

*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.)

A metasztatikus fenotípus jellemzése gége- és hypopharynx tumorokban az NDP kináz A/NM-23H1/NME1 expresszió alapján

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

ÖSSZEFOGLALÁS

Szerzők az általánosan metasztázis szuppresszor génnek tartott NM23 (NDP kináz A, NME1) expressziójának vizsgálatát végezték el 7 gége- és 5 hypopharynx tumorból származó szövetmintán immunhisztokémiai módszerrel. Az NME1 a normális hámban nincs jelen. A daganatok stádiumának előrehaladtával az NM23 gén expresszió megjelenését, illetve fokozódását észlelték. Gége- és hypopharynx rákok összehasonlításakor hypopharynx tumorokban fokozott NM23 expressziót találtak. Eredményeik alapján megállapították, hogy az NM23 gén szerepe éppen ellenkező gége- és hypopharynx tumorban, mint egyéb tumorokban, mert expressziója a malignusabb és invazívabb hypopharynx tumorokban jelenik meg gyakrabban. Az NM23 metasztázis szuppresszor gén helyett a metasztázis asszociált gén elnevezés használatát javasolták a tumorkutatásban.

KULCSSZAVAK: gége- és hypopharynx tumor, immunhisztokémia, metasztázis

SUMMARY

The expression of the metastasis suppressor gene, NM23, was studied at protein level in archival paraffin samples of seven glottic and five hypopharyngeal cancers using immunohistochemistry. The covering epithelia is negative for NM23 in this region. The expression of NM23 is increased at the higher tumour stage. Furthermore, a higher expression was detected in the more aggressive hypopharyngeal cancer than in the less aggressive glottic one. Based on these data, supported in addition by some previous observations, it can be stated that the role of the metastasis suppressor gene, NM23, is the opposite in this tumor type to most of the other histological types. Accordingly, it would be better to refer to the NM23 gene as „metastasis-associated” than as a „metastasis suppressor”.

KEYWORDS: metastasis, laryngeal and hypopharyngeal cancer, immunohistochemistry

Bevezetés

Általában elmondható, hogy malignus tumorokban a betegek sorsa nagy részben a metasztatizálás ütemétől függ. Gége- és hypopharynx tumoros betegek sebészi, irradiációs és citosztatikus terápiájának eredményét is több tumorbiológiai szempont befolyásolja, amelyek közül talán legfontosabb a metasztatizálás kérdése (14). Ha valamilyen terápiával befolyásolni lehetne a

metasztázis kialakulásáért felelős megbomlott regulációs folyamatokat, és így az áttét képződését lényegesen csökkenthetnénk vagy megszüntethetnénk. Ez igen megkönnyítené a gégesebész gyógyító tevékenységét.

Mindez ma még a fül-orr-gégeorvosnak csak utópisztikus vágya. A tumor kutatásban az elmúlt években a metasztatizálásért felelős gének vizsgálata intenzív tanulmányok tárgya lett (2, 7, 12). Ilyen vizsgálat gége- és hypopharynx tumorok esetén is indokolt, hiszen a két, szövettanilag azonos típusú daganat prognózisa igen eltérő, mert a hypopharynx tumorai sokkal invazívabbak (5, 8).

Az elsőként felfedezett metasztázis szuppresszor gén az NM23 volt, amelyről később kiderült, hogy ez a nukleozid diszfoszfokináz-A enzim

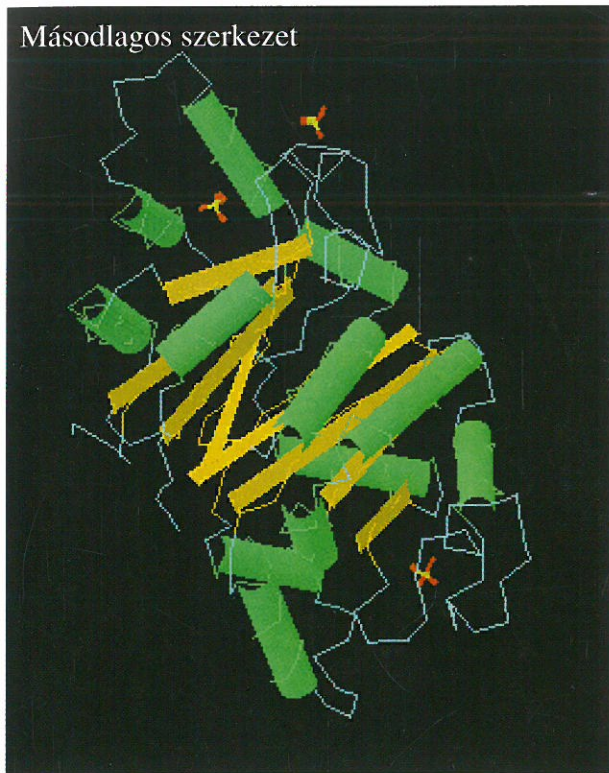
Közlésre érkezett: 2000. 11. 18.

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

Telefon: 333-3316 Fax: 333-3316

E-mail: repassy@fulo.sote.hu

Másodlagos szerkezet



1. ábra. Az NDP-kináz A/NM23-H1/NME1 másodlagos szerkezete és aminosavsorrendje:

1 mancrtfia ikpdgvqrql vgeiikrfeq kgfrlvglkf
mqasedllke hyvdldkrpf
61 faglvkymhs gpvvamvweg luvvktgrvm lgetnpadsk
pgtirgdfci qvgrniihgs
121 dsvesaekei glwfhpeelv dytscaqnwi ye

(NDP-A) (1. ábra), amelyet ma NME1-ként idéznek az irodalomban (4), és a 17. kromoszóma hosszú karján helyezkedik el, amely egy 17 kD tömegű fehérjét kódol (13). Az NDP kináz a kis GTP-kötő proteinek családjába tartozik, és jelátviteli szereppel is rendelkezik. A gén expressziójának csökkenését számos kísérleti és több emberi daganatban is kapcsolatba lehetett hozni az áttétképző képesség megjelenésével (4, 14). Ugyanakkor vannak olyan daganatok, amelyekben az NM23 expresszió nem változik (15). Közleményünkben az NM23 expressziót gége- és hypopharynx tumorok esetén immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk.

Anyag és módszer

Beteganyag:

5 recessus piriformis, 2 supraglotticus és 5 glotticus kiindulású tumorból származó szövetmintán végeztük a vizsgálatokat. A biopsziás anyag és a betegek megegyeztek előző közleményünk anyagával, ahol a CD44v3 expresszióját vizsgáltuk (9).

Immunhisztokémia:

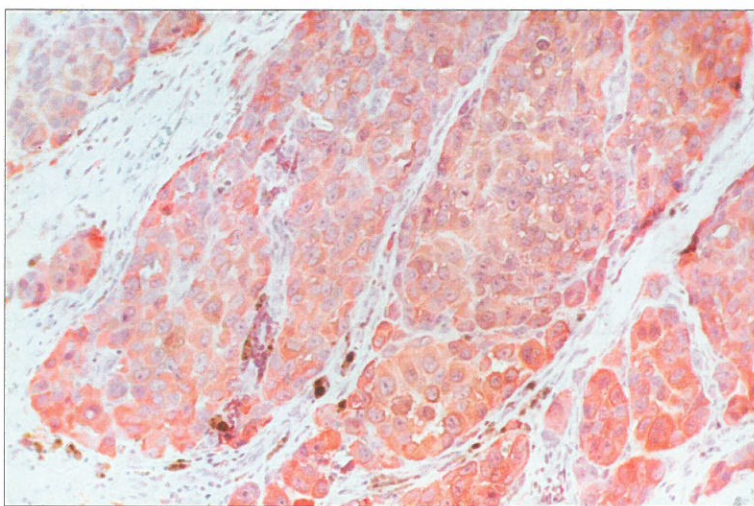
A tumorokból származó anyagok fixált és paraffinba ágyazott blokkjaiból superfrost tárgylemezre metszeteket készítettünk. Deparaffinálás után az antigenitás felerősítésére mikrohullámos antigen feltárást végeztünk (3). Az immunreakció elvégzése előtt az endogén preoxidáz aktivitást H_2O_2 előinkubálással elimináltuk. A nonspecifikus antitest kötő helyeket 3%-os BSA/PBS oldattal történő előinkubálással blokkoltuk. Az NM23-H1 proteint egérben termelt 1:100-ra hígított monoklonális antitestekkel (Novocastra) jeleltük. A lekötődött antitesteket biotinált anti-egeér savóval és Streptavidin-jelölt peroxidázzal mutattuk ki. Az enzimet AEC szubsztráttal történő inkubálás révén tettük láthatóvá (vörös-barna reakció). Az inkubálás 60 percig történt 37 °C-on. A mintákban meghatároztuk a pozitívítást mutató tumorsejtek százalékos arányát metszetenként 3–3 látótérben, minimálisan 100–100 daganatsejtet megvizsgálva.

Eredmények

Normális, nem tumoros gégegyálkahártya hámban az NM23 fehérjét immunhisztokémiai módszerrel nem lehetett kimutatni. Az NM23 expresszió szempontjából a daganatok heterogének, pozitív és negatív csoportra oszthatók (2a., 2b. ábra). A tumorszövet mentén észlelhető reaktív lymphocyták mintegy belső kontrollként, NM23 pozitivitást mutattak.

A pozitív tumorok között alacsony és magas expresszióval jellemezhetők fordulnak elő, ahol a határt 50%-os pozitivitás jelentette. Az NM23 a tumorsejtek citoplazmájában volt jelen, és 15 tumorminta közül 8 esetben lehetett kimutatni. Megfigyeltük, hogy az NM23 pozitív tumorsejtek gyakoribbá váltak a T3-as és T4-es stádiumokban, amikor is az expresszió szintje is jelentősen emelkedett (1. táblázat). Ugyanakkor nem lehetett összefüggést kimutatni a nyirokcsomó-status és az NM23 fenotípus között.

Továbbiakban a vizsgált anyagot két csoportra: hypopharynx tumorokra és gégerákok csoportjára osztva azt találtuk, hogy a gégerákokban igen alacsony az NM23 pozitív tumorok gyakorisága (2. táblázat). Ezzel szemben a hypopharynx tumorok között jelentősen megemelkedett és csaknem teljessé vált az NM23 pozitivitás, és az expresszió szintje is szignifikánsan magasabb volt a gégerákokhoz képest (2. táblázat).



2. ábra. NM23 kimutatása gégerákokban immunhisztokémiai módszerrel.
a. (fent) NM23 negatív gégerák,
b. (alul) NM23 pozitív hypopharynx tumor. A tumorsejtek citoplazmájában intenzív vörös színreakció

Megbeszélés

Számos markert vizsgáltak korábban a gégerák invazív fenotípusával kapcsolatban, amelyek egy része a malignus transzformációval (1, 10), más részük a tumorok invazivitásával állott kapcsolatban (10, 11). Gégerákban a tumorprogresszió a proliferációs markerek expressziójával mutatott összefüggést. A különböző onkogének és onkoszuppresszor-gének közül az EGF receptor expresszió szintje mutatott összefüggést a gégerák progressziójával (6). Mindazonáltal az invazív fenotípust nem lehet csak proliferatív markerekkel jellemezni. Fej-nyaki daganatok esetében ezen rákok invazív sajátosságairól kevés adat áll rendelkezésre. Ennek egyik oka az, hogy a klasszikus metasztatizáló-gének eltérően expresszálódnak magában a kiindulási hámban és azután az ebből kiinduló carcinomákban. Klasszikus metasztatizálást gátló génnek tartják az NM23-at. Ennek ellenére az NM23 expressziójával kapcsolatos irodalmi adatok részben ellentmondanak egymásnak. Emlőrákok vagy kután-melanomák vizsgálata során az NM23 expressziót magasnak észlelték a nem metasztatizáló, illetve a szervi áttétet adó primer tumorok esetében, ugyanakkor a nyirokcsomó áttétet adó tumorokban az NM23 expressziója szignifikánsan

1. táblázat

NM23 expresszió gégerákokban a stádium függvényében

stádium	NM23	
	incidencia	expressziós szint (%)
Normális hám		negatív
T2	1/4	12±12
T3	2/5	26,2±18,3
T4	5/6	38,5±10,1*

*p<0,05

Pozitivitás kritériuma: >25% tumorsejt. Az adatok a pozitív sejtek százalékaának átlagát ±S.D. jelölik.

2. táblázat

NM23 expresszió a lokalizáció függvényében

Tumor kiindulása	NM23	
	incidencia	expressziós szint (%)
larynx	3/9	11,7±6,3
hypopharynx	5/6	50,8±12,5*

*P = 0,009

Pozitivitás kritériuma: >25% tumorsejt. Az adatok a pozitív sejtek százalékaának átlagát ±S.D. jelölik.

alacsonyabb volt (4, 14). Saját anyagunkban az a körülmény, hogy gége- és hypopharynx tumorokból származó szövetmintákban megjelent az NM23 expresszió, ellentmond azon irodalmi adatoknak, hogy az NM23 általános metasztatizálás szuppresszor gén lenne. Különösen aláhúzza ezt a dilemmát az az észlelésünk, hogy statisztikailag szignifikánsan fokozódott az NM23 expresszió a hypopharynx tumorokból származó szövetmintákban. Ismert az a klinikai tapasztalat, hogy a recessus piriformisról kiinduló rák a metasztatizálás szempontjából is sokkal agresszívabb a gégerákokhoz viszonyítva. Vizsgálataink tehát azt mutatják, hogy az NM23 génnek a metasztatizálás patomechanizmusában betöltött szerepe az eltérő típusú tumorokban eltérő lehet (14, 15). Ennek oka valószínűleg az, hogy ennek (és számos más génnek is) eltérő fiziológiás szerepe lehet a különböző szövetekben. Miután a laphámban az NM23 expresszió nincs jelen, az csak a malignus transzformáció során bekövetkező szabályozási zavarok kapcsán jelenhet meg. Mindezen megfigyelések alapján megalapozottnak látjuk, és magunk is javasoljuk, hogy az NM23 metasztatizálás szuppresszor gént metasztatizálás asszociált génként idézzük az irodalomban. Másrészt vizsgálataink azt mutatják, hogy a gége- és hypopharyngealis rákok NM23 expresszió szempontjából is eltérő fenotípusúak, ami eltérő biológiai viselkedésüknek egyik alapja lehet.

Irodalom

- Csuka O., Remenár É., Koronczay K., Doleschall Z., Németh Gy.: Predictive value of p53, bcl2 and bax in the radiotherapy of head and neck cancer. *Pathol. Oncol. Res.* 3, 204–201, 1997.
- Kavanaugh D. Y., Carbone D. P.: Immunologic dysfunctions in cancer. *Haematol. Oncol. Clin. North Am.* 10, 927–951, 1996.
- 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.
- Maurizi M., Almadori G., Ferrandina G., Distefano M. et al.: Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 74, 1253–1257, 1996.
- Nicolson G. L.: Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. *Cancer Metast. Rev.* 12, 325–343, 1993.
- 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.
- Répássy G., Forster-Horváth Cs., Juhász A., Tímár J.: Heparán szulfát transzmembrán proteoglikán expresszió gége és hypopharynx tumorban. *Fül-orr-gégegyógy.* 47, 6–10, 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., Koeppel 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.
- Steeg P. S., Bevilacqua G., Kopper L. et al.: Evidence for a novel gene associated with low tumour metastatic potential. *J. Natl. Canc. Inst.* 80, 200–204, 1988.
- Tímár J.: A tumorprogresszió problémája: kétségek vagy remények az új évezred küszöbén? *Orv. Hetil.* 141, 891–900, 2000.
- Tímár J.: A metasztatizálás gének dialektikája. *LAM* 10, 16–18, 2000.
- Welkoborsky 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

Verff. untersuchten die Expression des allgemein als Metastasen-Suppressor-Gen geltenden NM23 (NPD-Kinase A, NME1) an Gewebeproben von 7 Kehlkopf- und 5 Hypopharynx-tumoren. NME1 ist im normalen Epithel nicht vorhanden. Mit fortschreitendem Tumorstadium konnte die Expression des NM23-Gens bzw. dessen Ansteigen beobachtet werden. Beim Vergleich der Kehlkopf- mit den Hypopharynx-tumoren fand man erhöhte NM23-Expression in Fällen von Hypopharynx-tumor. Aufgrund der Ergebnisse wird festgestellt, daß das Gen NM23 bei Kehlkopf- und Hypopharynx-tumoren eine umgekehrte Rolle spielt als bei anderen Tumoren, denn seine Expression tritt bei maligneren und invasiveren Hypopharynx-tumoren häufiger auf. Verff. schlagen deshalb vor, das NM23 nicht als Metastase-assoziiertes Gen zu bezeichnen.

SCHLÜSSELWÖRTER: Metastase, Kehlkopf- und Hypopharynx-tumor, Immunhistochemie