Basal cell carcinoma: dermatopathological and molecular biological update. *Br J Dermatol.* 2003, 148, 2, 195–202.
63. **Ghanadan A, Abbasi A, Rabet M, Abdollahi P, Abbasi MA.** Characteristics of Mixed Type Basal Cell Carcinoma in Comparison to Other BCC Subtypes. *Indian J Dermatol.* 2014, 59, 1, 56–59.
64. **Wu A, Sun MT, Huilgol SC, Madge S, Selva D.** Histological subtypes of periorbital basal cell carcinoma. *Clin Exp Ophthalmol.* 2014, przed opublikowaniem artykułu udostępniony online.

65. **Hakverdi S, Balci DD, Dogramaci CA, Toprak S, Yaldiz M.** Retrospective analysis of basal cell carcinoma. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2011, 77, 2, 255–255.
66. **Łętowska-Andrzejewicz K, Zdybski J, Świątek E, Czuba J, Maciejewski R.** Olbrzymi rak podstawnokokórkowy – opis przypadku i przegląd piśmiennictwa. *Post Dermatol Alergol.* 2006, 23, 6, 282–285.
67. **Cigna E, Tarallo M, Maruccia M, Sorvillo V, Pollastrini A, Scuderi N.** Basal Cell Carcinoma: 10 Years of Experience. *J Skin Cancer.* 2011.
68. **Telfer NR, Colver GB, Morton CA.** Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2008, 159, 35–48.
69. **Rundhaug JE, Mikulec C, Pavone A, Fischer SM.** A role for cyclooxygenase-2 in ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. *Mol Carcinog.* 2007, 46, 692–8.
70. **Daya-Grosjean L, Sarasin A.** The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors. *Mutat Res.* 2005, y 1–2, 571, 43–56.
71. **Kaszuba A, Zieliński K.** *Choroby i nowotwory skóry wywołane promieniowaniem ultrafioletowym.* Łódź: Wydawnictwo ADI, 2006.
72. **Boyd S, Tolvanen K, Virolainen S, Kuivanen T, Kyllönen L, Saarialh K.** Differential expression of stromal MMP-1, MMP-9 and TIMP-1 in basal cell carcinomas of immunosuppressed patients and controls. *Virchows Arch.* 2008, 452, 1, 83–90.
73. **Ledic Drvar D, Lipozenčić J, Sabol I, Bukvic Mokos Z, Ilic I, Grce M.** Human papillomavirus status in extragenital nonmelanoma skin cancers. *Clin Dermatol.* 2014, 32, 2, 248–252.
74. **Iannacone MR, Gheit T, Waterboer T, Giuliano AR, Messina JL, Fenske NA, Cherpelis BM, Sondak VK, Roetzheim RG, Ferrer-Gil S, Michael KM, McKay-Chopin S, Pawlita M, Tommasino M, Rollison DE.** Case-Control Study of Cutaneous Human Papillomavirus Infection in Basal Cell Carcinoma of the Skin. *J Invest Dermatol.* 2013, 133, 6, 1512–1520.
75. **Bøgelund FS, Philipsen PA, Gniadecki R.** Factors affecting the recurrence rate of basal cell carcinoma. *Acta Derm Venereol.* 2007, 87, 330–4.
76. **Eide MJ, Johnson DA, Jacobsen GR, Krajenta RJ, Rao DS, Lim HW, Johnson CC.** Vitamin D and Nonmelanoma Skin Cancer in a Health Maintenance Organization Cohort. *Arch Dermatol.* 2011, 147, 12, 1379–1384.
77. **Levitzki A, Klein S.** Signal transduction therapy of cancer. *Mol Aspects Med.* 2010, 31, 287–329.
78. **Xu Y, Voorhees J, Fisher G.** Epidermal growth factor receptor is a critical mediator of ultraviolet B irradiation-induced signal transduction in immortalized human keratinocyte HaCaT cells. *Am J Pathol.* 2006, 169, 3, 823–830.

79. **Staniforth V, Huang W-C, Aravindaram K Yang N-S.** Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms. *J Nutr Biochem.* 2012, 23, 5, 443–451.
80. **Jochymski C, Lesiak A, Słowik-Rylska M, Kozłowski W, Sysa-Jędrzejowska A, Rogowski-Tylman M, Narbutt J.** Expression of Ki-67 and  $\beta$ -catenine in nodular and superficial form of basal cell carcinoma. *Post Dermatol Alergol.* 2008, 25, 6, 269–275.
81. **Nguyen A, Hoang V, Laquer V, Kelly MK.** Angiogenesis in cutaneous disease: Part I. *J Am Acad Dermatol.* 2009, 61, 6, 921–942.
82. **Domagała W.** Molekularne podstawy kancerogenezy i ścieżki sygnałowe niektórych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. *Pol Przegl Neurolog.* 2007, 3, 3, 127–140.
83. **Lesiak A, Sysa-Jędrzejowska A, Narbutt J.** Rola ścieżki przekazywania sygnału sonic hedgehog w procesie skórnej kancerogenezy. *Pol Merk Lek.* 2010, 29, 170, 141–143.
84. **Kapka-Skrzypczak L, Dudra-Jastrzębska M, Czajka M, Raszewska-Famielec M, Popek S, Sawicki K, Kruszewski M.** Charakterystyka kliniczna oraz molekularne podstawy nowotworów skóry. *Hygeia Public Health.* 2014, 49, 1, 39–45.
85. **Biesaga B.** Regulacja ekspresji białka HIF-1 jako nowa strategia celowanej terapii nowotworów złośliwych. *J Oncol.* 2008, 58, 3, 255–259.
86. **Karagece Yağın U, Seçkin S.** The expression of p53 and COX-2 in basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and actinic keratosis cases. *Turk Patoloji Derg.* 2012, 28, 119–27.
87. **Khodaeiani E, Fakhrjou A, Amirnia M, Babaei-Nezhad S, Taghvamanesh F, Razzagh-Karimi E, Alikhah H.** Immunohistochemical Evaluation of p53 and Ki67 Expression in Skin Epithelial Tumors. *Indian J Dermatol.* 2013, 3, 58, 181–187.
88. **Barzilai A, Lyakhovitsky A, Trau H, Fogel M, Huszar M.** Expression of p53 in the evolution of squamous cell carcinoma: Correlation with the histology of the lesion. *J Am Acad Dermatol.* 2007, 57, 4, 669–676.
89. **Kar S, Deb M, Sengupta D, Shilpi A, Bhutia SK, Patra SK.** Intricacies of hedgehog signaling pathways: A perspective in tumorigenesis. *Exp Cell Res.* 2012, 318, 16, 1959–1972.
90. **Booth DR.** The Hedgehog Signalling Pathway and its Role In Basal Cell Carcinoma. *Cancer Metastasis Rev.* 1999, 27, 2, 261–284.
91. **Bigelow RLH, Jen EY, Delehedde M, Chari NS, McDonnell T.** Sonic hedgehog induces epidermal growth factor dependent matrix infiltration in HaCat keratinocytes. *J Invest Derm.* 2005, 124, 2, 457–465.

92. **Theunissen JW, de Sauvage FJ.** Paracrine Hedgehog Signaling in Cancer. *Cancer Res.* 2009, 69, 15, 6007–10.
93. **Perrot CY, Javelaud D, Mauviel A.** Overlapping activities of TGF- $\beta$  and Hedgehog signaling in cancer: Therapeutic targets for cancer treatment. *Pharmacol Therapeut.* 2013, 137, 2, 183–199.
94. **Yamamoto T, Ichioka H, Yamamoto K, Kanamura N, Sumio S, Shikimori M, Mori M.** Nevoid basal cell carcinoma syndrome: Clinical features and implications of development of basal cell carcinoma in skin and keratocystic odontogenic tumor in jaw and their gene expressions. *Asia J Oral Maxillofacial Surg.* 2011, 23, 3, 105–112.
95. **Liang SB, Furihata M, Takeuchi T, Iwata J, Chen BK, Sonobe H, Ohtsuki Y.** Over-expression of cyclin D1 in nonmelanocytic skin cancer. *Virchows Arch.* 2000, 436, 370–376.
96. **Lesiak A, Słowik-Rylska M, Jochymowski C, Kozłowski W, Sysa-Jędrzejowska A, Rogowski-Tylman M, Bogaczewicz J, Narbutt J.** Udział ekspresji cyklin w patogenezie odmiany powierzchniowej i guzkowej raka podstawnokomórkowego skóry. *Post Dermatol Alergol.* 2008, 25, 4, 157–163.
97. **Jirawatnotai S.** A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interace analyses in human cancers. *Nature.* 2011, 474, 230–234.
98. **Brudnik U, Wojas-Pelc A, Alekseenko A.** Przydatność kliniczna badania cykliny D1 w guzach nowotworowych – przegląd piśmiennictwa. *Post Dermatol Alergol.* 2007, 24, 1, 48–51.
99. **Kowalska A, Kowalik A.** Telomer i telomeraza w ontogenezie. *Contemp Oncol.* 2006, 10, 10, 487–451.
100. **Gałka S, Mazurek U, Brzezińska-Wcisło L, Pierzchała E, Wilczok T.** Ekspresja podjednostki hTR genu telomerazy w raku podstawnokomórkowym i kolczystokomórkowym skóry. *Post Dermatol Alergol.* 2005, 22, 288–292.
101. **El-Hawary AK, Yassin E, Khater A, Abdelgaber S.** Expression of matrix metalloproteinase-13 and Ki-67 in nonmelanoma skin cancer in xeroderma pigmentosum and non-xeroderma pigmentosum. *Am J Dermatopathol.* 2013, 35, 1, 45–9.
102. **Oh ST, Kim HS, Yoo NJ, Lee WS, Cho BK, Reichrath J.** Increased immunoreactivity of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and  $\beta$ -catenin in high-risk basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2011, 165, 6, 1197–1204.
103. **Ciurea ME, Cernea D, Georgescu CC, Cotoi OS, Pătrașcu V, Pârvănescu H, Popa D, Pârvănescu V, Ciurea RN, Mercuț R.** Expression of CXCR4, MMP-13 and  $\beta$ -catenin in different histological subtypes. *Rom J of Morph and Embr.* 2013, 54, 4, 939–951.

104. **Burda F, Chałas A, Szumiło J.** Cyklooksygenaza i prostanoidy – znaczenie biologiczne. *Post Hig Med Dośw.* 2006, 60, 129–141.
105. **Harizi H, Corcuff JB, Gualde N.** Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med.* 2008, 14, 10, 461–469.
106. **Joo YE, Rew JS, Seo YH, Choi SK, Kim YJ, Park CS, Kim SJ.** Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol.* 2003, 37, 28–33.
107. **Dixon DA.** Regulation of COX-2 expression in human cancers. *Prog Exp Tumor Res.* 2003, 37, 52–71.
108. **Dannenberga AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K, DuBois RN.** Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: Pharmacologic targets for chemoprevention. *J Clin Oncol.* 2005, 23, 254–66.
109. **Telliez A, Furman C, Pommery N, Hénichart JP.** Mechanisms leading to COX-2 expression and COX-2 induced tumorigenesis: Topical therapeutic strategies targeting COX-2 expression and activity. *Anticancer Agents Med Chem.* 2006, 6, 187–208.
110. **Vogel U, Christensen J, Wallin H, Friis S, Nexø BA, Tjønneland A.** Polymorphisms in COX-2, NSAID use and risk of basal cell carcinoma in a prospective study of Danes. *Mutat Res.* 2007, 617, 138–46.
111. **Akita Y, Kozaki K, Nakagawa A, Saito T, Ito S, Tamada Y, Fujiwara S, Nishikawa N, Uchida K, Yoshikawa K, Noguchi T, Miyaishi O, Shimozato K, Saga S, Matsumoto Y.** Cyclooxygenase-2 is a possible target of treatment approach In conjunction with photodynamic therapy for various disorders in skin and oral cavity. *Br J Dermatol.* 2004, 151, 472–80.
112. **Chen W, Fu X, Ge S, Sun T, Sheng Z.** Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue- derived inhibitors of metalloproteinase in fetal and adult skin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007, 39, 997–1005.
113. **Kim KH, Park EJ, Seo YJ, Cho HS, Kim CW, Kim KJ, Park HR.** Immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 and p53 expression in skin tumors. *J Dermatol.* 2006, 33, 319–25.
114. **Tjiu JW, Liao YH, Lin SJ, Huang YL, Tsai WL, Chu CY, Kuo ML, Jee SH.** Cyclooxygenase-2 overexpression in human basal cell carcinoma cell line increases antiapoptosis, angiogenesis, and tumorigenesis. *J Invest Dermatol.* 2006, 126, 1143–51.
115. **Johannesdottir SA, Chang ET, Mehnert F, Schmidt M, Olesen AB, Sørensen HT.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of skin cancer: A population-based case-control study. *Cancer.* 2012, 118, 4768–76.
116. **Tang JY, Aszterbaum M, Athar M, Barsanti F, Cappola C, Estevez N, Hebert J, Hwang J, Khaimskiy Y, Kim A, Lu Y, So PL, Tang X, Kohn MA,**



- McCulloch CE, Kopelovich L, Bickers DR, Epstein EH Jr. Basal cell carcinoma chemoprevention with nonsteroidal antiinflammatory drugs in genetically predisposed PTCH1+/- humans and mice. *Cancer Prev Res*. 2010, 3, 25–34.
117. El-Khalawany M, Abou-Bakr A. Role of Cyclooxygenase-2, Ezrin and matrix metalloproteinase-9 as predictive markers for recurrence of basal cell carcinoma. *J of Canc Res and Therap*. 2013, 9, 4, 613–617.
118. Zielonka TM. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych Angiogeneza-część I. *Alergol Astma Immunol*. 2003, 8, 4, 169–174.
119. Włodarkiewicz A, Sobjanek M, Michajłowska I, Nałęcz D, Niekra M, Michajłowski D. Strategie molekularne w leczeniu raków skóry. *Przegl Dermatol*. 2012, 99, 120–124.
120. Sobjanek M, Zabłotna M, Michajłowski I, Urban M, Nedoszytko B, Mędrzycka-Dąbrowska W, Włodarkiewicz A, Roszkiewicz J. Polimorfizm genu śródbłonkowo-naczyniowego czynnika wzrostu a podatność na raka podstawonokomórkowego skóry – badanie pilotażowe. *Post Dermatol Alergol*. 2009, 26, 2, 71–73.
121. Wierzbowska A, Wrzesień-Kuś A, Robak T. Angiogeneza i jej znaczenie w biologii ostrej białaczki szpikowej. *Acta Haematol Pol*. 2002, 33, 1, 5–15.
122. Śliwowska I, Kopczyński Z. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej – charakterystyka biochemiczna i kliniczna wartość oznaczania u chorych na raka piersi. *Contemp Oncol*. 9, 2005, 8, 327–335.
123. Clark CM, Furniss M, Mackay-Wiggan JM. Basal Cell Carcinoma: An Evidence-Based Treatment Update. *Am J Clin Dermatol*. 2014, Publikacja elektroniczna przed drukiem.
124. Sharquie KE, Noaimi AA. Basal cell carcinoma: Topical therapy versus surgical treatment. *J Saudi Soc Dermatol & Dermatol Surg*. 2012, 16, 41–51.
125. Cumberland L, Dana A, Liegeois N. Mohs Micrographic Surgery for the Management of Nonmelanoma Skin Cancers. *Fac Plast Surg Clin N Am*. 17, 3, 325–335.
126. Gurgen J, Gatti M. Epiluminescence Microscopy (Dermoscopy) Versus Visual Inspection During Mohs Microscopic Surgery of Infiltrative Basal Cell Carcinoma. *Dermatol Surg*. 2012, 38, 7, 1066–1069.
127. Gollnick H, Barona CG, Frank RG, Ruzicka T, Megahed M, Maus J, Munzel U. Recurrence rate of superficial basal cell carcinoma following treatment with imiquimod 5% cream: conclusion of a 5-year long-term follow-up study in Europe. *Eur J Dermatol*. 2008, 18, 677–682.
128. Li VW, Li WW, Talcott KE, Zhai AW. Imiquimod as antiangiogenic agent. *J. Drugs Dermatol*. 2005, 4, 708–717.
129. opracowanie zbiorcze. Rejestracje i nowości na rynku w 2013. *Aptekarz Polski*. kwiecień 2014, 92, 70e, 43–57.

130. **Szeimies RM, Ibbotson S, Murrell DF, Rubel D, Frambach Y, de Berker D, Dummer R, Kerrouche N, Villemagne H.** A clinical study comparing methyl aminolevulinate photodynamic therapy and surgery in small superficial basal cell carcinoma (8–20 mm), with a 12-month follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2008, 22, 1302–06.
131. **Yan Z, Jianhui Z, Xiaoyan W, Chenggang Y, Wei X, Yong L, Xianjie M.** The application of Arial superficial temporal artery Island flap for repairing the defect secondary to the removal of the Lower eye lid. *Br J Oral Maxillofacial Surg.* 2014, 52, 72–75.
132. **Samarasinhghe V, Madan V.** Non melanoma Skin Cancer. *J Cutan Aest Surg.* 2012, 5, 1, 1–8.
133. **Daniel L, Leśniewski-Kmak K.** Leczenie długotrwanie rozwijającego się raka podstawnkomórkowego skóry, niszczącego połowę twarzy. *Contemp oncol.* 2005, 9, 10, 440–442.
134. **Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, red. wyd. pol. Gliniski W, Wolska H.** *Dermatologia.* Lublin: Wydawnictwo Czelej, 2004.
135. **Czerw-Głąb K.** *Nowotwory skóry.* Opole: Opolska Fundacja Antynowotworowa, 2009.
136. **Rhodes LE, de Rie M, Enström Y, Groves R, Morken T, Goulden V, Wong GA, Grob JJ, Varma S, Wolf P.** Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate vs surgery for nodular basal cell carcinoma. Results of a multicenter randomized prospective trial. *Arch Dermatol.* 2004, 140, 17–23.
137. **Arits AH, Mosterd K, Essers BA, Spoorenberg E, Sommer A, De Rooij MJ, van Pelt HP, Quaedvlieg PJ, Krekels GA, van Neer PA, Rijzewijk JJ, van Geest AJ, Steijlen PM, Nelemans PJ, Kelleners-Smeets NW.** Photodynamic therapy versus topical imiquimod versus topical fluorouracil for treatment of superficial basal-cell carcinoma: a single blind, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013.
138. **Urosevic M, Dummer R, Conrad C, Beyeler M, Laine E, Burg G, Gilliet M.** Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid dendritic cells following imiquimod treatment. *J Natl Cancer Inst.* 2005, 97, 1143–1153.
139. **Smith DI, Swamy PM, Heffernan MP.** Heffernan Off-label uses of biologics in dermatology: Interferon and intravenous immunoglobulin. *J Am Acad Dermatol.* 2007, 56, 1, e1–e54.
140. **Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, Weiss GJ, Borad MJ, Hann CL, Brahmer JR, Mackey HM, Lum BL, Darbonne WC, Marsters JC Jr, de Sauvage FJ, Low JA.** Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2009, 361, 1164–1172.

141. **Walterhouse DO, Lamm ML, Villavicencio E, Iannaccone PM.** Emerging roles for hedgehog-patched-Gli Signac transduction in reproduction. *Biol Reprod.* 2003, 69, 8–14.
142. **Cho E-A, Moloney FJ, Cai H, Au-Yeung A, China C, Scolyer RA, Yosufi B, Raftery MJ, Deng JZ, Morton SW, Hammond PT, Arkenau H-T, Damian DL, Francis DJ, Chesterman CN, Barnetson RStC, Halliday GM, Khachigian LM.** Safety and tolerability of an intratumorally injected DNAzyme, Dz13, in patients with nodular basal-cell carcinoma: a phase 1 first-in-human trial (DISCOVER). *The Lancet.* 2013, 381, 9880, 1835–1843.
143. **Luo X, Cai H, Ni J, Bhindi R, Lowe HC, Chesterman CN, Khachigian LM.** c-Jun DNAszymes inhibit myocardial inflammation, ROS generation, infarct size, and improve cardiac function after ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009, 29, 1836–42.
144. **Bhindi R, Fahmy RG, Lowe HC, Chesterman CN, Dass CR, Cairns MJ, Saravolac EG, Sun LQ, Khachigian LM.** Brothers in arms: DNA enzymes, short interfering RNA, and the emerging wave of small-molecule nucleic acid-based gene-silencing strategies. *Am J Pathol.* 2007, 171, 1079–88.
145. **Laner-Plamberger S, Kaser A, Paulischta M, Hauser-Kronberger C, Eichberger T, Frischauf AM.** Cooperation between GLI and JUN enhances transcription of JUN and selected GLI target genes. *Oncogene.* 2009, 28, 1639–51.
146. **Chen N, Nomura M, She QB, Ma WY, Bode AM, Wang L, Flavell RA, Dong Z.** Suppression of skin tumorigenesis in c-Jun NH(2) terminal kinase-2-deficient mice. *Cancer Res.* 2001, 61, 3908–12.
147. **Cai H, Santiago FS, Prado-Lourenco L, Wang B, Patrikakis M, Davenport MP, Maghzal GJ, Stocker R, Parish CR, Chong BH, Lieschke GJ, Wong TW, Chesterman CN, Francis DJ, Moloney FJ, Barnetson RS, Halliday GM, Khachigian LM.** DNAszymes targeting c-jun suppress skin cancer growth. *Sci Transl Med.* 2012, 4, str. 139ra82.
148. **Zlatarova ZI, Softova EB, Dokova, KG, Messmer EM.** Expression of matrix metalloproteinase-1, -9, -13, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in basal cell carcinomas of the eyelid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012, 250, 3, 425–431.
149. **Mott JD, Werb Z.** Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 2004, 16, 558–564.
150. **Murphy G, Nagase H.** Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med.* 2008, 29, 290–308.
151. **Page McCaw A, Ewald AJ, Werb Z.** Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, 8, 221–233.
152. **Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA, Eisen AZ.** Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology

- to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem.* 1986, 261, 6600–6605.
153. **Egeblad M, Werb Z.** New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2, 161–174.
  154. **Nagase H, Visse R, Murphy G.** Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006, 69, 562–573.
  155. **Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Tryggvason K.** Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with the tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002, 99.
  156. **Nagase H, Woessner JF Jr.** Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999, 274, 21491–21494.
  157. **Westermarck J, Kähäri VM.** Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 1999, 13, 781–792.
  158. **Gupta A, Deep Kaur C, Jangdey M, Saraf S.** Matrix metalloproteinase enzymes and their naturally derived inhibitors: Novel targets in photocarcinoma therapy Review Article Ageing. *Research Reviews.* 2014, 13, 65–74.
  159. **Borkakoti N.** Structural studies of matrix metalloproteinases. *J Mol Med.* 2000, 78, 261–268.
  160. **Sternlicht MD, Werb Z.** How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001, 17, 463–516.
  161. **Visse R, Nagase H.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, Function and Biochemistry. *Circ Res.* 2003, 92, 827–839.
  162. **Pei D, Kang T, Qi H.** Cysteine array matrix metalloproteinase (CA- MMP/ MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. *J Biol Chem.* 2000, 275, 33988–33997.
  163. **Maskos K.** Crystal structures of MMP in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie.* 2005, 87, 249–263.
  164. **Bode W, Gomis-Ruth FX, Stoker W.** Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HE-XXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family “metzincins”. *FEBS Lett.* 1993, 331, 134–140.
  165. **Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T.** Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int.* 2002, 52, 255–64.
  166. **Emara M, Woźniak M.** Role of metalloproteinases in cancer cell invasiveness. *Diagn Lab.* 1999, 35, 381–397.
  167. **Faber HR, Groom CR, Baker HM, Morgan WT, Smith A, Baker EN.** 1.8 Å crystal structure of the C-terminal domain of rabbit serum haemopexin. *Structure.* 1995, 3, 551–559.

168. **Chung L, Dinakarpanidhan D, Yoshida N, Lauer- Fields JL, Fields GB Visse R, Nagase H.** Collagenase unwinds triple- helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *EMBO J.* 2004, 23, 3020–3030.
169. **Overall CM.** Molecular determinants of metalloproteinases substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. *Mol Biotechnol.* 2002, 22, 51–86.
170. **Tam EM, Moore TR, Butler GS, Overall ChM.** Characterization of the distinct collagen binding, helicase and cleavage mechanisms of matrix metalloproteinase 2 and 14 (Gelatinase A and MT1-MMP): the differential roles of the MMP hemopexin C domains metalloproteinase 2 and 14. *J Biol Chem.* 2004, 279, 43336–43344.
171. **Kwiatkowski P.** Rola metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w procesie inwazji nowotworu. *Pol. Ann. Med.* 2008, 15, 1, 43–50.
172. **Woessner JF, Nagase H.** *Matrix metalloproteinases and TIMPs.* Oxford UK: Oxford University Press, 2000.
173. **Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T.** Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem.* 2003, 253, 269–285.
174. **Galang CK, Muller WJ, Foos G, Oshima RG, Hauser CA.** Changes in the expression of many ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors. *J Biol Chem.* 2004, 279, 11281–11292.
175. **Xu Y, Baker D, Quan T, Baldassare J, Voorhees J, Fisher G.** Receptor type protein tyrosine phosphatase-kappa (RPTP- $\kappa$ ) mediates cross-talk between TGF- $\beta$  and EGFR signaling pathways in human keratinocytes. *Mol Biol Cell.* 2010, 1, 21, 29–35.
176. **Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M.** Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene.* 30, 19, 2413–2423.
177. **Quan T, He T, Voorhees J, Fisher G.** Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts. *J Biol Chem.* 2005, 280, 9.
178. **Vesely PW, Staber PB, Hoefler G, Kenner L.** Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutat Res.* 2009, 682, 7–12.
179. **Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG.** The activator protein-1 transcription factor in respiratory epithelium carcinogenesis. *Mol Cancer Res.* 2007, 5, 120, 109–120.
180. **Shaulian E.** AP-1—the Jun proteins: oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal.* 2010, 22, 894–899.
181. **Vleugel MM, Greijer AE, Bos R, van der Wall E, van Diest PJ.** C-JUN activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer. *Hum Pathol.* 2006, 37, 668–674.

182. **Sorrell DA, Szymanowska M, Boutinaud M, Robinson C, Clarkson RWE, Stein T, Flint DJ, Kolb AF.** Regulation of genes encoding proteolytic enzymes during mammary gland development. *J Dairy Res.* 2005, 72, 463–515.
183. **Behren A, Simon C, Schwab RM, Loetzsch E, Brodbeck S, Huber E, Stubenrauch F, Zenner HP, Iftner T.** Papillomavirus E2 protein induces expression of the matrix metalloproteinase-9 via the extracellular signal- regulated kinase/ activator protein-1 signaling pathway. *Cancer Res.* 2005, 65, 11613–11621.
184. **Gershenwald JE, Sumner W, Calderone T, Wang Z, Huang S, Bar-Eli M.** Dominant, negative, transcription factor, AP-2, augments, SB-2 melanoma tumor growth in vivo. *Oncogene.* 2001, 20, 3363–3375.
185. **Fan WH, Karnovsky MJ.** Increased MMP-2 expression in connective tissue growth factor over- expression vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2002, 277, 9800–9805.
186. **Guccione M, Silbiger S, Lei J, Neugarten J.** Estradiol upregulates mesangial cell MMP-2 activity via the transcription factor AP-2. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002, 282, F164–169.
187. **Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM.** 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, 1.
188. **Sivak JM, West-Mays JA, Yee A, Williams T, Fini ME.** Transcription factors Pax6 and AP-2 alpha interact to coordinate corneal epithelial repair by controlling expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *Mol Cell Biol.* 2004, 24, 245–257.
189. **Eckert D, Buhl S, Weber S, Jager R, Schorle H.** The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol.* 2005, 6, 246–250.
190. **Vincent MP.** The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. ed. IM Clark. *Matrix Metalloproteinase Protocol.* New York: Totowa: Humana, 121–148.
191. **Nagase H.** Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1997, 378, 151–60.
192. **Uría JA, López-Otín C.** Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer Res.* 2000, 17, 4745–4751.
193. **Pei D, Weiss SJ.** Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin- 3 zymogen. *Nature.* 1995, 375, 244–247.
194. **Edwards DR.** *The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) In Matrix Metalloproteinases Inhibitors in Cancer Therapy.* [red.] Appelt K, Totowa NJ, Clendennin NJ. New York: Humana Press, 2001.

195. **Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, Kehry MR, Libby P, Schönbeck U.** Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implication for atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001, 107, 1117–1126.
196. **Mott JD, Thomas CL, Rosenbach MT, Takahara K, Greenspan DS, Banda MJ.** Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer release a metalloproteinase inhibitor. *J Biol Chem.* 2000, 11, 1384–1390.
197. **Palosaari H.** *Matrix metalloproteinases (MMPs) and their specific tissue inhibitors (TIMPs) in mature human odontoblasts and pulp tissue.* Oulu Finland: University of Oulu, 2003.
198. **Bigg HF, Morrison CJ, Butler GS, Bogoyevitch MA, Wang Z, Soloway PD, Overall CM.** Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Cancer Res.* 2001, 61, 3610–3618.
199. **Wang Z, Juttermann, R, Soloway PD.** TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem.* 2000, 275, 26411–26415.
200. **Gacko M.** Mechanizmy aktywacji, znaczenie biologiczne i inhibitory metaloproteaz macierzy międzykomórkowej. *Post Hig Med Dosw.* 2001, 55, 303–318.
201. **Caterina JJ, Yamada S, Caterina NCM, Longenecker G, Holmback K, Shi J, Yermovsky AE, Engler JA, Birkedal-Hansen H.** Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (Timp-2) gene alters proMMP-2 activation. *J Biol Chem.* 2000, 275, 26416–26422.
202. **Łukaszewicz-Zajac M, Mroczo B, Szmikowski M.** Znaczenie metaloproteinaz oraz ich inhibitorów w raku żołądka. *Postepy Hig Med Dosw.* 2009, 63, 258–265.
203. **Elahi M, Rakhshan V, Ghasemian NT, Moshref M.** Prognostic value of transforming growth factor beta 1 TGF- $\beta$ 1 and matrix metalloproteinase 9 MMP-9 in oral squamous cell carcinoma. *Biomarkers.* 2012, 17, 21–7.
204. **Wlazlak E, Surkont G, Kobos J, Tyliński W, Stetkiewicz T, Suzin J.** Ekspresja metaloproteinaz MMP-1, MMP-9 oraz tkankowego inhibitora metaloproteinazy TIMP-1 w przypadkach raka endometrium oraz rozrostów błony śluzowej jamy macicy. *Przegl Menopauz.* 2006, 6, 363–366.
205. **Streuli C.** Extracellular matrix remodeling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 1999, 11, 634–640.
206. **Singer ChE, Kronsteiner N, Marton E, Kubista M, Cullen KJ, Hirtenlehner K, Seifert M, Kubista E.** MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. *Breast Cancer Res Treat.* 2002, 72, 69–77.

207. **Lijnen HR.** Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost.* 2001, 86, 324–333.
208. **Vempati P, Karagiannis ED, Popel AS.** A biochemical model of the matrix metalloproteinase 9 activation and inhibition. *J Biol Chem.* 2007, 282, 37585–37596.
209. **Singh S, Barrett J, Sakata K.** ETS proteins and MMPs: partners in invasion and metastasis. *Curr Drug Targets.* 2002, 3, 359–367.
210. **Messerli FH.** TIMPs, MMPs and cardiovascular disease. *J Eur Heart.* 2004, 25, 1475–1476.
211. **Kurzepa J, Bartosik-Psujek H, Suchożębska-Jesionek D, Rejda K, Stryjcka-Zimmer M, Stelmasik Z.** Rola metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w patogenezie stwardnienia rozsianego. *Neurol Neurochir Pol.* 2005, 39, 63–67.
212. **Dery MC, Themsche C, Provencher D, Mes-Masson AM, Asselin E.** Characterization of EN-1078D, a poorly differentiated human endometrial carcinoma cell line: a novel tool to study endometrial invasion in vitro. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007, 5, 38–51.
213. **Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O’Higgins N.** Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* 2000, 2, 252–257.
214. **Rao JS.** Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer.* 2003, 3, 489–501.
215. **Tang CH, Tan TW, Fu WM, Yang RS.** Involvement of matrix metalloproteinase-9 in stromal cell- derived factor-1/CXCR4 pathway of lung cancer metastasis. *Carcinogenesis.* 2008, 29, 35–43.
216. **Fu X-R, Zhang C, Chen C-Y, Zhang L, Wang L-X, Wang B-H, Liu X-., Zhang M-Z.** Expression and significance of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in non-melanoma skin cancer. *Chin J of Onc.* 2012, 34, 5, 369–373.
217. **Orimoto AM, Neto CF, Pimentel ERA, Sanches JA, Sotto MN, Akaishi E, Ruiz IRG.** High numbers of human skin cancers express MMP2 and several integrin genes. *J of Cut Pathol.* 2008, 35, 3, 285–291.
218. **Sullu Y, Demirag GG, 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, 747–53.
219. **Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z.** Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010, 1, 141, 52–67.
220. **Chang C, Werb Z.** The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 2001, 11, 37–43.



221. **Caudroy S, Polette M, Nawrocki-Raby B, Cao J, Toole BP, Zucker S, Birembaut P.** EMMPRIN- mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clinl Exp Metast.* 2002, 19, 697–702.
222. **Davidson B, Goldberg I, Berner A, Kristensen GB, Reich R.** EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis.* 2003, 20, 161–169.
223. **Cowden Dahl KD, Zeineldin R, Hudson LG.** PEA3 is necessary for optimal epidermal growth factor receptor- stimulated matrix metalloproteinase expression and invasion of ovarian tumor cells. *Mol Cancer Res.* 2007, 5, 413–421.
224. **Ghajar CM, Bissell MJ.** Extracellular matrix control of mammary gland morphogenesis and tumorigenesis: insights from imaging. *Histochem Cell Biol.* 2008, 130, 1105–1118.
225. **Dumas J, Kanitakis S, Charvat S, Euvrard M, Faure A, Claudy V.** Expression of basement membrane antigens and matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 1999, 19, 2929–38.
226. **Piao S, Zhao S, Guo F, Xue J, Yao G, Wei Z, Huang Q, Sun Y, Zhang B.** Increased expression of CD147 and MMP-9 is correlated with poor prognosis of salivary duct carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012, 138, 627–35.
227. **Bogaczewicz J, Dudek W, Zubilewicz T, Wroński J, Przywara S, Chodorowska G, Krasowska D.** Rola metaloproteaz macierzy i ich tkankowych inhibitorów w angiogenezie. *Pol Merk Lek.* 2006, 121, 80–85.
228. **Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH.** A novel role of metalloproteinases in cancer- mediated immunosuppression. *Cancer Res.* 2001, 61, 237–242.
229. **John A, Tuszynski G.** The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res.* 2001, 7, 14–23.
230. **Chen G-S, Lu M-P, WU M-T.** Differential expression of matrix metalloproteinase-2 by fibroblasts in co-cultures with keratinocytes, basal cell carcinoma and melanoma. *J of Derm.* 2006, 33, 609–615.
231. **Hernández-Pérez M, El-hajahmad M, Massaro J, Mahalingam M.** Expression of gelatinases (MMP-2, MMP-9) and gelatinase activator (MMP-14) in actinic keratosis and in in situ and invasive squamous cell carcinoma. *Am J Dermatopathol.* 2012, 34, 723–8.
232. **Monhian N, Jewett BS, Baker SR, Varani J.** Matrix metalloproteinase expression in normal skin associated with basal cell carcinoma and in distal skin from the same patients. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2005, 7, 238–243.
233. **Roh MR, Zheng Z, Kim HS, Kwon JE, Jeung HC, Rha SY, Chung KY.** Differential expression patterns of MMPs and their role in the invasion of epithelial

- pre-malignant tumors and invasive cutaneous squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2012, 92, 236–42.
234. **Kerkela E, Saarialho-Kere U.** Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol.* 2003, 12, 109–125.
235. **Poswar FO, Fraga CA, Farias LC, Feltenberger JD, Cruz VP, Santos SH, Silveira CM, de Paula AM, Guimarães AL.** Immunohistochemical analysis of TIMP-3 and MMP-9 in actinic keratosis, squamous cell carcinoma of the skin, and basal cell carcinoma. *Pathol Res P.* 2013, 209, 1, 705–709.
236. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987, 162, 1, 156–9.
237. **Słomski R.** *Analiza DNA teoria i praktyka.* Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, 2008.
238. **Dębski T, Lembas L, Jethon J.** Basal cell carcinoma. Current views (Part I). Epidemiology, pathogenesis, clinical features. *Postępy nauk medycznych.* 2009, 9, 696–705.
239. **Kwiatkowski P, Godlewski J, Śliwińska-Jewsiewicka A, Kmiec Z.** Rola metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w procesie inwazji nowotworu. *Pol. Ann. Med.* 15, 2008, 1, 43–50.
240. **Vanjaka-Rogošić L, Puizina-Ivić N, Mirić L, Rogošić V, Kuzmić-Prusac I, Babić MS, Vuković D, Mardešić S.** Matrix metalloproteinases and E-cadherin immunoreactivity in different basal cell carcinoma histological types. *Acta Histochem.* 29 01 2014, electronic publication.
241. **Varani J, Hattori Y, Chi Y, Schmidt T, Perone P, Zeigler ME, Fader DJ and Johnson TM.** Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *Br J Cancer.* 2000, 82, 3, 657–665.
242. **Łapka A, Draj J, Goździalska A, Jaśkiewicz J.** Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej w glejakach. *Postępy Psychiatrii i Neurologii.* 17, 2008, 3, 207–211.
243. **Quatresooz P, Martalo O, Pierard GE.** Differential expression of alpha1 (IV) and alpha 5 (IV) collagen chains in basal-cell carcinoma. *J Cutan Pathol.* 2003, 30, 548–552.
244. **Rasmussen HB, Teisner B, Andersen JA, Brandrup F, Purkis T, Leigh I.** Immunohistochemical studies on the localization of fetal antigen 2 (FA2), laminin, and collagen type 4 in basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol.* 1991, 18, 215–219.
245. **El-Bahrawy M, El-Masry N, Alison M, Poulson R, Fallowfield M.** Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2003, 148, 964–70.

246. **Dahl E, Aberg M, Rausing A, Rausing EL.** Basal cell carcinoma. An epidemiologic study in a defined population. *Cancer*. 1992, 70, 1, 104–107.
247. **Deja M, Teresiak E, Buczyńska-Górna M.** Analiza częstości występowania poszczególnych typów histologicznych raka podstawnokomórkowego skóry, umiejscowienia zmian oraz wieku i płci pacjentów. *PDiA*. 2004, 21, 5, 231–239.
248. **Stojanovic S, Poljacki M, Preveden R.** Clinico-epidemiologic characteristics of superficial multiple basal cell carcinoma at the Dermatovenerology Clinic in Novi Sad 1986–1996. *Med. Pregl.* 1999, 52, 1–2, 62–65.
249. **Kricker A, Armstrong, Phil D, Vibeke Hansen V, (Hons) BA, Watson A, Singh-Khaira G, Lecathelinais C, Goumas C, Girgis A.** Basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma growth rates and determinants of size in community patients. *J Am Acad Dermatol.* 70, 3, 456–464.
250. **Kowalski M, Walczak A, Majsterek I.** Metaloproteinazy macierzowe (MMPs) – nowoczesne markery molekularne do prognozowania i terapii jaskry. *Postepy Hig Med Dosw.* 2008, 62, 582–592.
251. **Carpenter CD, Simon AE.** Preparation of RNA Arabidopsis. *Protocols Methods in Molecular Biology™*. 1998, 82, 85–89.
252. **Heynes SR.** *RNA-Protein Interaction Protocols*. New Jersey: Humana Press, Totowa, 1999.
253. **Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL.** High stability of mRNAs postmortem and protocols for their assessment by RT-PCR. *Br Res Protocols*. 2001, 8, 3, 212–218.
254. **Ball TB, Plummer FA, HayGlass KT.** Improved mRNA Quantitation in Light-Cycler RT-PCR. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003, 130, 82–86.
255. **Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ.** *PCR Protocols A guide to Methods and Applications*. London: Academic Press, 1990.
256. **Weissensteiner T, Griffin HG, Griffin A.** *PCR Technology Current innovations*. Florida: CRC PRESS LLC, 2004.
257. **Bertlett JMS, Sterling D.** *PCR Protocols*. New Jersey: Humana Press Totowa, 2003.
258. **Woessner JF Jr.** Matrix Metalloproteinase Protocols MMPs and TIMPs. *Methods in Molecular Biology™*. 2001, 151, 1–23.



# Aneks

## 1. Metody biologii molekularnej użyte w prezentowanej pracy

### 1.1. Izolacja RNA z homogenatu tkanek – zasada metody

Poddawane homogenizacji tkanki zawierają mieszaninę związków organicznych, w tym białek, cukrów, lipidów, kwasów nukleinowych i innych ważnych dla budowy i funkcjonowania komórek związków [251]. Główną przeszkodą w izolacji kwasów nukleinowych z komórek jest obecność białek, ponieważ cząsteczki kwasów nukleinowych DNA i RNA wykazują cechy polianionów, które w komórkach bardzo chętnie asocjują z kationowymi białkami [252]. Zatem podstawą procesu izolacji jest oddzielenie kwasów nukleinowych od, związanych z nimi, białek. Preparat musi zostać więc odbiałczony. Ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi jest jedną z częściej stosowanych metod służących do usuwania białek z zawiesin kwasów nukleinowych. W procedurze tej wykorzystywany jest Trizol oraz chloroform [251]. Odczynniki te pozwalają denaturować białka i jednocześnie stanowią rozpuszczalnik dla cząsteczek RNA. Chloroform dodatkowo ułatwia rozdzielenie fazy wodnej od fazy organicznej. Polarny charakter reszt fosforanowych kwasu nukleinowego sprawia, że w wyniku ekstrakcji uzyskany jest koloid cząsteczek kwasu nukleinowego w fazie wodnej. Uzyskany koloid należy zageścić [252]. W tym celu wykorzystywany jest etanol lub izopropanol, które powodują wytrącenie kwasu nukleinowego z roztworu. Bardziej lotnym alkoholem jest etanol, dlatego nawet w przypadku zastosowania izopropanolu, uzyskane precypitaty powinny zostać przemyte etanolem, celem podniesienia efektywności izolacji. Odparowanie alkoholu pozwala oczyścić preparat z pozostałości odczynnika. Precypitaty na tym etapie nie powinny wyschnąć [251].

W sytuacji, kiedy izolowanym kwasem nukleinowym jest RNA, należy zwrócić szczególną uwagę na konieczność dezaktywacji RNaz, które degradują preparat RNA. W tym celu stosuje się inhibitory RNaz lub też związki powodujące inaktywację tych enzymów. Podczas wykonywania procedury należy również zabezpieczyć preparat przed RNazami pochodzenia zewnętrznego. Jako inhibitory RNaz stosowane są związki takie: jak izotiocyanian guanidyny, pirowęglan dietylu (DEPC) czy SDS (siarczan dodecylu sodu) [252].

## 1.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji RT-PCR (Reverse Transcription PCR) – zasada metody

Ekspresja genów w komórce to proces dwuetapowy, rozpoczynający się od przepisanie informacji genetycznej z genomowego DNA na RNA, a kończący na biosyntezie białka na matrycy mRNA [253]. Obecność mRNA w badanych tkankach jest potwierdzeniem ekspresji genu. W wyniku translacji powstanie na matrycy mRNA białko, spełniające w komórce funkcje biologiczne. W trakcie ekspresji genu występują jeszcze dwa etapy regulatorowe – modyfikacja potranskrypcyjna i modyfikacja potranslacyjna [254].

W związku z istotą pojawienia się w komórce mRNA dla danego genu, ocena ekspresji na poziomie RNA jest możliwa przy użyciu wielu metod biologii molekularnej. Szczególnie przydatna w tym zakresie jest reakcja RT-PCR. Metoda ta opiera się na przepisaniu wyizolowanego z badanej tkanki RNA na bardziej stabilne cDNA z użyciem odwrotnej transkryptazy (RT – *Reverse Transcriptase*), która jest genetycznie zmodyfikowanym enzymem wytwarzanym przez retrowirusy. Dzięki metodzie tej możliwe jest oszacowanie ekspresji RNA poprzez ilościową ocenę transkryptów [254]. Charakterystyczną cechą powstającego cDNA jest brak sekwencji intronowych.

W reakcji RT-PCR wyróżnia się dwa etapy. Pierwszym etapem jest reakcja odwrotnej transkrypcji, etap konieczny ze względu na fakt, że amplifikacja RNA nie może zachodzić w reakcji łańcuchowej polimerazy, drugi etap to wykładnicze zwielokrotnienie ilości wcześniej otrzymanego cDNA w reakcji PCR [253]. Wymagany mi składnikami do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji są: matrycowa cząsteczka RNA; właściwe startery (primery) – jednoniciowe oligonukleotydy, które rozpoczynają reakcję odwrotnej transkrypcji i są komplementarne do odpowiednich sekwencji przepisywanego RNA; odwrotna transkryptaza; dNTPs – mieszanina deoksyrybonukleotydów, jest konieczna do syntezy cDNA; bufor RT-PCR, zapewniający optymalne fizjologiczne środowisko działania odwrotnej transkryptazy; inhibitory rybonukleaz; wodę traktowaną DEPC (dietylopirowęglań), blokujący RNazy obecne w wodzie [254].

Obecnie RT-PCR jest rutynową metodą wykorzystywaną w pracy z transkryptami RNA w biologii molekularnej. Stała się techniką preparatywną poprzedzającą metody takie jak: konstruowanie sond do hybrydyzacji, sekwencjonowanie, tworzenie bibliotek cDNA, klonowanie oraz wiele innych.

### 1.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR (*Polymerase Chain Reaction*) – zasada metody

Technika PCR jest obecnie jednym z podstawowych narzędzi biologii molekularnej. Metoda ta pozwala na amplifikację śladowych nawet ilości DNA, dzięki czemu możliwe są dalsze badania. Prostota, czułość, stosunkowo krótki czas wykonania reakcji, czy niski koszt to tylko część z zalet metody PCR. Wysoka czułość metody, w tym przypadku jest jednocześnie największą wadą reakcji łańcuchowej polimerazy. Jeżeli dojdzie do zanieczyszczenia próbki nawet minimalną ilością obcego DNA, dochodzi również do amplifikacji tego materiału, co powoduje zafalszowanie wyniku [255].

Reakcja łańcuchowej polimerazy jest enzymatycznym powieleniem fragmentu DNA, które zachodzi w warunkach *in vitro*. Metoda ta jest odzwierciedleniem procesu replikacji DNA. W wyniku pojedynczego procesu amplifikacji otrzymywane jest do  $10^6$  –  $10^9$  razy początkowej ilości kopii amplifikowanego fragmentu DNA. Każda nieuszkodzona cząsteczka DNA może być użyta jako matryca do reakcji PCR, jeżeli zapewnione zostaną odpowiednie dla reakcji warunki [255]. Warunkiem niezbędnym jest znajomość sekwencji flankujących powielany odcinek DNA, aby było możliwe zaprojektowanie primerów komplementarnych do końców 3' obydwóch nici powielanego odcinka matrycy. To właśnie hybrydyzacja starterów do zdenaturowanego, wyjściowego DNA jest inicjatorem procesu syntezy ściśle określonego odcinka. W sytuacji gdy sekwencje flankujące nie są znane, projektowane są zdegenerowane startery [256].

PCR obejmuje trzy cyklicznie powtarzające się etapy. Trwają one od kilkunastu do kilkudziesięciu sekund i przebiegają w odmiennych temperaturach. Pierwszym etapem jest termiczna denaturacja dwuniciowej struktury matrycowego DNA, wyjściowego oraz namnożonego w poprzednich cyklach [257]. Etap ten jest przeprowadzany w temperaturze 95°C a jego wynikiem jest pęknięcie wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami DNA. W drugim etapie dochodzi do hybrydyzacji oligonukleotydowych starterów do jednoniciowych fragmentów DNA, powstałych w pierwszym etapie [256]. Primery łączą się komplementarnie z dwiema naprzeciwległymi niemi DNA w rejonie flankującym powielany fragment. Temperatura *annealingu* zawiera się najczęściej w przedziale od 40°C do 65°C. Precyzyjny dobór temperatury warunkuje właściwy przebieg reakcji. Temperatura w tym etapie jest uzależniona od sekwencji i długości primerów, gdyż zbyt niska temperatura powoduje powstanie niespecyficznych wiązań. Długość stosowanych starterów wynosi od 18-30 nukleotydów, najczęściej około 20 nukleotydów. Primery zawierają także zbliżoną ilość zasad G+C [255]. Ostatnim etapem łańcuchowej reakcji polimerazy jest elongacja. Proces ten obejmuje wydłużanie sekwencji startera od końca 3' po-

przez dołączanie komplementarnych dNTP do czasu zakończenia syntezy całej amplifikowanej nici. Elongacja prowadzona jest przez termostabilną polimerazę DNA i zachodzi w obecności jonów  $Mg^{2+}$ . Temperatura  $72^{\circ}C$  jest temperaturą optymalną dla wydajnej polimeryzacji [256].

Powyżej opisane etapy składają się na jeden pełny cykl reakcji PCR, który jest powtarzany 25–40 razy. W pierwszym cyklu powielany fragment DNA zostaje skopiowany od miejsca przyłączenia startera na różną długość. W kolejnym cyklu primery hybrydują również do nowo zsyntezowanych fragmentów nici DNA, po czym termostabilna polimeraza amplifikuje je aż do miejsca przyłączenia pierwszego startera, tym samym zawężana zostaje długość powielanego odcinka [257]. Powoduje to, że w ostatnim etapie drugiego cyklu otrzymywane są fragmenty DNA o pożądanej długości. Przyjmując 100% wydajność każdego cyklu łańcuchowej reakcji polimerazy, to ilość namnożonych kopii fragmentów DNA wzrasta wykładniczo i równa jest  $2^n$ , gdzie  $n$  oznacza liczbę cykli [257].

## 1.4. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym – zasada metody

Elektroforeza jest to ruch naładowanych cząstek w przyłożonym zewnątrz polu elektrycznym. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym umożliwia identyfikację, rozdział a także oczyszczanie fragmentów DNA. Aparaty używane do elektroforezy w żelu agarozowym zazwyczaj ustawione są poziomo. W buforach elektroforetycznych o pH zbliżonym do obojętnego, cząsteczki DNA posiadają ujemny ładunek wypadkowy, zatem w przyłożonym polu elektrycznym migrują do dodatnio naładowanej anody [257].

Ruchliwość elektroforetyczna cząsteczek DNA jest zależna od kilku czynników. Jednym z takich czynników jest masa – szybkość migracji cząstek jest odwrotnie proporcjonalna do logarytmu dziesiętnego z liczby par zasad. Ruchliwość cząsteczek DNA zależy też od konformacji tych cząsteczek, a mianowicie koliste DNA migruje szybciej niż liniowe. Migracja DNA w polu elektrycznym zależy też od składu buforu elektroforetycznego oraz pH i siły jonowej tego buforu użytego do elektroforezy, tzn. jeśli jest zbyt mała ilość jonów to ruchliwość cząsteczek DNA jest niewielka, natomiast roztwór o zbyt dużej sile jonowej może prowadzić do denaturacji DNA, ponieważ podczas elektroforezy w takim buforze wydzielane są duże ilości ciepła. Buforami stosowanymi najczęściej są: TPE (Tris-phosphate-EDTA), TAE (Tris-acetate-EDTA) czy TBE (Tris-boran-EDTA).

Innym czynnikiem wpływającym na ruchliwość elektroforetyczną jest napięcie pola elektrycznego, gdzie optymalna wartość nie powinna być większa niż 5V na 1cm odległości pomiędzy elektrodami. Temperatura otoczenia tylko w niewielkim stopniu wpływa na ruchliwość elektroforetyczną kwasów nukleinowych. Skład zasad azotowych natomiast nie powoduje zmian w szybkości migracji cząsteczek DNA.



Agaroza jest oczyszczoną frakcją agaru izolowanego z krasnorostów. Agaroza jest polisacharydem złożonym z około 400 cząsteczek agarobiozy, ułożonych linio-wo. Agarobioza natomiast, jest dwucukrem składającym się z D-galaktozy i 3,6-anhydro-L-galaktozy. Żel agarozowy otrzymywany jest przez dodanie do buforu odpowiedniej ilości agarozy i ogrzewanie mieszaniny do całkowitego rozpuszczenia [257]. Żel powstaje w wyniku odwracalnej reakcji egzotermicznej, a do zestalenia agarozy dochodzi w temperaturze poniżej 40°C, wówczas polisacharyd ten osiąga postać porowatego żelu. Pojedyncze łańcuchy agarobioz tworzą rozgałęziające się dwuniciowe, helikalne struktury prowadzą do powstania przestrzennej sieci. Rozmiar porów zależy od zastosowanej procentowości agarozy. Im mniejsze stężenie agarozy, tym niższe usieciowanie żelu, a tym samym większe pory. Dzięki temu możliwy jest rozdział DNA o szerokim zakresie mas cząsteczkowych. Zakres ten można dodatkowo zwiększyć, stosując agarozy o niskiej temperaturze topnienia. Zazwyczaj wykorzystuje się żele, których stężenie agarozy waha się w zakresie od 0,4–4%. Taki zakres umożliwi rozdział cząsteczek DNA o wielkości od 0,1 – 60kbp [237].

Użycie żelu agarozowego do rozdziału cząsteczek kwasów nukleinowych gwarantuje łatwość w przygotowaniu oraz niskie koszty wykonania. Żele agarozowe niestety również posiadają pewne wady, do których należy niska trwałość, trudności w archiwizowaniu żeli, a także słabą rozdzielczość frakcji DNA, gorszą niż w przypadku żeli poliakrylamidowych.

Elektroforeza w żelu agarozowym umożliwia bezpośrednią lokalizację rozdzielanego fragmentu DNA w żelu. W tym celu stosowane są fluorochromy, zwłaszcza ich szczególny typ – związki interkalujące, które oddziałują z kwasami nukleinowymi. Przykładowym związkiem tego typu jest bromek etydyny (EtBr). Może być on dodawany do żelu przed polimeryzacją, lub żel może być inkubowany w roztworze bromku etydyny po rozdziale elektroforetycznym [237]. Bromek etydyny jest silnym karcynogenem, który interkaluje pomiędzy ułożone równolegle płaszczyzny komplementarnych zasad azotowych dwuniciowego DNA. Jest to możliwe dzięki płaskiej, hydrofobowej strukturze fluorochromu. Wzbudzenie bromku etydyny światłem UV o długości około 300nm, umiejscowionego pomiędzy dwoma łańcuchami DNA, wywołuje pojawienie się pomarańczowej barwy, co umożliwia uwidocznienie DNA. W pojedynczym prążku DNA zawiera się od około 10ng tego kwasu nukleinowego. Dla jednoniciowych kwasów nukleinowych RNA, wydajność barwienia jest znacznie mniejsza. W czasie rozdziału elektroforetycznego bromek etydyny porusza się w kierunku ujemnej elektrody – katody, co prowadzi do jego wypłukiwania z żelu do buforu [256].

Związki interkalujące pomiędzy łańcuchy DNA, zmniejszają ruchliwość elektroforetyczną o około 15%. Oprócz bromku etydyny często stosowanym barwnikiem jest SYBR Green. Czułość barwienia dwuniciowego DNA przez ten barwnik jest

około 25 razy większa od bromku etydyny. Ilościowej oceny zawartości DNA lub odpowiednio RNA można dokonać wykonując pomiar światła emitowanego przez EtBr. Metoda ta stosowana jest w przypadku niewielkiej zawartości kwasów nukleinowych czy zanieczyszczenia próbki. W takiej sytuacji analiza ta może być metodą alternatywną dla ilościowych oznaczeń kwasów nukleinowych przy użyciu techniki spektrofotometrycznej. Metody spektrofotometryczne nie są zalecane przy stężeniu DNA poniżej 250ng/μl czy też w przypadku znacznego zanieczyszczenia próbki substancjami, które absorbują promieniowanie UV [257].

Zanim badany preparat zostanie nałożony na żel należy obciążyć próbkę poddaną elektroforezie buforem obciążającym, zawierający składniki, które zwiększają gęstość próbki oraz barwniki. Wśród najczęściej stosowanych substancji obciążających znalazły się: glicerol, sacharoza i ficoll. Dzięki nim możliwe jest opadanie badanego DNA na dno studzienki żelu, co chroni próbkę przed dyfuzją do buforu elektroforetycznego. Barwniki takie jak błękit bromofenolowy lub cyjanian ksylenu używane w elektroforezie, pozwalają nie tylko na obserwację procesu wprowadzania próbki do studzienki, ale umożliwiają także określenie położenia próbki w trakcie rozdziału elektroforetycznego. Stosowane barwniki mogą posiadać odmienną od badanej próbki ruchliwość elektroforetyczną. Błękit bromofenolowy wędruje z prędkością przybliżoną do fragmentów DNA o wielkości 300–500bp, cyjanian ksylenu natomiast migruje analogicznie do fragmentów DNA o wielkości 3–5kbp. Czasem bufor obciążający zostaje wzbogacony o EDTA. Chroni on materiał przed degradującym działaniem nukleaz, a także hamuje reakcje enzymatyczne [258].

Można określić wielkości badanych fragmentów DNA przez odniesienie położenia prążka badanego do położenia prążka markera masowego. Jako wzorzec używany jest preparat składający się z odcinków DNA o znanej masie, która wyrażona jest jako liczba par zasad. Podczas rozdziału wzorzec migruje w żelu, w wyniku czego pojawiają się prążki. Każdy z powstających prążków reprezentuje odcinek DNA o znanej masie. Pomiar intensywności świecenia badanego prążka w odniesieniu do wzorcowego prążka pozwala na określenie ilościowej zawartości badanego preparatu [237].

Analiza elektroforegramu pozwala także na ocenę czystości produktów otrzymanych w reakcji PCR. Dodatkowe prążki lub smużenia mogą świadczyć o zanieczyszczeniu próbki. Powstają one w wyniku obecności niespecyficznych produktów czy też degradacji badanego materiału. Natomiast pojawienie się prążków o masie niższej od masy wzorca może być wynikiem nieużycia wszystkich składników PCR [237].

Ze względu na fakt, że żele agarozowe charakteryzują się niską trwałością, dlatego też najlepszym sposobem na prowadzenie dokumentacji i archiwizacji jest wykonanie fotografii cyfrowej. Do tego celu używa się transluminatora UV w połączeniu z aparatem cyfrowym. Otrzymane w ten sposób obrazy przechowywane są w formie elektronicznej.

## 2. Wykaz odczynników

Agaroza (Eurogentec, Belgia)  
Błękit bromofenolu (Sigma-Aldrich, USA)  
Bromek etydyny (Sigma-Aldrich, USA)  
Bufor do elektroforezy DNA 6X Orange Loading Dye Solution (Fermentas, Litwa)  
Bufor reakcyjny 10x AmpliBufferB (EURx, Polska)  
Butanol (POCh, Polska)  
Bufor obciążający do elektroforezy kwasów nukleinowych (Fermentas, Litwa)  
Deoksyrybonukleotydy dNTP (EURx, Polska)  
Etanol (POCh, Polska)  
Eter dietylowy kwasu pirowęglowego DEPC (Sigma, USA)  
Izopropanol (POCh, Polska)  
Kwas borowy (POCh, Polska)  
Marker wielkości kwasów nukleinowych GeneRuler™ 1kb Plus DNA ladder  
(Fermentas, Litwa)  
Metanol (POCh, Polska)  
Odczynniki do ekstrakcji RNA: Trizol, chloroform, izopropanol, etanol  
Polimeraza Perpetual OptiTaQ DNA Polymerase (EURx, Polska)  
Startery komplementarne do sekwencji w genie **COL1A1** (DNA Gdańsk, Polska)  
HU COL1A1 F 5'-ACGCATGAGCGGACGCTAACC-3'  
HU COL1A1 R 5'-AGTGTCTCCCTTGGGTCCCTCG-3'  
Startery komplementarne do sekwencji w genie **COL3A1** (DNA Gdańsk, Polska)  
HU COL3A1 F 5'-GGACACAGAGGCTTCGATGGACGA-3'  
HU COL3A1 R 5'-GGGGATCCAGGGAATCCGGCA-3'  
Startery komplementarne do sekwencji w genie **COL4A4** (DNA Gdańsk, Polska)  
HU COL4A4 F 5'-CCC CTC AGG ACC AGG GTG CAA-3',  
HU COL4A4 R 5'-AGG GGC GGATCGCCTCTTCCA-3'  
Startery komplementarne do sekwencji w genie **MMP-2** (DNA Gdańsk, Polska)  
HU MMP-2 F 5'-CAC TTT CCT GGG CAA CAA AT-3'  
HU MMP-2 R 5'-CTC CTC AAT GCC CTT GAT GT-3'  
Startery komplementarne do sekwencji w genie **MMP-9** (DNA Gdańsk, Polska)  
HU MMP-9 F 5'-TCC CTG GAG ACC TGA GAA CC-3'  
HU MMP-9 R 5'-GTC GTC GGT GTC GTA GTT GG-3'  
Startery komplementarne do sekwencji w genie **ACTB** (DNA Gdańsk, Polska)  
HU ACTB F5'-GGACTTCG AGCAAGAGATGG-3'  
HU ACTB R 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'  
RevertAid H Minus First stand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Litwa)  
RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Niemcy)

Tris (hydroksymetylo) aminometan (POCh, Polska)  
 Wapnia chlorek  $\text{CaCl}_2$  (POCh, Polska) Winian sodowo potasowy (POCh, Polska)  
 Wodorotlenek sodu (POCh, Polska)

### 3. Bufory i roztwory

Skład buforów użytych do elektroforezy:

#### **Bufor 5M TBE pH 8,13-8,23**

TRIS	54 g
kwas borowy	27,5 g
EDTA	2,92 g
H <sub>2</sub> O dest.	do 1000 ml

#### **Bufor 0,5M TBE pH 8,13 -8,23**

5M bufor TBE	100 ml
H <sub>2</sub> O dest.	900 ml

#### **Bufor obciążający – stock solution:**

50% glycerol	6,0 ml
2% błękit bromofenolowy	1,5 ml
2% cyjanoxylen	1,5 ml
H <sub>2</sub> O dest.	1,0 ml

#### **Żel do elektroforezy**

1,2 % agarozą, grubość żelu 5mm

agarozą	1,8 g
bufor TBE 0,5 mol/ml	120 ml
bromek etydyny	6 µl

## 4. Wykaz aparatury wykorzystanej do badań

Aparat cyfrowy (Olympus, USA)

Homogenizator Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik, Niemcy)

Kamera DS Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System  
(Kodak, USA)

Komora DNA/RNA UV- Cleaner UVC/T-AR (Biosan, Łotwa)

Mieszadło magnetyczne MS 11H (Wigo, Polska)

pH-metr Seven Easy (Mettler Toledo, Szwajcaria)

Spektrofotometr Cary 100 Bio UV- Visible (Varian Medical Systems, USA)

Termocykler Mastercycler gradient EP 5331 (Eppendorf, Niemcy)

Waga elektroniczna (RADWAG, Polska)

Wirówka laboratoryjna (Qualiton, USA)

Wirówka laboratoryjna MPW- 350 R (MPW Med.- Instruments, Polska)

Wirówka laboratoryjna MPW- 52 (MPW Med.- Instruments, Polska)

Wytrząsarka Polymax 1040 (Heidolph Instruments, Niemcy)

Zasilacz Power Pac HC (Bio-Rad, USA)

Zestaw do elektroforezy horyzontalnej (Kucharczyk, Polska)



# Spis tabel

Tabela 1. Fototypy skóry według Fitzpatricka ocenione na podstawie reakcji na pierwszą w roku ekspozycję na słońce, przez 45-60 minut w południe, w okresie lata, w szerokości geograficznej 20-45° [10] .....	15
Tabela 2. Rasy ludzkie – klasyfikacja wg fototypu skóry, podana przez Adamski i Kaszuba [11] .....	15
Tabela 3. Typy kolagenu wraz z genami odpowiedzialnymi za kodowanie poszczególnych białek i miejscem ich występowania w tkankach organizmu człowieka [19] .....	19
Tabela 4. Rodzaje MMPs wraz z podziałem na grupy i położeniem poszczególnych genów na autosomach w genomie ludzkim [156,161,190] .....	54
Tabela 5. Substraty dla poszczególnych rodzajów MMPs [156,161,190] .....	55
Tabela 6. Statystyki opisowe oraz rozkłady badanych pomiarów w podziale na typ raka – guzkowy i naciekający .....	72
Tabela 7. Statystyki opisowe oraz rozkłady badanych pomiarów w podziale na typ raka dla każdej z płci .....	73
Tabela 8. Statystyki opisowe oraz rozkłady badanych pomiarów w podziale na typ raka w każdej z grup wiekowych .....	74
Tabela 9. Statystyki opisowe oraz rozkłady badanych pomiarów w podziale na typ raka w każdej z grup lokalizacji (G – guz zlokalizowany na głowie, Tł – guz zlokalizowany na tułowiu) .....	75
Tabela 10. Statystyki opisowe oraz rozkłady badanych pomiarów w podziale na typ raka w każdej z grup w podziale na rodzaj fototypu .....	76
Tabela 11. Statystyki opisowe badanych parametrów ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC .....	78
Tabela 12. Różnice pomiędzy pomiarami ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 pod względem badanych parametrów w grupie T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC wraz z wynikami testu t Studenta i istotnością .....	79

Tabela 13. Statystyki opisowe badanych parametrów ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC .....	81
Tabela 14. Różnice pomiędzy pomiarami ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 pod względem badanych parametrów w grupie T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC wraz z wynikami testu t Studenta i istotnością .....	82
Tabela 15. Statystyki opisowe badanych parametrów ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC w podziale na grupy wiekowe.....	84
Tabela 16. Różnice pomiędzy pomiarami ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 pod względem badanych parametrów w grupie T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC wraz z wynikami testu t Studenta w poszczególnych grupach wiekowych wraz z wynikami testu t Studenta i istotnością .....	86
Tabela 17. Statystyki opisowe badanych parametrów ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC w podziale na grupy fototypów .....	89
Tabela 18. Różnice pomiędzy pomiarami ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 pod względem badanych parametrów w grupie T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC w poszczególnych grupach fototypów wraz z wynikami testu t Studenta i istotnością .....	91
Tabela 19. Statystyki opisowe badanych parametrów ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC w podziale na lokalizację guza na głowie (G) i tułowiu (Tł) .....	94
Tabela 20. Różnice pomiędzy pomiarami ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 pod względem badanych parametrów w grupie T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC w poszczególnych lokalizacjach wraz z wynikami testu t Studenta i istotnością .....	96
Tabela 21. Statystyki opisowe badanych parametrów ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnokomórkowym guzkowym i odmianie naciekającej BCC w grupie kobiet i mężczyzn .....	98



Tabela 22. Różnice pomiędzy pomiarami ekspresji mRNA dla dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV oraz MMP-2 i MMP-9 pod względem badanych parametrów w grupie T i NT w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC u kobiet i mężczyzn wraz z wynikami testu t Studenta i istotnością .....	100
Tabela 23. Zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-2 i spadkiem ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV, w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC .....	102
Tabela 24. Zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-9 i wzrostem ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV, w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC .....	103
Tabela 25. Zależność pomiędzy wzrostem ekspresji mRNA dla MMP-2 i wzrostem ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, w raku guzkowym i odmianie naciekającej BCC .....	104



# Streszczenie

**Wstęp:** Nowotwory stanowią istotny problem współczesnych czasów, powodując znaczną liczbę zgonów wśród ludzi. Rak podstawnocomórkowy skóry (BCC), zajmuje drugie miejsce wśród wszystkich występujących nowotworów złośliwych. BCC dotyczy przede wszystkim ludzi rasy białej i występuje częściej u mężczyzn niż u kobiet. Ryzyko zachorowania wzrasta z wiekiem, szczególnie w szóstej i siódmej dekadzie życia. Rak ten występuje na odsłoniętych częściach ciała, narażonych na promieniowanie słoneczne, najczęściej na twarzy. Guz BCC charakteryzuje się powolnym wzrostem, miejscową złośliwością i rzadko daje przerzuty.

Problem występowania BCC jest często bagatelizowany, ponieważ rak ten nie stanowi bezpośredniego zagrożenia życia, jednak po szerokim wycięciu zaniedbanej zmiany doprowadzić może do znacznych zniekształceń i deformacji. Z tego powodu BCC staje się przyczyną poważnych defektów kosmetycznych, obniżających jakość życia. Rozpoznanie BCC ustalane jest głównie na podstawie badania histopatologicznego wycinków tkanki zmienionej nowotworowo. Leczenie raka BCC prowadzone jest najczęściej poprzez chirurgiczne usunięcie zmiany. Niestety guz często nie jest usuwany w całości, co prowadzi do nawrotu. Powodem tego są trudności w ocenie marginesu zmiany. Obecnie dla rozpoznania BCC obok diagnostyki histopatologicznej, coraz częściej wprowadzane są metody biologii molekularnej. Śledzenie zmian na poziomie molekularnym częstokroć wyprzedza zmiany, które można ocenić w preparatach histologicznych. Jako markery rozróżniające tkankę nowotworową od zdrowej mogą być wykorzystane metaloproteiny (MMPs). Rozpoznanie histopatologiczne, uzupełnione o badania molekularne pozwoli na poszerzenie diagnostyki BCC, co znacznie zwiększy skuteczność oceny marginesu zmiany, a tym samym zwiększy skuteczność leczenia.

**Cel:** Celem niniejszej pracy było wykazanie i porównanie ekspresji transkryptów mRNA dla kolagenu typu I, III, IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w biopatach skórnych pobranych od chorych na raka podstawnocomórkowego skóry oraz w biopatach skóry zdrowej pobranej z marginesu guza, od tych samych pacjentów

**Materiał i metody:** Badania zostały wykonane w biopatach tkanki nowotworowej guzów podstawnocomórkowych skóry uzyskanych od chorych z Oddziału Klinicznego Dermatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Grupę kontrolną

stanowiły bioptaty zdrowej tkanki, pochodzącej z marginesu guza, od tych samych pacjentów. Materiał został pobrany chirurgicznie, w trakcie zabiegu usunięcia guza, od 85 pacjentów.

Obecność nowotworu oraz jego typ zostały rozpoznane badaniem klinicznym i potwierdzone badaniem histopatologicznym. Badaniem objęto 34 kobiety i 51 mężczyzn. U 45 pacjentów zmiana została sklasyfikowana jako BCC guzkowy, a u 40 pacjentów stwierdzono odmianę naciekającą BCC. W każdym przypadku znany był fototyp skóry pacjenta oceniony wg klasyfikacji Fitzpatricka oraz lokalizacja zmiany nowotworowej na ciele chorego. W bioptatach skóry pobranych od chorych na raka podstawnocomórkowego skóry wykonano oznaczenie ekspresji mRNA dla genów kolagenu typu I (*COL1A1*) kolagenu typu III (*COL3A1*), kolagenu typu IV (*COL4A4*), metaloproteinazy 2 (*MMP-2*), metaloproteinazy 9 (*MMP-9*) oraz genu reporterowego dla  $\beta$ -aktyny (*ACTB*). Oznaczenia wykonano zarówno w tkankach pobranych z guza BCC, które oznaczono jako T (tumor), jak i w tkankach zdrowych pochodzących z marginesu guza od tych samych pacjentów, które oznaczono jako NT (non-tumor). Z wszystkich pobranych bioptatów wyizolowano całkowite RNA.

**Wyniki:** W grupie pacjentów z rakiem guzkowym, ekspresja mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III oraz dla MMP-2 i MMP-9 była zawsze istotnie wyższa w tkankach guza niż w tkance zdrowej pobranej z marginesu guza u tych samych pacjentów. Natomiast poziom ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV był istotnie niższy w tkance guza niż w tkance pochodzącej z marginesu guza u tych samych pacjentów.

W grupie pacjentów z rakiem podstawnocomórkowym typu naciekającego analiza statystyczna wykazała wyniki podobne. Ekspresja mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III oraz dla MMP-2 i MMP-9 była zawsze istotnie wyższa w tkankach guza niż w tkance zdrowej pobranej z marginesu guza u tych samych pacjentów. Natomiast poziom ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV był istotnie niższy w tkance guza niż w tkance pochodzącej z marginesu guza u tych samych pacjentów. Uzyskane wyniki ekspresji mRNA dla oznaczanych parametrów miały podobną charakterystykę bez względu na wiek chorych, płeć, fototyp skóry, a także lokalizację zmiany nowotworowej na ciele.

**Wnioski:** W przebiegu raka podstawnocomórkowego skóry występują istotnie odmienne poziomy ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV i MMP-2 oraz MMP-9 w porównaniu do tkanek zdrowych pobranych z marginesu guza od tych samych pacjentów. Metaloproteinazy MMP-2 i MMP-9 mogą być wykorzystane jako molekularne markery toczącego się procesu nowotworowego w przebiegu raka podstawnocomórkowego skóry.

**Słowa kluczowe:** BCC, MMP-s, MMP-2, MMP-9, kolagen typu I, kolagen typu III, kolagen typu IV, ekspresja mRNA

# Abstract

**Introduction:** Presently, cancers have become one of the most significant problems as a disease that often results in thousands of deaths. Basal cell carcinoma (BCC) cancer has been ranked second in malignant tumors group. BCC symptoms most often appear among women than men and are connected with the white race. The risk increases with age, especially in the sixth and seventh decade of life. The cancer occurs on the parts of body that are exposed to the sunlight, most often on the face. BCC tumor grows slowly and is characterized by local malignancy and rarely metastasis. The BCC problem is often underestimated, because this type of cancer is not life endangered but after wide excision, neglected changes can lead to many deformations. For this reason BCC causes body, skin defects that seriously affect the quality of life. Diagnosis of BCC is mainly determined on histopathological examinations of pathological tissues. BCC treatment is usually carried out by the surgical removal of the pathological tissues. Unfortunately the tumor is not removed in its entirety, what leads to the cancer recurring. The reason for this is the difficulty in evaluating the change margin. Currently in BCC diagnosis molecular biology methods are being introduced more and more often as well as histopathological methods.

Following though the changes at the molecular level, very often precedes the changes that can be estimated at the histopathological level. Metalloproteinases (MMPs) are used as markers to differentiate cancerous and healthy tissue. Histopathological diagnosis complemented by molecular studies will enhance the diagnosis of BCC that will greatly increase the effectiveness of evaluation the change margin and will lead to better effectiveness of treatment.

**Objective:** The aim of the study is to determine and compare the expression of mRNA transcripts for collagen type I, III, IV and metalloproteinases MMP-2, MMP-9 in skin biopsies taken from patients with BCC of the skin and healthy skin biopsies taken from tumor margin, from the same patients.

**Material and Methods:** The study was performed in biopsies of tumor tissue of basal skin obtained from patients from Clinical Department of Dermatology at the University Hospital in Cracow. The biopsies of healthy tissues from the margin of the tumor taken from the same group of patients has become the group of control. The material has been obtained by surgery, during surgery that led to tumor removed from 85 patients. The presence of the tumor and its type has been identified by the

clinical examinations and confirmed by histopathological study. The study has included 34 women and 51 men. Among the 45 patients the change has been classified as nodular BCC, while 40 patients had infiltrative BCC. In every case a known skin phototype patient was assessed by Fitzpatrick classification and localization of the cancer tissue on the body of the patient.

In the biopsies of the skin taken from the patients with BCC was performed for determination of mRNA expression of type I collagen gene (*COL1A1*) of type III (*COL3A1*) and collagen type IV (*COL4A4*) metalloproteinase 2 (*MMP-2*), metalloproteinase 9 (*MMP-9*) and reporter gene  $\beta$ -actin (*ACTB*). Probes were taken from BCC that were labeled as T tumor and in healthy tissues taken from tumor margins from the same patients, labeled as NT (non-tumor). From all the collected biopsies total RNA were isolated.

**Results:** In the patients classified to have nodular cancer the expression of mRNA for collagen type I, collagen type III and MMP-2, MMP-9 were significantly higher in tumor tissue than in healthy tissue taken from the same patients. In contrast, the expression level of mRNA for collagen type IV was significantly lower in tumor tissue than in tissue taken from the margin of the tumor in the same patients. In patients with type- invasive BCC statistical analysis showed the similar results.

The expression of mRNA for collagen type I, collagen type III, for MMP-2 and MMP-9 was always significantly higher in tumor tissues than in healthy tissues, taken from the margin of the tumor, in the same patients. In contrast the mRNA expression level for collagen type IV was significantly lower in tumor tissues than in tissues from the margin of the tumor, in the same patients. The results of mRNA expression determined parameters have similar characteristics regardless of patients age, sex, skin phototype and the location of the tumor on the body.

**Conclusion:** In the course of basal cell carcinoma of the skin, one can perceived different expression levels of mRNA for collagen type I, collagen type II, collagen type IV and MMP-2, MMP-9 in comparison with healthy tissues that have been taken from the margin of the tumor tissue from the same patients.

Metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 can be used as molecular markers of ongoing process in the course of BCC of the skin.

**Keywords:** BCC, MMP-2, MMP-9, collagen type I, collagen type II, collagen type IV, the expression of mRNA

# Indeks

- 5-fluorouracyl 42, 45
- $\alpha_2$ -makroglobulina 52, 53, 55, 56, 109
- adipocyty 21
- adipokiny 21
- adiponektyna 21
- adipsyna 21
- agrekan 55, 56
- aktyna 17
- amplifikacja 36, 66, 67, 68
- androgeny 13, 22
- angiogeneza 33, 38, 39, 40, 57, 58, 59, 109, 116
- angiotensynogen 21
- apelina 21
- apolipoproteina E 21
- apoptoza 32, 34, 39, 45, 52, 58
- $\beta$ -katenina 37, 38, 111
- $\beta$ -aktyna 64, 68, 156
- BCC 9, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 57, 59, 61, 63, 64, 105, 106, 117
- BCC barwnikowy 29
- BCC guzkowy 28, 29, 39, 61, 63, 71, 72, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 86, 88, 89, 91, 93, 94, 96, 97, 98, 100, 102, 103, 104, 106, 107, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 119
- BCC postać wrzodziejąca 30
- BCC powierzchniowy 28, 29, 36, 39
- BCC twardzinopodobny 28, 29
- BCC typu naciekającego 29, 39, 61, 63, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 86, 88, 89, 91, 93, 94, 96, 97, 98, 100, 102, 103, 104, 106, 107, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 119
- białko AP-1 9, 47, 51, 109
- białko AP-2 9, 51, 109
- białko glidynylowe GLI 10, 34, 35, 46
- białko C-JUN 47
- białko FOS 51
- białko JUN 51
- białko KI-67 37
- białko P53 33, 34, 36, 38, 40
- białko RAS 33
- białko SHH 34, 35
- białko SMO 11, 34, 35, 46
- białko transportujące estry cholesterolu 21
- białko von Hippel-Lindau (VHL) 11, 40
- blaszka ciemna 16
- blaszka jasna 16
- błona podstawna 16, 17, 19, 20, 28, 40, 47, 56, 58, 107
- brachyterapia 9, 44
- brewikan 55
- bromek etydyny 68, 145, 146, 147
- cDNA 9, 48, 65, 66, 142, 147
- cetuksymab 46
- chirurgia Mohsa 10, 42, 43, 45
- cholesterol 22
- chondroblasty 18
- choroba Bowena 25, 29, 33, 36
- chrząstka 19, 27, 44
- COX-1 cyklooksygenaza 1 9, 38, 39
- COX-2 cyklooksygenaza 2 9, 38, 39, 108
- COX-3 cyklooksygenaza 3 9, 38
- cyklina B 34
- cyklina B1 35
- cyklina D 35, 36

cyklina D1 35, 36  
 cytokiny 21, 23, 38, 56, 59  
 czerniak 24, 25, 46, 57  
 czynnik martwicy nowotworów (TNF-tumor necrosis factor), 21

DNAzym Dz13 46  
 domena hemopeksynopodobna 49  
 domena katalityczna 48, 49

EGF 9, 10, 16, 50, 51, 55  
 E-kadheryna 37, 111  
 elektrodesykacja 42, 43  
 elektroforegram 68, 146  
 elektroforeza 68, 144, 147, 148, 149  
*EMMPRIN* 9, 58, 107, 111  
 entaktyna 16, 55, 56  
 epiligrina 16  
 epilizyna 54  
 erlotinib 46  
 estrogeny 13, 22, 23

fenotyp inwazyjny 116  
 FGF 9, 47  
 FGF-b (fibroblast growth factor-b) 40  
 FGFR 10, 40  
 fibroblasty 9, 17, 18, 20, 21, 23, 48, 58  
 fibrocyty 17  
 fibronektyna 16, 17, 55, 56  
 fibronektyna II 48, 49, 56  
 fibryna 55, 56  
 fibrynogen 55, 56  
 fluorochrom 145  
 fototyp skóry 15, 61, 63, 76, 88, 89, 90, 91, 92, 112, 113, 119  
 fragment NC1kolagenu 55, 56

gefitinib 46  
 gen *ACTB* 64, 68  
 gen *BCL 2* 47  
 gen *C-JUN* 46, 47  
 gen *COL1A1* 66  
 gen *COL3A1* 67  
 gen *COL4* 67

gen *FOS* 51  
 gen *HER2* 50  
 gen *H-RAS* 33  
 gen *hTR* 37  
 gen *JUN* 46, 51  
 gen *P53* 33, 34, 39, 40, 47  
 gen *PATCHED* 10, 34, 35, 46  
 gen *PRAD (CCND1)* 36  
 gen *RAS* 32, 33  
 gen trombospondyny-1 40  
 gen *VEGF* 39, 40, 41  
 gen *VHL* 40, 41  
 geny supresorowe 24, 32, 33, 40  
 glikozaminoglikany 20  
 gospodarka wodno-elektrolitowa 13, 20  
 gruczoły holokrynowe 22  
 gruczoły łojowe 13, 21, 22  
 gruczoły potowe apokrynowe 13, 21, 22  
 gruczoły potowe ekrynowe 13, 21, 23  
 GTP 10, 32

hemidesmosomy 19  
 HIF-1 10, 40  
 histocyty 21  
 HIV (human immunodeficiency virus) 10  
 HLH (Helix-Loop-Helix) 10  
 hormony płciowe 21  
 HPV (human papiloma virus) 10, 31

IGF-BP 10  
 Imiquimod 42, 45  
 immunosupresja 31  
 inhibitory kinazy tyrozynowej (tyrosine kinase inhibitors – TKI) 46  
 integryny 16, 40  
 interferon 10, 45, 53  
 interleukina 10, 21, 50, 53, 58  
 interleukiny 10, 21, 23, 48, 50, 53, 55

jednostki mieszkowo-łojowe 21, 22

kancerogeneza 30, 32, 33, 36, 116  
 kazeina 55, 56  
 keloidy 15



- keratyna 22  
keratynocyty 16, 23, 33, 48, 14  
kolagen 16, 17, 18, 19, 20, 23, 30, 40, 53, 55,  
56, 58, 59, 18, 61, 64, 68, 110  
kolagenazy 48, 54  
kolagen typu I 17, 19, 20, 53, 55, 56, 15, 18,  
61, 68, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 86,  
88, 89, 91, 93, 94, 96, 97, 98, 100, 104,  
107, 110, 111, 112, 113, 114, 116, 119  
kolagen typu II 17, 19, 20, 53, 55, 56, 15  
kolagen typu III 17, 19, 53, 55, 56, 15, 18, 61,  
64, 68, 110  
kolagen typu IV 16, 17, 19, 20, 53, 54, 55, 56,  
58, 59, 15, 61, 63, 64, 68, 77, 78, 79, 80,  
81, 82, 83, 84, 86, 88, 89, 91, 93, 94, 96,  
97, 98, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111,  
112, 113, 114, 115, 116, 119  
kolagen typu V 19, 20, 53, 55, 15  
kolagen typu VI 19, 20, 55, 15, 18  
kolagen typu VII 19, 20, 53, 55  
kolagen typu VIII 19, 55  
kolagen typu IX 19, 55  
kolagen typu X 17, 19, 49, 55, 18  
kolagen typu XI 19, 55  
kolagen typu XII 19, 55  
kolagen typu XIII 19, 55  
kolagen typu XIV 19, 55  
kolagen typu XV 19, 55  
kolagen typu XVI 19, 55  
kolagen typu XVII 19, 55  
kolagen typu XVIII 19, 55, 57  
kolagen typu XIX 19  
komórki Langerhansa 23  
komórki macierzyste 22  
komórki nowotworowe 20, 28  
kriochirurgia 42, 43  
kwas hialuronowy 20, 40  
kwas metyloaminolewulinowy 45
- laminina 16, 20, 49, 53, 55, 56, 57  
laseroterapia 42, 44  
leptyna 21  
limfocyty T 23  
LPL 10, 21
- macierz pozakomórkowa 9, 10, 16, 17, 40,  
47, 48, 50, 52, 56, 57, 58, 59, 108, 109,  
110, 115  
matrylizyny 54  
matuzumab 46  
melanina 20, 30, 14  
melanocyty 20, 22  
melanosomy 15, 14  
melanotropina 10  
MMP-1 17, 48, 51, 52, 53, 54, 55  
MMP-2 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56,  
57, 58, 59, 61, 63, 64, 67, 68, 71, 72, 74,  
75, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 86, 87,  
88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98,  
99, 100, 101, 102, 104, 76, 106, 107, 108,  
109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116,  
117, 119, 147  
MMP-3 48, 51, 52, 54, 55, 58  
MMP-7 48, 49, 53, 54, 55, 58  
MMP-8 53, 54, 55  
MMP-9 47, 48, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57,  
58, 59, 61, 63, 64, 67, 68, 71, 72, 74, 75,  
77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 88,  
89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99,  
100, 101, 103, 76, 106, 107, 108, 109, 110,  
111, 112, 113, 114, 115, 117, 119, 147  
MMP-10 54, 55  
MMP-11 51, 52, 54, 55  
MMP-12 53, 54, 56  
MMP-13 51, 54, 55, 56  
MMP-14 53, 54, 56  
MMP-15 53, 54, 56  
MMP-16 53, 54, 56  
MMP-17 53, 54, 56  
MMP-19 54, 56  
MMP-20 54, 56  
MMP-21 54, 56  
MMP-23 48, 49, 54, 56  
MMP-24 54, 56  
MMP-25 54, 56  
MMP-26 49, 54, 56  
MMP-27 54, 56  
MMP-28 54, 56

MMPs metaloproteinazy 9, 10, 11, 40, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61  
 MT-MMPs metaloproteinazy błonowe 50  
 naskórek 9, 13, 16, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 30, 37, 38, 41, 15, 18, 107, 108, 110  
 NBCCS 10, 35  
 neuropilina-1 41  
 nieczerniakowe raki skóry NMSC 10, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 105, 113  
 nowotwory 22, 23, 24, 25, 105  
 nowotwory łagodne 23, 24  
 nowotwory skóry 24, 25, 26, 28, 31, 32, 35, 41, 42, 57  
 nowotwory złośliwe 23, 24, 59, 105  
 osteoblasty 18  
 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) 21  
 panitumumab 46  
 PATCHED 34, 35, 46  
 paznokcie 13, 21, 22  
 PCR 10, 65, 66, 67, 68, 106, 142, 143, 144, 146  
 PDGF 10, 40, 51  
 peptyd sygnałowy 48, 49  
 perlekan 16, 55, 56  
 PGF (placental growth factor) 10  
 popromienne zapalenie skóry 26  
 primery 65, 66, 67, 68, 142, 144, 147  
 promieniowanie jonizujące 31, 36, 44, 45  
 promieniowanie UV 23, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 39, 50, 114  
 propeptyd 48, 49, 50, 51, 52  
 prostaglandyny 10, 38, 48, 53  
 proteoglikan 16, 17, 40, 53, 57, 18  
 protoonkogen fos 50  
 przydatki skóry 21  
 PTCH 34, 35  
 radioterapia 36, 42, 43, 44, 45, 46  
 rak skóry 23, 24, 25

rasa biała 24  
 rasa celtycka 15, 14  
 rasa czarna 26  
 rasa kaukaska 26, 27, 15, 14  
 rasy ludzkie 20, 14  
 rezystyna 21  
 rogowacenie starcze 25, 28  
 róg skórny 28  
 RT 11, 106, 142  
 SALT (skin associated lymphoid tissues) 11, 23  
 SCC 11, 24, 25, 26, 27, 28, 31, 36, 37, 57  
 siarczan chondroityny 20  
 siarczan dermatanu 20  
 siarczan heparanu 16, 20  
 siarczan keratanu 20  
 SIS (skin immune system) 23  
 skóra 13, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27, 28, 29, 30, 38, 48, 15, 18, 107, 108, 110, 114  
 skóra barwnikowa 28  
 skóra pergaminowata 25, 28  
 skóra właściwa 13, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 18, 110  
 skwalen 22  
 SMO 34, 35, 46  
 stany przedrakowe 25, 28  
 stromielizyny 17, 54  
 szlak sygnałowy Hedgehog 10, 34, 46  
 szlak sygnałowy sonik Hedgehog 34  
 teleangiektazje 44  
 teleradioterapia 9, 44  
 telopeptyd 17  
 tenascyna 17, 55, 56  
 terapia fotodynamiczna 42, 45  
 termoregulacja 13, 22, 23  
 TFPI2 52  
 TF (tissue factor) 11, 21  
 TGF 48, 51, 52  
 TGF $\beta$  11, 51, 52, 55  
 TIMPs 11, 49, 52, 53, 58, 59, 109  
 tkanka łączna 17, 18, 19, 21, 56, 107  
 tkanka łączna wiotka 21

- tkanka łączna zbita 17
- tkanka podskórna 21, 22, 18, 110
- tkanka tłuszczowa 13, 21, 27
- TNF czynnik martwicy nowotworu 9, 11, 21, 23, 48, 50
- transformacja nowotworowa 22, 24, 25, 33
- trombospondyna-1 39, 40
- trójglicerydy 22
  
- VEGF 11, 39, 40, 41, 47, 48, 50
- VEGFR 11, 39, 40
- Vismodegib 42, 46
- VLA (very late antigens) 11, 16
  
- warstwa brodawkowata 17
- warstwa jasna 13
- warstwa kolczysta 13
- warstwa podstawna 13, 22
- warstwa siateczkowa 20, 18
- warstwa ziarnista 13
  
- warstwa zrogowaciała 13
- warstwy podstawna 16, 25
- wisfatyna 21
- witamina D<sub>3</sub> 13, 32
- witronektyna 55, 56
- włosy 13, 21, 22, 27, 15, 14
- włókna klejorodne 18
- włókna kolagenowe 16, 17, 20, 21, 18
- włókna siateczkowe 18, 110
- włókna sprężyste 20
  
- zębopochodne guzy NBCCS 35
- zespół nabłoniaków znamionowatych 26, 31
  
- żel agarozowy 145
- żelatyna 20, 49, 55, 56, 59
- żelatynaza A 54
- żelatynaza B 54
- żelatynazy 59

