

*Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar Fül-orr-gégészeti és Fej-nyaksebészeti Klinika
(igazgató: Répássy Gábor dr. egyetemi tanár)
**Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Orvostudományi Kar Fül-orr-gégeklinika
(igazgató: Sziklai István dr. egyetemi tanár)
***Országos Onkológiai Intézet Tumor Progressziós Osztály (főorvos: Tímár József dr. egyetemi tanár)
****Jahn Ferenc Dél-pesti Kórház Fül-orr-gégészeti Osztálya (főorvos: Tamás László dr.)

Mátrixbontó MMP-2 kollagenáz expressziója gége- és hypopharynx tumorokban

Répássy Gábor dr.*, Tamás László dr.****, Forster-Horváth Csaba dr.***,
Juhász Attila dr.**, Tímár József dr.***

ÖSSZEFOGLALÁS

A mátrix metalloproteinázok közül (MMP) az MMP-2 kollagenáz expresszióját vizsgálták 7 gége és 5 hypopharynx tumorból származó szövetmintában. Az MMP-9 kollagént bontó enzim normális sejtekben is expresszálódik. Az MMP-2 expresszió az invazív tumorsejtekre jellemző. Anyagukban az MMP-2 pozitívitas a tumorok stádiumának megfelelően emelkedett. A gégerákok és hypopharynx tumorok csoportját összehasonlítva, az MMP-2 expresszió a hypopharynx tumorokra volt jellemző. Kapcsolatot tételeznek fel a hypopharynx tumorok sajátos MMP-2 fenotípusa és fokozott invazivitása között.

KULCSSZAVAK: gége-hypopharynx tumor, immunhisztokémia, MMP-2

SUMMARY

Among the matrix metalloproteases, MMP-9 is usually expressed by normal cells while MMP-2 is more frequent in transformed ones. Protein expression of MMP-2 was analysed in paraffin embedded archival samples of seven glottic and five hypopharyngeal cancers using immunohistochemistry. Expression of MMP-2 is characteristic of hypopharyngeal cancer and, from the limited clinical material at our disposal it is suggested that the increased aggressiveness of hypopharyngeal cancer compared to the glottic one could be associated with this MMP phenotype.

KEYWORDS: immunohistochemistry, laryngeal and hypopharyngeal cancer, MMP-2

Bevezetés

A daganatos invázió meglehetősen bonyolult soklépcsős folyamat és számos tényezőtől függ (16). Ennek a folyamatnak egyik igen fontos része a tumorsejt – mátrix kölcsönhatás és az ennek eredményeként bekövetkező mátrix lebomlás (4, 14). A mátrixdegradáció egyik oka, hogy a tumorsejt felszínén olyan enzimek jelennek meg, amelyek normálisan csak a lizoszómában fordulnak elő. Másrészt az invazív tumorokban a mátrixbontó enzimek expressziója fokozódhat, vagy az enzimek specifikus gátló molekulájának expressziója lecsökken, aminek eredőjeként az egyensúly a mátrixbontás irányába tolódik el (4, 14). Az emésztő enzimeket három csoportba soroljuk, a mátrix metalloproteinázok (MMP), katepsinek és

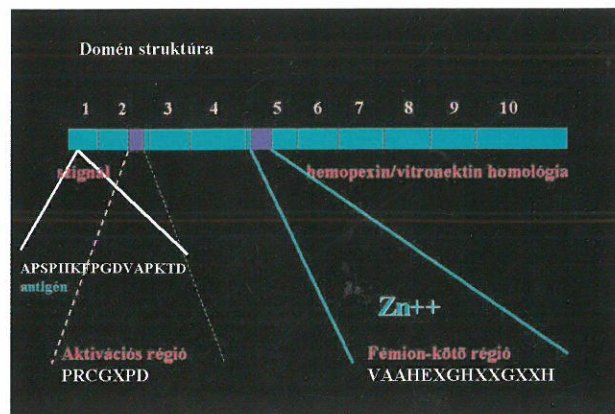
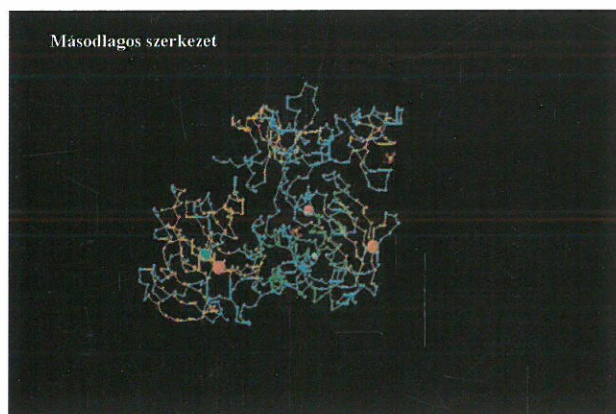
a plazminogén aktivátorok családjába. A daganatos invázió során a tumorsejtek áttörnek a basalis membránt, melynek specifikus alkotórésze a IV-es típusú kollagén. A mátrix metalloproteinázok számos fajtája bontja a IV-es típusú kollagént, ezért ezen enzimek expressziójának fontos szerepe van a daganatos invázióban. Az MMP-9 kollagént bontó enzim normális sejtekben is gyakran expresszálódik. Ennek az enzimnek egy másik változata az MMP-2 kollagenáz, amely 20 kD-tal kisebb az MMP-9-nél. Az invazív tumorsejtekben az MMP-2 kollagenáz gyakran expresszálódik és a tumor környezetében lévő ún. daganatos stromában is indukálódik (4, 14). Az MMP-k és az MMP-2 enzim is a Zn-aktivált enzimek családjába tartozik. Sejten belüli termelődése során egy proenzim készül első lépésben, melynek módosulása révén (a szignálpeptid elvesztésével) jön létre a végleges szekretált enzim (1. ábra). Az enzim tényleges működéséhez aktiválnia kell, amit más enzimek, közöttük egy sejtmembránhoz kötött MMP forma (MT-MMP-1) is elvégezhet. Vizsgálataink kezdetekor a kereskedelmi forgalomban még nem állt rendelkezésre

Közlésre érkezett: 2000. 11. 19.

Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar Fül-orr-gégészeti és Fej-nyaksebészeti Klinika
Cím: 1083 Budapest, Szigony u. 36.

Telefon: 333-3316

E-mail: repassy@fulo.sote.hu



1. ábra. Az MMP-2 metalloproteáz másodlagos szerkezete és domén-struktúrája

specifikus, paraffinba ágyazott mintán is alkalmazható antitest az MMP-2 ellen, melyet magunk állítottunk elő (15). Gégerákban az MMP-2 expressziójára vonatkozó adatok még nem ismeretesek, ezért indokoltnak láttuk, hogy ezeket a vizsgálatokat elvégezzük.

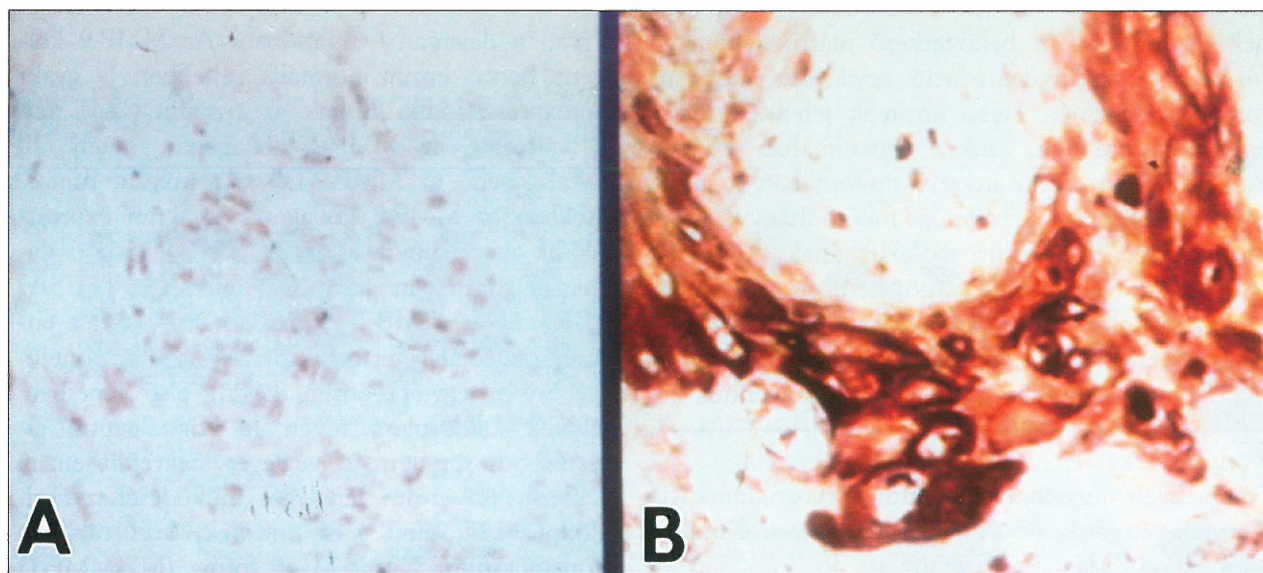
Munkánk másik célja az volt, hogy összehasonlítsuk az MMP-2-expresszió mértékét gége- és hypopharynx tumorokban, és választ kaphassunk arra a kérdésre, hogy a mátrixdegradációs folyamatokban van-e különbség a klinikailag is oly sok szempontból eltérően viselkedő két tumortípus között.

Anyag és módszer

12 beteg 15 biopsziás mintáját vizsgáltuk, mely megegyezik előző közleményeink anyagával (10,

11). A szövetmintát 5 hypopharynx tumorból és 7 gégerákból vettük. A szövetminták 5 recessus piriformis, 2 supraglotticus és 5 glotticus kiindulási tumorból származtak.

Az anyagok fixált és paraffinba ágyazott blokkjaiból Superfrost tárgylemezre metszeteket készítettünk. A metszeteket deparaffináltuk, majd az antigenicitás felerősítésére az általunk már korábban leírt mikrohullámos antigénfeltárást végeztük el (5). Az immunreakció elvégzése előtt az endogén peroxidáz-aktivitást H_2O_2 előinkubálással elimináltuk. A nonspecifikus antitest-kötőhelyeket 3% BSA/PBS oldattal történő előinkubálással blokkoltuk. Az MMP-2 metalloproteinázt az enzimspecifikus peptidszekvencia ellen nyúlban termelt 1:50-re hígított poliklonális savóval jelöltük (Research Genetics, 15). Az elsődleges savóval történő inkubálás 60 percig történt 38 °C-on.



2. ábra. MMP-2 kimutatása gégerákban immunhisztokémia segítségével. A) MMP-2 negatív gégerák fénymikroszkópos képe. B) MMP-2 detektálása hypopharynx carcinomában (vörös színreakció)

Többszörös pufferes mosás után a lekötött IgG-t biotinnal jelölt kecskében termelt antinyúl savóval (1:200 hígítás), majd Streptavidin peroxidáz konjugátummal (1:100 hígítás) jelöltük. A peroxidáz enzimet AEC/H₂O₂ szubsztráttal tettük láthatóvá. A sejtmagokat vagy hematoxilinnel vagy metilzölddel festettük. Kontrollként az ép, nem tumoros gége-, illetve garat-nyálkahártya szolgált.

Eredmények

12 tumorból származó 15 mintát vizsgáltunk. Immunhisztokémiailag az MMP-2 enzimet nem lehetett kimutatni a normális gége-, illetve garati nyálkahártyában. A szövetminták mindegyikét átvizsgálva azt lehetett észlelni, hogy az MMP-2 enzim protein ritkán jelent meg a tumorokban (2. a. ábra). Kimutathatósága esetén a daganatos fészkek részben elszarusodó hámsejtjeinek citoplazmájában volt reakció (2. b. ábra). MMP-2-pozitivitást észleltünk továbbá histiocytákban és stromális fibroblastokban is az irodalmi adatoknak megfelelően. A vizsgált 15 tumormintából csak elvétve fordult elő tumor MMP-2-pozitív daganatsejtekkel a T2 és T3 stádiumú daganatok között, míg a T4 esetek döntő többsége MMP-2 pozitív-nak bizonyult 4/6 (1. táblázat). Átvizsgálva a tumorokat megállapíthattuk, hogy a 6 MMP-2 pozitív tumor egy kivételével recessus piriformis kiindulású tumorból származott (2. táblázat).

Megbeszélés

A rosszindulatú tumorok jellemzésére napjainkig számos markert vizsgáltak. Több markerről tudjuk, hogy a gégerák invazivitásával kapcsola-

tosak, más részük a malignus transzformációért felelős (7, 18). Gégerákban a tumoros progresszió összefüggött a proliferációs markerek expressziójával (Ki-67, MIB-1, PCNA) (9, 12, 13, 17). Az onkogének és az onko-szupresszorgének közül az EGF receptor expresszió-szintje mutatott összefüggést a gégerák invazivitásával. Ugyanakkor azt is láthatjuk, hogy egy daganat invazív fenotípusát nem lehet csak proliferatív markerekkel jellemezni. A gégerák, hypopharynx-rák és általában a fej-nyaki daganatok esetében csak igen kevés adat áll rendelkezésre a tumorok invazív sajátosságairól. A klasszikus metasztázisgének eltérően expresszálódnak magában a kiindulási hámban és az ebből kiinduló carcinomában. Már korábban kimutatták, hogy fej-nyaki tumorokban a CD44v6 variáns expressziója csökken, míg az NM23-expresszió megjelenik a daganatos invazivitás során (13). Korábban közölt saját adataink is megegyeznek ezekkel a megfigyelésekkel, azzal a kiegészítéssel, hogy különbséget mutattunk ki a metasztázisgének expressziójára vonatkozóan gége- és hypopharynx tumorokban (10, 11). Ez az eltérés önmagában azonban nem elegendő egy tumor invazív fenotípusának jellemzéséhez. Pontosabb ismeretekre van szükség, mely a mátrixbontó képességre, illetve migrációs sajátosságokra utal.

Fej-nyaki daganatokban korábban már megfigyelték, hogy az MMP-9 (2) és az MT-MMP-1 (az MMP-2 membrán aktivátora) (1), valamint bizonyos katepszinek (B.L, D) expressziója összefügg a daganatos progresszióval (3, 12). Vizsgálataink eredményeiből megállapíthatjuk, hogy az invazív fenotípus megjelenése hypopharynx tumorokban az MMP-2 kollagenáz expressziójával hoz-

1. táblázat

MMP-2 expresszió gége- és hypopharynx tumorokban a stádium függvényében

Stádium	MMP-2+ tumor gyakorisága (n = 15)
Normális hám	negatív
T2	1/4
T3	1/5
T4	4/6

Pozitivitás kritériuma: a tumorsejtek >20%-a ad pozitív reakciót.

2. táblázat

MMP-2 expresszió a normális hámban és a tumorokban a lokalizáció függvényében

Tumor kiindulása	MMP-2+ tumor gyakorisága (n = 15)
Normális hám	negatív
Larynx	1/9
Hypopharynx	5/6

Pozitivitás kritériuma: a tumorsejtek >20%-a ad pozitív reakciót.

ható összefüggésbe. A daganatkutatásban valószínűleg még igen sok marker, onkogén, onkoszuppresszor gén vizsgálatára lesz szükség a jövőben ahhoz, hogy a tumor proliferációs sajátosságait és invazivitását pontosabban megismerjük. A hypopharynx tumorokban az MMP-2 kollagenáz gyakori megjelenésére azonban felhívjuk a figyelmet. Úgy gondoljuk, hogy ezeknek az eredményeknek a fejnyaki daganatok esetében alkalmazandó terápiás stratégiában még jelentősége lehet. Számos munkacsoport tervezett sikerrel MMP inhibitorokat és ezek közül több is már a klinikai kipróbálás fázisában van (16). Különös hangsúlyt ad ennek a ténynek az is, hogy a tumor-indukált angiogenezis egyik nélkülözhetetlen lépése a kapilláris fal endotélsejt-eredetű MMP általi bontása (2), így elméletileg egy MMP inhibitornak kettős támadáspontja van: a tumorsejt-invázió és a tumor-indukált angiogenezis. Nem véletlen, hogy nagy reményeket fűznek a gyógyszerfejlesztők az ilyen típusú szerek onkológiába történő bevezetéséhez. A hypopharynx tumorok sajátos MMP-2 fenotípusa és fokozott invazivitása között kapcsolat lehet, ami esetleg specifikus antimetasztikus terápiás célpontot nyújthat.

(A dolgozat a 6101/1/2000 ETT támogatásával jött létre.)

Irodalom

- Du B., Wang P., Guo X., Du B.: Expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase in laryngeal carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* 5, 214–217, 1999.
- Heissenberg M. C., Gorogh T., Lippert B. M., Werner J. A.: Metalloproteinases and their inhibitors in squamous cell carcinoma of the hypopharynx: indicators of individual tumor aggressiveness. *Otolaryngol. Pol.* 52, 521–526, 1998.
- Gandour-Edwards R., Trock B., Donald P. J.: Predictive value of cathepsin D for cervical lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 21, 718–722, 1999.
- Khokha R., Denhardt D. T.: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases: a review of their role in tumorigenesis and tissue invasion. *Invasion Metast.* 9, 391–405, 1989.
- Kovács L., Szende B., Elek G. et al.: Working experience with a new vacuum-accelerated microwave histoprocessor. *J. Pathol.* 180, 106–110, 1996.
- Liotta L. A., Steeg P. S., Stetler-Stevenson W. G.: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64, 327–336, 1991.
- Lydiatt W. M., Schantz S. P.: Biological staging of neck cancer and its role in developing effective treatment strategies. *Cancer Metast. Rev.* 15, 11–25, 1996.
- Papadimitrakopoulou V. A., Shin D. M., Hong W. K.: Molecular and cellular biomarkers for field cancerization and multistep process in head and neck tumorigenesis. *Cancer Metast. Rev.* 15, 53–76, 1996.
- Piffkó J., Bánkfalvy Á., Öfner D. et al.: Proliferative (MIB1, mdm2) versus anti-proliferative (p53) markers in head and neck cancer. An immunohistochemical study. *Pathol. Oncol. Res.* 2, 37–42, 1996.
- Répássy G., Tamás L., Forster-Horváth Cs., Juhász A., Tímár J.: Heparán szulfát transzmembrán proteoglikán expresszió gége és hypopharynx tumorban. *Fül-orr-gégegyógy.* 47, 1, 6–10, 2001.
- Répássy G., Tamás L., Forster-Horváth Cs., Juhász A., Tímár J.: A metasztatikus fenotípus jellemzése gége- és hypopharynx tumorokban az NDP kináz A/NM-23H1/NME1 expresszió alapján. *Fül-orr-gégegyógy.* 47, 2, 4–7, 2001.
- Russo A., Bazan V., Gebbia N. et al.: Flow cytometric DNA analysis and lysosomal cathepsin B and L in locally advanced laryngeal cancer. Relationship with clinicopathologic parameters and prognostic significance. *Cancer* 76, 1757–1764, 1995.
- Spafford M. F., Koeppe J., Pan Z. et al.: Correlation of tumor markers p53, bcl2, CD34, CD44H, CD44v6 and ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 122, 627–632, 1996.
- Starkey J. R.: Cell-matrix interactions during tumor invasion. *Cancer Metast. Rev.* 9, 113–123, 1990.
- Tímár J., Tóvári J., Pogány G. et al.: The antimetabolite Tiazofurin (TR) inhibits glycoconjugate biosynthesis and invasiveness of tumor cells. *Eur. J. Cancer* 32A, 152–159, 1996.
- Tímár J.: A tumorprogresszió problémája: kétségek vagy remények az új évezred küszöbén? *Orvosi Hetilap* 141, 891–900, 2000.
- Welkobsky H. J., Hinni M., Dienes H. P., Mann W. J.: Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading and proliferation markers. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 104, 503–510, 1995.

ZUSAMMENFASSUNG

Unter den Matrix-Metallproteinasen untersuchten die Verff. Gewebeproben aus 7 Kehlkopf- und 5 Hypopharynx-tumoren. Das kollagenspaltende Enzym MMP-9 wird auch in normalen Zellen exprimiert. Die MMP-2-Expression ist charakteristisch für die invasiven Tumorzellen. Im Untersuchungsmaterial erhöht sich die MMP-2-Positivität mit dem Stadium des Tumors. Im Vergleich der Kehlkopfkrebsgruppe mit der Gruppe der Hypopharynx-tumoren war die MMP-2-Expression das Charakteristikum für die Hypopharynx-tumoren. Verff. vermuten einen Zusammenhang zwischen dem den Hypopharynx-tumoren eigenen MMP-2-Phenotyp und ihrer erhöhten Invasivität.

SCHLÜSSELWÖRTER: Immunhistochemie, Kehlkopf-Hypopharynx-tumor, MMP-2