

Debreceni Orvostudományi Egyetem Fül-Orr-Gégeklinika (igazgató: Lampé István dr., egyetemi tanár) és a DOTE Bőrklínika** (igazgató: Nagy Endre dr., egyetemi tanár) közleménye

Plasma fibronectin szint vizsgálata fej-nyak tumoros beteganyagunkban

JÓKAY ISTVÁN DR.*, LAMPÉ ISTVÁN DR., DEBRECENI MARGIT DR.**, NAGY TIBÓR DR., SZÜCS JÁNOS DR.

Közlésre érkezett: 1989. július 2-án

Kulcsszavak: fej-nyak tumor, fibronectin, plasma fibronectin, tumor

A szerzők közleményükben 43 fej-nyak tumoros beteg plasma fibronectin szintjét vizsgálták. Munkájuk során arról akartak felvilágosítást kapni, van-e összefüggés a tumoros betegek plasma fibronectin szintje és a tumoros folyamat kiterjedése, localisatioja, szövettani típusa és a tumor metastatisáló képessége között. Eredményeik alapján a módszert nem tartják alkalmasnak a tumoros folyamat monitorozására. A közleményben egyúttal ismertetik a fibronectinek jellegzetes tulajdonságait, széles körű biológiai funkcióit.

Bevezetés

A fibronectin egy nagymolekula súlyú glycoprotein, (440 000 D) amely széleskörűen fordul elő az emberi szervezetben. Jelen van a kötőszöveti sejtekben, azok felszínén, a kötőszöveti állományban, a basalis membranban, a plasmában és egyéb testnedvekben [6, 7, 9, 15].

A fibronectinek fontos és teljeskörű funkcióit, jelentőségét még ma sem ismerik összességében, bár felfedezésük óta folynak kutatások természetük mindjobban való feltérképezésére. Az mindenesetre tény, hogy a fibronectinek széleskörű biológiai aktivitással rendelkeznek. Hatásaikat más makromolekulákhoz kötve fejtik ki, így egyebek között kötődnek számos sejt felszínéhez, fibrinhez, collagenhez, aktinhoz, complement komponensekhez, immunglobulinokhoz, baktériumokhoz [8]. A sejtfelszíni fibronectin legfontosabb biológiai funkciója a sejtalak, a sejt-sejt és sejt alapállomány közötti kapcsolat biztosítása. A fibronectin termelés általában az ép sejt funkciója, a malignusan transformálódott sejtek felszínén a fibronectin mennyiség csökken ill. eltűnik, ami szerepet játszhat a malignus sejtek morfológiai változásában és metastatisáló képességében [12].

A fibronectinek tanulmányozása a tumorsejtek tulajdonságainak megismerésével indult, de kiderült, hogy szerepet játszanak a szervezet védekezésében, mint nem specifikus immunregulálók.

A szervezetben betöltött igazolt, vagy feltételezett funkciója miatt több tanulmány foglalkozik a plasma fibronectin szint diagnosztikus szerepének vizsgálatával különböző megbetegedésekben, így rosszindulatú megbetegedésekben is [11, 16, 17].

* DOTE Fül-Orr-Gégeklinika, 4012 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.

Jelen közleményünk célja, hogy felvilágosítást kapjunk a plasma fibronectin szint diagnosztikus értékéről fej-nyak tumoros beteganyagon.

Beteg — anyag — módszer

43 különböző lokalizációjú és stádiumú fej-nyak tumoros beteget vizsgáltunk, átlagéletkoruk 56 év volt. A vizsgálatokban 9 nő (átlagéletkora 55 év) és 34 férfi (átlagéletkora 57 év) szerepelt. Kontrollként 50 egészséges (55 éves átlagéletkorú) egyén plasmája szerepelt.

A humán fibronectin mérése ELISA módszerrel történt. A módszer a DOTE Kórélettani Intézetben került kidolgozásra. A mérésnél felhasznált két ellenanyagot is itt állították elő. Az ellenanyagok polyclonális nyúl antihuman-fibronectin gammaglobulin voltak. A peroxydással jelzett polyclonális birka anti egér gammaglobulin Serotech készítmény volt.

Vizsgálatainkban a meghatározni kívánt fibronectin volt az antigén. Első lépésben a polyclonális nyúl anti-human fibronectinnel érzékenyítettük a szilárd fázist, ehhez kötöttük az antigént. Ezután az egér antifibronectinnel kapsoltuk, majd peroxydással jelzett anti-egér gammaglobulint adtunk hozzá, végül orthophenyléndiamid szubsztrátumot. Az enzimaktivitást a szubsztrát átalakulásával mértük. Az aktivitás nagysága arányos volt a vizsgálni kívánt antigén, jelen esetben a fibronectin mennyiségével.

Polystyren szövettenyésztő lemezt (Nunc 96-well plate, Denmark) érzékenyítettünk lyukanként 50 ul 1 ug/ml-es koncentrációjú Nátrium carbonat pufferben (0,1 M, ph: 9,6) oldott tisztított nyúl anti-human fibronectin gammaglobulinnal 16—20 órán át, 37 °C-on. Utána az érzékenyítés leállítása céljából 30 percig inkubáltuk (100 ul/lyuk) foszfat pufferrel (PBS:0,01 M, pH: 7,2) mely tartalmaz 0,05% Tween 20-at, 0,5% BSA-t és 0,5 M NaCl-ot.

Ezután 2x mostuk PBS-Tween 20-al, majd 50 ul megfelelő hígítású fibronectin standardot, ill. plasma hígításokat (3000×hígítás) mértünk a mélyedésekbe és 60 percig 37 °C-on inkubáltuk. A hígító oldat: PBS Tween 20,05 M NaCl, 0,5% BSA.

4x mostuk a lemezt PBS-Tween 20-al, majd 50 ul/lyuk antihuman fibronectin gammaglobulin monoclonális ellenanyaggal inkubáltuk 60 percig 37 °C-on. (oldás PBS-Tween 20, 0,5 M NaCl, 0,5% BSA oldatban).

Ismét mostuk a lemezt 4× PBS-Tween 20-al és 50 ul/lyuk tormaperoxydással conjugált birka anti-egér gammaglobulinnal inkubáltuk 60 percig 37 °C-on (oldás PBS-Tween 20, 0,5 M NaCl, 0,5% BSA oldatban).

Újra mostuk a lemezt 4×, majd 50 ul/lyuk szubsztrátumot — 0,003 M, pH: 5,0/ — mértünk a mélyedésekbe, 30 percig szobahőmérsékleten sötét helyen állni hagytuk, majd 50 ul 4nH₂SO₄ -al leállítottuk a reakciót. Az abszorbentiát 405 nanometeren mértük.

Eredmények

Vizsgálataink célja felvilágosítást nyerni arról, hogy van-e korreláció a tumoros betegek plasma fibronectin szintje és a tumoros folyamat kiterjedése, lokalizációja, a tumorok szövettani típusa között, figyelembe véve a beteg nemét és korát is. Az 1. táblázat a 43 fej-nyak tumoros beteg átlag plasma fibronectin szintjét tünteti fel összehasonlítva a kontroll csoport eredményével és feltünteti a tumor lokalizációját is.

A fej-nyak tumoros betegek átlag plasma fibronectin szintjei ($225,11 \pm 73$ SD) a kontrollhoz képest ($316,82 \pm 65$ SD) csökkentek voltak, de az eltérés nem volt szignifikáns.

I. táblázat

Fej-nyak tumoros betegek plasma fibronectin szintje

Lokalizáció	n	Átlag életkor	Plasma FN szint ($\mu\text{g/ml}$) $\bar{x} \pm \text{SD}$	Control ($\mu\text{g/ml}$) $\bar{x} \pm \text{SD}$
Tu. laryngis	32			
Tu. epipharyngis	5			
Tu. hypopharyngis	2	56	$225,11 \pm 73$	$316,82 \pm 65$
Tu. tonsillae	3			
Tu. parot.	1			
Összesen	43			

II. táblázat

Metastaticus és metastasissal nem rendelkező fej-nyak tumoros betegek plasma fibronectin szintje ($\mu\text{g/ml}$)

	n	\bar{x}	SD
Metastatikus	15	226,65	104
Metastasis nélkül	28	232,32	104

A különböző lokalizációjú és szövettani típusú tumoroknál nem találtunk lényeges eltérést a plasma fibronectin szintekben így ezeket az eredményeket a táblázatban nem tüntettük fel. A nőbetegek plasma fibronectin szintje átlag $237 \mu\text{g/ml} \pm 99$ SD volt. A férfibetegek plasma fibronectin szintje átlag $228 \mu\text{g/ml} \pm 67$ SD volt. A második táblázatban a metastasissal rendelkező és a metastasissal nem rendelkező betegek plasma fibronectin szintjeinek átlag eredményeit tüntettük fel. A metastatikus esetekben a plasma fibronectin átlag $226,62 \mu\text{g/ml} \pm 104$ DS volt. A metastasissal nem rendelkező beteg átlag plasma fibronectin szintje $232,32 \mu\text{g/ml} \pm 104$ SD volt. Mint az eredményekből is kitűnik, az értékek nagyfokú szórását mutatnak és a két csoport eredményei között lényeges eltérést nem lehetett kimutatni.

Megbeszélés

A plasma fibronectint a májsejtek, a sejtek felszínéhez kötött fibronectint elsősorban a fibroblastok termelik, de leírták a vascularis endothel sejtek és a mononuclearis sejtek fibronectin termelőképességét is [12, 13]. A fibronectin kezdeti vizsgálata kapcsolatos a tumorsejtek vizsgálatával. Általában ugyanis a tumorsejtek felszínéről hiányzik a fibronectin, ellentétben az egészséges sejtekkel. Többek között az a felismerés vezetett oda, hogy összefüggéseket keresnek tumoros folyamat, a metastasis képzés és a szervezet fibronectin termelőképessége között. Elméletileg a plasma fibronectin szint növekedése és csökkenése is magyarázható malignus betegségekben. A tumorsejtek elleni

védekező mechanizmus a MNS fibronectin csökkenésén keresztül csökkent plasma fibronectin szintet eredményezhet, másrészt a tumorsejtek a termelt fibronectint képtelenek megkötni és ez a folyamat a plasma fibronectin szint emelkedéséhez vezet. [17] A megjelent közlemények is nagy változatosságot mutatnak. *Mosher és Williams* [7] emelkedett fibronectin szinteket talált metastaticus emlőrákos betegekben. *Blumenstock* [1] szintén emelkedett fibronectin szintekről számolt be tüdő tumoros betegek esetében. *Bruhn és Heimbürger* [2] csökkent plasma fibronectin szinteket talált chronicus lymphoid leukémiás betegekben és más malignus betegségekből. *Todd és mtsai* [14] szintén emelkedett értékeket kaptak mell, tüdő, petefészkek és here tumorok esetében. *Choate és mtsai* [3] normál vagy emelkedett fibronectin értékeket kaptak emlő, vastagbél tumoros betegekben és akut leukémiában.

Ezeket az ellentmondó adatokat magyarázhatja, hogy a módszer nem tumor specifikus. Emelkedett fibronectin szinteket találtak pl. akut hepatitisben, májchirózisban, reumás betegségekből, autoimmun betegségekből és dermatológiai betegségekből, ugyanakkor számos betegség ill. állapot (láz, égés, sokk, sepsis) csökkent plasma fibronectin szintekkel jár [4, 5, 10].

Bár jelen vizsgálatokban nem találtunk értékelhető különbséget sem a beteg és kontroll csoport, sem a tumor stadium és a plasma fibronectin szintjei között, mégis ismertetésre érdemesnek tartjuk, hiszen a hazai fül-orr-gége szakirodalomban ebben a témakörben közleményt nem találtunk.

IRODALOM: 1. *Blumenstock, F. A., McKneally, M., Saba, T. M.*: Quantification of immunoreactive opsonic alpha-2 surface binding (2SB) glycoprotein in lung cancer patients (Abstr.) *J. Reticuloendothel. Soc. Abstr.-Suppl.* 24, 18a (1978). — 2. *Bruhn, M. D., Heimbürger, N.*: Factor-VIII related antigen and cold-insoluble globulin in leukemias and carcinomas *Haemostasis* 5, 189—192 (1976). — 3. *Choate, J. J., and Mosher D. F.*: Fibronectin concentration in Plasma of Patients with Breast Cancer, Colon Cancer and Acute Leukemia *Cancer* 51, 1142—1147 (1983). — 4. *Clemensen, I., Andersen, R. B.*: Different molecular forms of fibronectin in rheumatoid synovial fluid. *Arthritis Reum.* 25, 25—31 (1982). — 5. *Cseh, K. és mtsai*: A plasma fibronectin szint diagnosztikus értékeiről. *Orv. Hetil.* 10, 577—582 (1986). — 6. *Hynes, R. O.*: A fibronectinek. *Tudomány* 8, 22—31 (1986). — 7. *Mosher, D. F., and Williams, K. E. H.*: Fibronectin concentration is decreased in plasma of several ill patients with disseminated intravascular coagulation *J. of Laboratory and Clinical Medicine* 91, 729—735 (1978). — 8. *Nagata, H., Ueki, H., Moriguchi, T.*: Fibronectin *Arch. Dermatol.* 121, 995—999 (1985). — 9. *Nelson, D. L., Little, C. D. and Balian, G.*: Distribution of Fibronectin and Laminin in Basal cell Epitheliomas *J. of Investigative Dermatology* 80, 446—452 (1983). — 10. *Parenti, D., Carsons, S. E., Lavietis, B. B., Diamond, H. S., Steimann, C. R.*: Fibronectin, a DNA binding protein is elevated in systemic lupus erythematosus (abstr. 234) *Arthritis Rheum.* 25, (suppl.) S 41 (1982). — 11. *Parsons, R. G., Todd, H. D., Kowal, R.*: Isolation and identification of human serum fibronectin like protein elevated during malignant disease *Cancer Res.* 39, 4341—4345 (1979). — 12. *Roussakki, E.*: Fibronectin *J. of Oral Pathology* 10, 3—13 (1981). — 13. *Smith, H. S., Riggs, J. L., Mosesson, M. W.*: Production of fibronectin by human epithelial cells in culture *Cancer Res.* 39, 4138—4144 (1979). — 14. *Todd, H. D., Coffee, M. S., Waalles, T. P., Abeloff, M. D., Parsons, R. G.*: Serum levels of fibronectin and a fibronectin like DNA binding protein in patients with various diseases *J. Natl. Cancer Inst.* 65, 901—904 (1970). — 15. *Tynelius-Bratthall, G., Erlson, D., Araujo, H. M.*: Fibronectin in saliva and gingival crevices. *J. of Periodontal Res.* 21, 563—568 (1986). — 16. *Webb, K. S., Lim, G. H.*: Urinary fibronectin: Potential as a biomarker in prostatic cancer *Investigative Urology* 17, 401—404 (1980). — 17. *Zerlauth, G., Wolf, G.*: Plasma fibronectin as a marker for cancer and other Diseases. *The American J. of Medicine* 77, 685—689 (1984).

Jókay, I., Lampé, I., Debreceni, M., Nagy, T., Szűcs, J.: *Study of the plasma fibronectin level in patients with head-neck tumors*

The plasma fibronectin level was studied in 43 patients with head-neck tumors. The authors wished to highlight the question whether there existed a connection between the plasma fibronectin level of patients with tumors and the spread, localization, histological type of the tumorous process and metastatizing capacity of the tumor. On the basis of the results the method was not found suitable for monitoring the tumorous process. The characteristic features of fibronectins and wide range of their biological functions are described as well.

I. Jókay, I. Lampé, M. Debreceni, T. Nagy, J. Szűcs: *Die Untersuchung des Plasma-Fibronectin-Spiegels bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren*

Mit der Untersuchung von 43 Tumorpatienten sollte ein Zusammenhang zwischen dem Plasma-Fibronectin-Spiegel und der Ausdehnung, Lokalisation, Histologie und Metastasierung der Tumoren aufgedeckt werden. Aufgrund ihrer Ergebnisse halten die Verff. das Verfahren für nicht geeignet zur Monitorisierung des tumorösen Geschehens. In ihrer Publikation gehen die Verff. auch auf die charakteristischen Eigenschaften des Fibronectins und seine breite biologische Funktion ein.

И. Йокан, И. Лампе, М. Дебрецени, Т. Надь, Я. Сюч: *Исследования уровня фибронектина в плазме у больных с опухолями шеи и головы*

Авторы сообщают результаты определения уровня фибронектина в плазме крови у 43 больных с опухолью шейноголовной области. Они хотели получить данные относительно наличия связи между уровнем плазменного фибронектина у опухолевых больных и распространенностью, локализацией, гистологическим типом опухоли и ее способностью к метастазированию. Как показали результаты исследований, данный метод не является подходящим для мониторинга опухолевого процесса. В статье обсуждаются характерные свойства и широкие биологические функции фибронектинов.