

Emberi daganatok csontmetasztázisai angiogén jellemzőinek vizsgálata, és modellezésük *in vivo*

Doktori értekezés

Dr. Lőrincz Tamás

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Szendrői Miklós, PhD, DSc, egyetemi tanár
Konzulens: Prof. Dr. Tímár József, PhD, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Dank Magdolna, PhD, egyetemi docens
Dr. Lövey József, PhD, főorvos

Szigorlati bizottság: Prof. Dr. Szende Béla, PhD, DSc, egyetemi tanár
Dr. Antal Imre, PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Tóvári József, PhD, tudományos
főmunkatárs

Budapest

2010

Bevezetés

A csontvázrendszer a tüdő és a máj után a szolid malignus tumorok harmadik leggyakoribb áttátképzési helye, és a karcinómák áttétei a csontváz-rendszer leggyakoribb rosszindulatú daganatai.

Munkánk kezdetekor számos kísérletes adat bizonyította, hogy a csontmátrix destrukciója mellett a neovaszkularizáció is a csontmetasztázisok kialakulásának a feltétele. Ennek ellenére csak szórványos adatok voltak találhatóak a szakirodalomban a humán csontmetasztázisok vaszkularizációjáról és a bennük zajló angiogenetikus folyamatokról. Az angiogenezis mérése bonyolult, minthogy egy dinamikus folyamatról van szó. A tanulmányok többsége az angiogenezis „produktumára”, az MVD-re (mikroérdenzitás) fókuszál, ami tulajdonképpen egy adott időpontban készült pillanatfelvételnél felel meg. Munkánk során mi is ezt a paramétert, illetve egy hatékony pro-angiogenetikus faktor, a VEGF (vascular endothelial growth factor) expresszióját vizsgáltuk humán karcinómák csontmetasztázisaiban.

Ezen kívül vizsgáltuk humán emlőrákok csontáttéteinek HER2/neu-expresszióját és génamplifikációját. A HER2/neu onkoproteinnek szerepe van a karcinogenezisben, negatív prognosztikai faktor, elsősorban zsigeri áttétekkel asszociált, és ezek a tumorok kevésbé érzékenyek a cyclophosphamid-, methothrexate- és 5-fluorouracil-tartalmú kemoterápiás kezelésekre, illetve rezisztensek a tamoxifenre. A HER2/neu-overexpresszió szorosan asszociált a fokozott angiogenezissel, és terápiás célpont is.

Célkitűzések

1. A mikroérdenzitás vizsgálata humán vese-, tüdő- és emlőrákok csontmetasztázisaiban és összevetése az ugyanabból a betegből származó primer tumorok érdenzitásával
2. A VEGF-expresszió és a mikroérdenzitás összefüggésének vizsgálata humán emlőrákok csontáttéteiben
3. A humán emlőrákok csontmetasztázisaiban bekövetkező érdenzitás-változás lehetséges okainak

vizsgálata a rendelkezésre álló klinikai adatok fényében

4. HER2/neu-fehérjeexpresszió és -génamplifikáció vizsgálata humán emlőrákok csontmetasztázisaiban, és összehasonlításuk a primer tumorok fehérjeexpressziójával és genotípusával
5. Állatkísérletes modell kidolgozása humán sejtvonalak csontkolonizációs képességének vizsgálatára.

Anyag és módszer

Vizsgálatainkhoz 10 tüdő-, 11 vese- és 48 emlőrákos beteg – összesen 69 eset – csontmetasztázisainak formalinban fixált, dekalcinált, paraffinba ágyazott mintáit használtuk fel. Az összes vese- és tüdőrákos beteg, illetve 23 emlőrákos beteg esetében sikerült a primer tumorból is mintát szereznünk, így lehetőségünk nyílt a primer tumorok és csontáttétek individuális összehasonlítására.

Az MVD meghatározását a CD34-pozitív erek immunhisztokémiával történt jelölése után végeztük el a „hot spot” módszer alapján mind a primer tumorokban, mind azok csontáttéteiben. A VEGF expresszióját is

immunhisztokémiával vizsgáltuk primer emlőrákokban és csontáttéteikben.

Munkánk során meghatároztuk 48 emlőrákos beteg csontmetasztázisának HER2/neu-fehérjeexpresszióját immunhisztokémiai módszerrel. A 48-ból 23 esetben lehetőségünk nyílt a csontáttétet képző primer tumor HER2/neu-expressziójának vizsgálatára is. Ahol overexpressziót, vagy diszkordanciát észleltünk az individuálisan párosított primer tumor és csontáttétje HER2/neu-státusában, ott a HER2/neu gén amplifikációját is megvizsgáltuk fluoreszcens in situ hibridizációval.

Különböző humán tumorsejtvonalak csontkolonizációját két módszerrel SCID egerekben vizsgáltuk. Az első módszer során a sejtvonalakat intrakardiális oltás során juttattuk be a keringésbe, a második során pedig humán felnőtt szervezetből, csípőprotézis-műtét során eltávolított csontfragmentumokat transzplantáltunk SCID egerek bőre alá, majd az így szervült csontfragmentumok közé injektáltuk a humán tumorsejteket.

Eredmények

Az érdenzitás nem szignifikáns változását észleltük, amikor a primer tüdő-, vese- és emlőrákokat és csontáttéteiket egy csoportban vizsgáltuk. A primer tumorok és csontáttétjeik érdenzitása között egyik szövettani típusban sem találtunk statisztikailag szignifikáns korrelációt.

A csontmetasztázisokban a primer tumorokhoz képest észlelt érdenzitás-változásokat tumorcsoportonként is vizsgáltuk, és így a veserákok csontáttétjeiben az MVD szignifikáns, 27,59%-os csökkenését észleltük a primer tumorokéhoz viszonyítva. Azt találtuk, hogy a csontmetasztázisokban az MVD vagy csökkent (11-ből 5 esetben), vagy nem változott (11-ből 6 esetben), és nem volt olyan eset, ahol az MVD a csontmetasztázisban növekedett volna. Nem csak a primer veserákok, de csontáttéteik is a legvaszkularizáltabb tumoroknak bizonyultak a tüdő- és emlőrákokhoz hasonlítva.

A tüdő adenokarcinóma eseteket elemezve az MVD 49,12%-os szignifikáns növekedését észleltük a csontmetasztázisokban a primer tumorokhoz viszonyítva. Ebben a tumortípusban az MVD csökkenése kevésbé volt gyakori (csak tízből 2 esetben figyeltük meg), míg az MVD

növekedését gyakrabban figyeltük meg (10-ből négy esetben).

Az emlőrákos eseteknél a csontmetasztázisokat a primer tumorokhoz viszonyítva az MVD nem szignifikáns növekedését figyeltük meg. Az MVD-nek a primer tumorokhoz képest a párosított csonttátekben észlelt változása alapján két alcsoportot sikerült elkülöníteni: az I-es alcsoportban az MVD a csonttátekben csökkent vagy nem változott, míg a II-es alcsoportban az MVD a csontmetasztázisokban növekedett. Kiderült, hogy az I. alcsoportban a 9-ből 6 beteg (67%) részesült adjuváns kezelésben, míg a II. alcsoportban a 9 betegből csak kettő (23%) kapott adjuváns kezelést. Kiderült, hogy a kezelést nem kapott betegek csonttáteiben az MVD magasabb volt a párosított primer tumorokban és a kezelt betegek csontmetasztázisaiban mért MVD-hez hasonlítva, és ezek az eltérések statisztikailag szignifikánsnak bizonyultak. Másrészt, az adjuváns kezelésben részesült betegek csontmetasztázisaiban szignifikánsan alacsonyabb MVD-t mértünk a primer tumorokéhoz hasonlítva.

A VEGF protein expressziója hasonló volt a primer emlőtumorokban és a csontmetasztázisokban, és nem találtunk korrelációt az MVD és a VEGF-expresszió között.

A 48 emlőrákos beteg vizsgálata során 6 esetben (12,5%) igazoltuk a HER2/neu onkoprotein célzott terápiát indikáló overexpresszióját és/vagy génamplifikációját. A 48-ból 23 esetben a megfelelő primer emlőtumorok HER2/neu-státusát is meghatároztuk. IHC-val a 23-ból három esetben észleltünk 2+ vagy 3+ expressziót. Mind a három esetben génamplifikációt is igazoltunk FISH-sel. Ezeken az eseteken kívül találtunk még egy génamplifikált primer tumort HER2/neu-overexpresszió nélkül. A 23 párosított esetből három olyan esetünk volt, ahol az anti-HER2 terápiát indikáló HER2/neu-overexpresszió és/vagy -génamplifikáció szempontjából a primer tumor és a csonttáttét HER2/neu-státusa diszkordáns volt. A csonttáttétekben többnyire alacsonyabb HER2/neu-génkópiaszámot észleltünk a primer tumorokban mérthez viszonyítva, másrésről nem volt olyan esetünk, ahol a nem génamplifikált primer tumorhoz génamplifikált csonttáttét társult volna.

In vivo csontkolonizációs modell létrehozása céljából végzett kísérleteinkben humán melanómasejtek intrakardiális oltását követően azt figyeltük meg, hogy azok kolonizálják az agyat, a májat és a csontokat. A WM983B sejtvonal különböző transzfektánsainak oltásakor megfigyeltük, hogy a 19L vonal a többi transzfektánshoz képest ritkábban kolonizálta az egér csontokat. A HT168-M1 és HT-199 melanóma-sejtvonalak intrakardiális oltása esetén nem találtunk különbséget a csontkolonizáció tekintetében a nemek között.

Másik modellünkben, melyben a felnőtt szervezetből származó humán csontfragmentumokat alkalmaztunk, a csontfragmentumokat 3 hét után érdús kötőszövet nőtte be. Azt is megfigyeltük, hogy ha humán csontfragmentumokat transzplantálunk SCID-egérbe, melyek közé 3 hét után melanómasejteket oltunk, a melanómasejtek kolonizálják a humán csontfragmentumokat.

Következtetések

1. Megállapítottuk, hogy humán emlő-, vese és tüdő-adenokarcinómák MVD-je a csontmetasztázisokban megváltozik a primer tumorhoz képest: az átlagos érdenzítés a csontáttétekben a primer tumorokhoz képest veserákok esetében csökkent, míg tüdőrákok esetén növekedett. Adataink arra is utalnak, hogy emlőrákok esetén az MVD változását befolyásolja a kemo- és/vagy endokrin terápia.

2. Emlőrákok csontáttéteiben nem találtunk összefüggést a daganat érdenzítése és VEGF-expressziója között, ami arra utal, hogy más angiogén citokinek is befolyásolják az érújdonképződést.

3. Az általunk vizsgált esetekben az emlőrákok csontba való progressziójuk során megőrizték HER2/neu-negatív státusukat. Ezzel szemben a HER2/neu-pozitív emlőrákok csontmetasztázisa elveszítheti pozitivitását.

4. A fentieket összefoglalva, eredményeink arra utalnak, hogy a fő humán daganattípusok metasztatikus progressziója során a feno- illetve genotípus-meghatározást

ahol lehet, meg kell ismételni a metasztatikus szövetből is, ha ennek terápiás konzekvenciája lehet, ugyanis a molekuláris célpontként használt fehérjék expressziós státusa a metasztázisban más lehet, mint a primer tumorban.

5. Emberi melanóma-sejtvonalak alkalmazásával csontkolonizációs modellt hoztunk létre SCID egerekben.

6. SCID egerekbe implantált, felnőtt emberi szervezetből származó csontfragmentumok közé humán tumorsejteket oltva egy olyan modell hozható létre, amely alkalmas a tumorsejt-csontmátrix interakció vizsgálatára *in vivo*.

Publikációk jegyzéke

1. **Lőrincz T**, Tóth J, Badalian G, Tímár J, Szendrői M. Her2/neu genotype of breast cancer may change in bone metastasis. *Pathol Oncol Res* 2006;12: 149-152., **IF: 1,241**

2. **Lőrincz T**, Tóth J, Szendrői M, Tímár J. Microvascular density of breast cancer in bone metastasis: influence of therapy. *Anticancer Res* 2005; 25: 3075-3081., **IF: 1,604**

3. **Lőrincz T**, Tímár J, Szendrői M. Alteration of microvascular density in bone metastases of adenocarcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2004;10: 149-153., **IF: Ø**

4. Döme B, Rásó E, Dobos J, Mészáros L, Varga N, Puskás LG, Fehér LZ, **Lőrincz T**, Ladányi A, Trikha M, Honn KV, Tímár J. Parallel expression of alphaIIbeta3 and alphavbeta3 integrins in human melanoma cells upregulates bFGF expression and promotes their angiogenic phenotype. *Int J Cancer* 2005; 116: 27-35., **IF: 4,700**