

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

Doktori értekezés tézisei

**A mátrix metalloproteinázok és angiogenetikus faktorok a terhességi
trofoblaszt betegségekben és normál méhlepényben**

Dr. Singh Margit

Témavezető:

Dr. Németh Gábor, Dr. Fülöp Vilmos

Szeged

2012

A TÉZISHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1./ Singh M, Kindelberger D, Nagymanyoki Z, Ng SW, Quick CM, Elias KM, Yamamoto H, Fichorova R, Fulop V, Berkowitz RS: Matrix metalloproteinases and their inhibitors and inducer in gestational trophoblastic diseases and normal placenta. *Gynecologic Oncology*. 2011; 122(1):178-82. IF: 3,76

2./ Singh Margit dr., Németh Gábor dr., Fülöp Vilmos dr., Ross S. Berkowitz dr., Pál Attila dr.: A mátrix metalloproteinázok szerepe a terhességi trofoblasztbetegségek patogenezisében. *Nőgyógyászati Onkológia*. 2011; 16:71-74. IF:-

3./ Singh M, Kindelberger D, Nagymanyoki Z, Ng S-W, Quick CM, Yamamoto H, Fichorova R, FulopV, Berkowitz R: Vascular endothelial growth factors and their receptors and regulators in gestational trophoblastic diseases and normal placenta. *Journal of Reproductive Medicine*. 2012 – elfogadva. IF: 0,88

4./ Singh Margit dr., Németh Gábor dr., Fülöp Vilmos dr., Ross S. Berkowitz dr., Pál Attila dr.: Vaszkuláris endotelialis növekedési faktorok, receptoraik és szabályozóik terhességi trofoblaszt betegségekben és normál méhlepényben. *Magyar Nőorvosok Lapja*. 2012 – elfogadva. IF:-

5./ Vilmos Fulop, Ivan Szigetvari, Janos Szepesi, Gyorgy Vegh, Margit Singh, Ross S. Berkowitz: The Clinical Epidemiology and Management of GTN in Hungary in the last 34 years. *Journal of Reproductive Medicine*. 2012 – elfogadva. IF: 0,88

A mátrix metalloproteinázok és angiogenetikus faktorok a terhességi trofoblaszt betegségekben és normál méhlepényben

BEVEZETÉS

A terhességi trofoblaszt betegségek olyan egymással kapcsolatban lévő kóros elváltozások, amelyek a chorionszövetek kóros növekedésével jellemezhetők, valamint magukba foglalják a változékony helyi invazív és távolra metasztatizáló hajlammal rendelkező molaterhességet, invazív molát, choriocarcinomát és a placentaágyi trophoblasztos tumort. Közel 50 éve, amióta Li és munkatársai először alkalmaztak metotrexátot a choriocarcinomák kezelésében, a terhességi trophoblaszt tumorok ma az egyik leghatékonyabban kezelhető rosszindulatú daganatos megbetegedések. A terhességi trofoblaszt betegségek kutatása rendkívüli klinikai eredményeket hozott a betegség diagnosztikájában és kezelésében. A rohamosan fejlődő molekuláris biológiának köszönhetően egyre többet tudhatunk meg a betegség molekuláris alapjairól. Azonban a napról-napra bővülő ismeretanyag ellenére is a legnagyobb hiányosságaink éppen ezen a területen, az intracellulárisan és extracellulárisan zajló biológiai folyamatok szerepének megértésében vannak. A trophoblaszt betegségek viselkedésének pontosabb megértésével egyben újszerű terápiás megoldásokhoz is közelebb juthatunk.

Magyarországon 1800 terhességre esik egy mola hydatidosa és 15800 terhességre egy invazív mola vagy choriocarcinoma, ami azt jelenti, hogy évente körülbelül 160 új molás és 20 új malignus trofoblaszt tumoros megbetegedést diagnosztizálnak. A trofoblaszt betegségek etiológiája még ma sem pontosan ismert. A betegség kórokát kutatva felmerülnek anyai, magzati, fetomaternalis, genetikai, immunológiai tényezők, és a vírusfertőzés lehetősége sem zárható ki.

1. Terhességi trofoblaszt betegségek

Hertz 1971-ben kidolgozta a terhességi trofoblaszt betegségek terminológiáját. Értelmezése szerint a gesztációs trofoblaszt betegségek spektruma a hidropikus boholydegenerációtól a mola hydatidosán keresztül a choriocarcinomáig terjed. A WHO 1983-ban ezt az állásfoglalást elfogadta, és a terhességi trofoblaszt betegségeket a trofoblaszt sejtekből

kiinduló benignus és malignus folyamatokként definiálta, illetve a következők szerint csoportosította:

- Mola hydatidosa: a chorionbolyhok hólyagos elfajulása (részleges és teljes).
- Invazív mola: a molaterhesség infiltrálja a miometriumot, és áttétet is adhat.
- Terhességi choriocarcinoma: cito- és szinciotrofoblaszt sejtek malignus daganata, bolyhok nincsenek.
- Placentaági trofoblasztos tumor: a méhlepény beágyazódási helyéről kiinduló, főként intermedier trofoblaszt sejtekből álló daganat.

Terhességi trofoblaszt tumorok azok a trofoblaszt betegségek, amelyek környezetükbe törnek, progrediálnak, áttétet adnak, és kezelés nélkül a beteg halálát okozzák. A rosszindulatú trofoblaszt tumorok több, mint a fele molaterhesség talaján alakul ki, ezért a mola hydatidosát malignus potenciállal rendelkező benignus trofoblaszt tumorként értelmezik. A mola terhesség evakuációját követően 80%-ban várható spontán remisszió, 15%-ban invazív mola és 5%-ban choriocarcinoma kialakulása. A choriocarcinomák patogenezise igen összetett, megjelenhetnek terhességtől függetlenül, normál szülést vagy spontán vetélést követően is. Az esetek legnagyobb részében, azonban mola hydatidosa után alakulnak ki. Placentaági trofoblasztos tumorok (PSTT) 75%-a normál terhességet követően alakul ki, és alig 2%-uk kórelőzményében szerepel a molaterhesség.

Az 1970-es évekig a terhességi trofoblaszt betegségek diagnózisa általában a második trimeszterre esett. Azóta a korszerű diagnosztikus módszerek birtokában, elsősorban az ultrahang vizsgálatok és hCG meghatározás lehetősége miatt a kórismézés az első trimeszterben történik, ezért a hüvelyi vérzés melletti klasszikus tünetek, mint például hyperemesis, hyperthyreozis, preeclampsia vagy légzési elégtelenség lényegesen ritkábban és szegényesebben fejlődnek ki.

A kezelés megválasztását és sikerességét elsősorban a betegség anatómiai kiterjedésén alapuló stádiumbeosztása határozza meg. A terhességi trofoblaszt tumorban szenvedők alacsony és magas kockázatú csoportját különböztetjük meg. A New England Trophoblastic Disease Center ajánlása szerint magas kockázatú kategóriába kerül az a trofoblaszt beteg,

akinél: a kezdeti hCG-titer nagyobb, mint 100 000 NE/l; a tünetek kezdete óta több, mint 4 hónap telt el; agy és/vagy májajáté van; előzetes sikertelen kemoterápiát kapott; a beteg 40 évesnél idősebb; fizikális státuszában "large-for-date" uterus, 6 cm-nél nagyobb theca-lutein ciszta, anamnézisében előzetes molaterhesség vagy trofoblaszt tumor szerepel; egyéb tünete van, mint például toxémia, hipertireózis, trofoblaszt embolizáció, DIC. Az alacsony rizikójú betegeknel az elsőként választandó a metotrexát vagy actinomycin-D monoterápia. Kemoterápia rezisztencia esetén és a magas rizikójú betegeknel EMA-CO (etoposid, metotrexát, actinomycin-D, ciclofosamid és vincristin) vagy MAC (metotrexát, actinomycin-D és cyclofosamid) kezelés javasolt. Ismert tény, hogy a terhességi trofoblaszt daganatok gyors lokális inváziója, valamint a távolra szóródó metasztázisok jelenléte mellett is általában kifejezett kemoterápia érzékenységet mutatnak, ezért hatékonyan és sikeresen kezelhetők. A citosztikus kezelés eredményessége a csökkenő hCG szint ellenőrzésével jól monitorizálható. Az azelőtt egyedüli beavatkozásként szóba jövő méheltávolítás fokozatosan háttérbe szorult, és ma csak indokolt esetekben másodlagos szerepet játszik a kezelésben. Így a betegek reprodukív képessége sokszor megőrizhető. Sajnos a gyakran normál terhességet követően kialakuló PSTT kevésbé kemoterápiaérzékeny, így elsődleges terápiája a mai napig a méh eltávolítása.

2. Mátix metalloproteinázok

A lepényszövet trofoblaszt sejtjei heterogén populációt képeznek: sinciotrofoblasztokból, citotrofoblasztokból és extravillozus trofoblasztokból állnak. Míg a boholytrofoblaszt sejtek nem mutatnak invazív viselkedést, addig az extravillozus trofoblasztok a malignus tumorok sejtjeihez hasonlóan invazív tulajdonságokkal rendelkeznek. Az endometriumba történő trofoblaszt betörés, a placentáció szigorúan szabályozott folyamat. Az extravillozus trofoblaszt sejtek a lepényrögzítő bolyhainak bazális membránjától migrálnak, és a mélybe törve elérik a miometriumot. A folyamat az anyai szövetek extracelluláris mátrixának (ECM) enzimikus bontásával történik, melyben különböző proteáz enzimek, mint szerin proteázok, katepszinek és mátrix metalloproteinázok (MMP-k) játszanak szerepet. A mátrix metalloproteinázok különböző fiziológiás folyamatokban (organogenezis, szövet remodelling), gyulladásos folyamatok szabályozásában, és betegségek, mint például daganatok kialakulásában működnek közre. Az MMP-k a cink-atomot tartalmazó endopeptidázok családjába tartozó enzimek, melyek az ECM alkotóelemeinek széles

spektrumát képesek bontani. Az irodalomban eddig közel 25 féle MMP-t mutattak ki. Szubsztrát specificitásuk alapján 4 fő csoportba sorolják őket: kollagenázok, zselatinázok, stromelizinek és membrán-típusú MMP-k. Az MMP-21 és az MMP-28 szubsztrátját ezidáig még nem sikerült tisztázni.

Az MMP-k inaktív pro-enzimek formájában szekretálódnak. Az MMP-k proteolitikus aktivitása szigorúan szabályozott folyamat, mely számos biológiai modulátortól (hormonok, citokinek, szöveti glikoproteinek, növekedési faktorok) függ. Szöveti inhibitoraik (Tissue inhibitor of metalloproteinase - TIMP) kötődnek az MMP-k aktív formáihoz, és reverzibilisen gátolják a proteolitikus aktivitásukat a szövetekben.

3. Angiogenetikus faktorok

Az érújdonképződés, azaz angiogenezis a méhlepény fejlődésében és a tumorok kialakulásában egyaránt fontos szerepet játszik. A terhességi trofoblaszt tumorok megnövekedett vaszkularizációval jellemezhetők. Az angiogenezis folyamatának megértésével közelebb juthatunk a tumor biológiájának megértéséhez, valamint felvethet új terápiás lehetőségeket is.

A tumorsejt képessége új ereket alkotni, az érújdonképződés folyamata, kritikus lépés a tumor fejlődésében. A tumorsejtek növekedési faktorok overexpressziója által képesek a már meglévő érhálózatból újat alkotni. A vaszkuláris endotelialis növekedési faktor kritikus szerepet játszik az új erek képződésében, ami az endotelialis sejtekre gyakorolt proliferatív és kemotaktikus hatás révén a tumor növekedéséhez vezet.

A vaszkuláris endotelialis növekedési faktor (VEGF) receptoraihoz kapcsolódva (VEGFR-1,-2,-3) képes indukálni az angiogenezist és lymphangiogenezist egyaránt az érendotel sejtekre gyakorolt mitogén hatása révén. A VEGFR-1 a fejlődő érrendszerben kulcsfontosságú, pontos szerepe nem tisztázott. A VEGF majdnem minden ismert hatása (mikrovaszkuláris permeabilitás, érendotel sejt proliferáció és migráció) a VEGFR-2-n keresztül valósul meg. A VEGFR-3 elősegíti a nyirokércépződést, kizárólag a nyirokerek endotel sejtjeiben található meg felnőtt korban.

Számos citokinről és növekedési faktorról igazolódott, hogy szabályozzák a VEGF-t, és szintjük korrelál a VEGF szintjével. Pozitív korreláció figyelhető meg a szérum IL-6 szint és

a VEGF szint között emlő és más előrehaladott stádiumban lévő metasztázáló carcinomákban. Méhnyakrák sejtvonalaknál exogén IL-6 hatására magasabb VEGF szintet detektáltak. A mátrix metalloproteináz inducer CD147 VEGF expressziót növelő hatása is számos tanulmány által bizonyított a tumorsejteken.

CÉLKITŰZÉS

A sejtek invázióját befolyásoló, funkcionálisan fontos fehérjék, azaz a mátrix metalloproteinázok és angiogenetikus faktorok kifejeződésének és viselkedésének tanulmányozása a normál lepényi és kóros trofoblaszt sejtekben. Munkánk során elsősorban olyan fehérjéket vizsgáltunk, amelyek a későbbiekben biológiai markerként és egyben újabb terápiás lehetőségként is szolgálhatnak a klinikai gyakorlatban a terhességi trofoblaszt tumorok esetében.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Immunhisztokémia

Immunhisztokémiai vizsgálatot formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetekből készült szövettani metszeteken végeztük. Negyven terhességi trofoblaszt betegségben (10 részleges mola, 10 teljes mola, 10 choriocarcinoma és 10 PSTT), valamint 10 normál első trimeszteri méhlepényben vizsgáltuk az MMP-7,-14,-21-28, TIMP-3,-4, CD147, IL-6, VEGFR-1,-2 és -3 expresszióját immunhisztokémiai módszerrel. Az MMP-1,-2,-3,-9,-13, TIMP-1, VEGF, Ang-1 és -2 expresszióját az 10 choriocarcinomás és 10 PSTTs esetben vizsgáltuk. Az avidin-biotin immunperoxidáz eljárást alkalmaztuk formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetekből készült 0.05 microm vastagságú metszeteken. A metszeteket xilénben deparaffinizáltuk, majd csökkenő koncentrációjú alkohol sorozatban és desztillált vízben hidráltuk, végül az endogén peroxidáz aktivitást 0,3%-os hidrogén-peroxiddal blokkoltuk. Miután a nem specifikus antigéneket normál ló szérummal blokkoltuk, a metszeteket nedves kamrában az elsődleges antitesttel 24 órán át, 4 °C-on inkubáltuk. A festék jelöléséhez az elsődleges ellenanyagtól függően egér vagy nyúl ellenes biotinilált másodlagos ellenanyagot,

majd az ABC (amino-benzperidol-klorid) torna-peroxidázt használtuk. A reakció termékeket DAB (3,3-diaminobenzidin-tetrahidroklorid) kromogénnel tettük láthatóvá. Végül a metszeteket növekvő koncentrációjú alkohol sorozatban dehidráltuk, xilénben tisztítottuk és montíroztuk. Negatív kontroll esetében az elsődleges antitestet normál szérummal helyettesítettük. A hematoxilinnal és eozinnal történő festést az összes mintánál elvégeztük. Az immunfestés eredményét két patológus segítségével elemeztük ki. A membrán, citoplazmatikus és magfestődést a normál lepény, a részleges és teljes mola szincicio-, cito- és extravillozus trofoblasztjaiban, valamint a choriocarcinoma és PSTT esetek tumorsejtjeiben szeparáltan vizsgáltuk. Az immunreakciókat negatívként, gyengén, mérsékelten és erősen pozitívként értékeltük. Erősen pozitívnak fogadtuk el, ha a sejtek több, mint 50%-a mutatott erős, intenzív festődést, gyengén pozitívnak értékeltük, ha a sejtek kevesebb, mint 25%-a, mérsékelten pozitív, ha a sejtek 25-50%-a mutatott intenzív festődést. Negatívként, ha a sejtek több, mint 50%-a nem mutatott immunreakciót.

2. Electro-chemiluminescens assay (MSD assay)

Electro-chemiluminescens assay segítségével vizsgáltuk normál trofoblaszt (3A-Sub-E), Jar és JEG-3 choriocarcinoma sejtvonalaknál az MMP-1,-2,-3,-9, VEGF és VEGFR-2 szintjét. A humán normál trofoblaszt (3A-Sub-E) és a choriocarcinoma (Jar, JEG-3) sejtvonalakat az American Type Culture Collection (ATCC) cégtől szereztük be. A sejteket hővel inaktivált magzati borjúszérummal (10% FCS), L-glutaminnal (2 mM/ml), Penicillinnel (100 U/ml) és Streptomycinnel (100 g/ml) kezelt Eagle-féle minimális esszenciális (normál trofoblaszt és JEG-3 sejteknél) vagy RPMI-1640 (Jar sejteknél) médiumot tartalmazó táptalajban tenyésztettük. A sejteket (5×10^4 sejt/lyuk) 96 lyukú platen 37 °C-on 5% CO₂-t és 95% levegőt tartalmazó nedves atmoszférában tartottuk egyrétegű (monolayer) sejtkultúrában tenyésztve. 100% konfluenciánál gyűjtöttük össze a felülúszó mintákat, a sejtekből pedig lízis buffer segítségével lizatumokat készítettünk. 10-10 normal trofoblaszt, Jar és JEG-3 felülúszó és lizatum mintában Meso Scale Discovery Sector2400 eszközzel az előírt protokoll szerint határoztuk meg a MMP-1,-2,-3,-9, VEGF és VEGFR-2 fehérje szinteket.

3. Sejtproliferációs assay (MTT assay)

MTT assay segítségével vizsgáltuk normál trophoblaszt, JEG-3 és Jar choriocarcinoma sejtek érzékenységét metotrexát, etoposid és carboplatin kezelésre. Az előző pontban leírt módon tenyésztettük a humán normál trofoblaszt (3A-Sub-E), Jar és JEG-3 choriocarcinoma sejtvonalakat. Azonos számú (8×10^4) sejtet inkubáltunk 96 lyukú platen 24 órán keresztül emelkedő koncentrációjú metotrexáttal, etoposiddal és carboplatinnal. Ezt követően MTT assay segítségével határoztuk meg a sejtek számát.

4. Statisztikai analízis

Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeinek adatait RxC contingencia táblázat, az electro-chemiluminescens assay adatait a nem parametrikus Mann-Whitney teszt használatával a Minitab 13.1 statisztikai szoftver csomag segítségével elemeztük. Statisztikailag szignifikáns különbségnek a 0.05 határértéket fogadtuk el.

EREDMÉNYEK

1. Immunhisztokémiai analízis

Az MMP-7 szignifikánsan erősebben festődik a choriocarcinoma sejtekben, mint a részleges mola extravillozus trofoblaszt sejtjeiben ($p < 0.05$). Összehasonlítva a PSTT sejteket a choriocarcinoma sejtekkel nem volt szignifikáns különbség. A PSTT sejtek MMP-14 festődése volt szignifikánsan a leggyengébb a normál lepényhez, részleges és teljes molához, valamint a choriocarcinomához képest. A choriocarcinoma és PSTT sejtek MMP-21 kifejeződése szignifikánsan erősebb, mint a normál lepény, részleges és teljes lepény extravillozus trofoblaszt sejtjeinek. A choriocarcinoma MMP-28 festődése szignifikánsan erősebb, mint a PSTT sejté ($p < 0.05$). TIMP-3 kifejeződése choriocarcinoma sejtekben a leggyengébb összehasonlítva a normál lepény és teljes mola extravillozus trofoblaszt, valamint a PSTT sejtekkel ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.05$). Az extravillozus trofoblaszt sejtek a normál lepényben, részleges és teljes molában szignifikánsan erősebb TIMP-4 festődést mutatnak, mint a choriocarcinoma sejtek ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.05$). A PSTT sejtek TIMP-4 festődése szintén erősebb a choriocarcinoma sejténél ($p < 0.05$).

Az extravillózus trofoblaszt sejtek normál lepényben és teljes molában a PSTT sejtekhez hasonlóan erősebb IL-6 festődést mutatnak a choriocarcinoma sejteknél ($p=0.005$, $p=0.004$, $p=0.03$). Az áttétes choriocarcinoma sejtek viszont igen erős IL-6 immunreakciót mutattak. Erős CD147 immunreakciót mutatott mindhárom sejtípus (CT, ST, ET: 100%) a normál lepényben. A choriocarcinoma CD147 festődése szignifikánsan erősebb volt összehasonlítva a részleges és teljes lepény trofoblaszt sejtjeivel ($p<0.01$, $p<0.01$). (1. Táblázat)

Szövet típusa		MMP-7	MMP-14	MMP-21	MMP-28	TIMP-3	TIMP-4	IL-6	CD147
Normál méhlepény (n=10)	CT	2.4	2.8	0.9	2.8	2.8	2.2	3.0	3.0
	ST	2.6	2.9	0.6	2.9	2.7	2.3	3.0	3.0
	ET	1.0	2.8	0.5	2.7	2.3	2.6	2.8	2.8
	SC	2.0	2.5	0	2.8	2.7	2.9	0.6	0.6
Részleges mola (n=10)	CT	2.0	2.4	2.6	2.0	2.0	2.3	1.4	1.4
	ST	2.0	2.2	1.8	1.4	2.4	2.7	2.3	2.3
	ET	0.3	2.8	1.6	1.5	1.2	2.9	0.5	0.5
	SC	2.0	2.5	1.6	1.7	2.1	3.0	1.0	1.0
Teljes mola (n=10)	CT	1.5	2.7	2.3	2.8	2.4	2.1	1.6	1.6
	ST	1.3	2.4	1.6	2.9	2.4	2.8	2.3	2.3
	ET	0.7	2.6	2.0	2.5	1.5	2.4	0.8	0.8
	SC	2.0	2.5	2.0	2.9	2.0	2.3	1.0	1.0
Choriocarcinoma (n=10)		2.0	2.6	3.0	2.6	1.0	1.2	0.2	2.6
PSTT (n=10)		1.0	1.4	3.0	1.2	2.0	2.4	1.4	1.0

1. Táblázat: Mátrix metalloproteinázok, szöveti inhibitoraik, valamint szabályozóinak kifejeződése normál méhlepényben és terhességi trofoblaszt betegségeken (Megjegyzés: a táblázat normál értékeket tartalmaz (0-3). ST: szinciotrofoblaszt sejt, CT: citotrofoblaszt sejt, ET: extravillózus trofoblaszt sejt, SC: sztróma sejt.)

A PSTT VEGF és Angiopoietin-1 kifejeződése szignifikánsan magasabb a choriocarcinomáénál ($p=0.007$, $p=0.01$). A choriocarcinoma VEGFR-3 expressziója volt a legerősebb a normál lepény, a komplett és részleges mola extravillosus trofoblaszt sejteihez képest ($p=0.036$, $p=0.038$, $p=0.05$).

2. Electro-chemiluminescens assay

Az MMP-1 szintje a normál trofoblaszt sejtek felülúszójának magasabb volt, mint a Jar és JEG-3 choriocarcinoma sejtek felülúszójának, és a normál trofoblaszt sejtek lizátumának ($p=0.0001$, $p=0.0001$, $p=0.0003$). Jar és JEG-3 choriocarcinoma sejtek esetén a lizátumok MMP-1 szintje szignifikánsan magasabb volt a felülúszókénál ($p=0.0001$, $p=0.0001$). Normál trofoblaszt, Jar és JEG-3 choriocarcinoma sejtek felülúszóinak MMP-2 szintje szignifikánsan magasabb volt a lizátumokénál ($p=0.0002$, $p=0.0001$, $p=0.0008$). MMP-2 szintje Jar choriocarcinoma sejtek felülúszójában és lizátumában volt a legmagasabb. A normál trofoblaszt sejtek felülúszójának és lizátumának MMP-3 és MMP-9 szintje volt a legmagasabb a Jar és JEG-3 choriocarcinoma sejtekéhez képest. MMP-3 és MMP-9 szint a normál trofoblaszt sejtek felülúszójában szignifikánsan magasabb volt, mint a lizátumában ($p=0.0002$, $p=0.04$). Normál trofoblaszt sejtek felülúszójának és lizátumának VEGF szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a Jar és JEG-3 choriocarcinoma sejtekéhez képest. A VEGF szint Jar és JEG-3 choriocarcinoma sejtek felülúszójában szignifikánsan magasabb volt, mint a lizátumokban ($p=0.0006$, $p=0.0014$). Normál trofoblaszt sejtek felülúszóinak VEGFR-2 szintje magasabb volt a Jar és JEG-3 felülúszóinál és a normál trofoblaszt lizátumokénál ($p=0.0002$, $p=0.0002$, $p=0.019$). A normál trofoblaszt sejtek lizátumának VEGFR-2 szintje magasabb volt a Jar és JEG-3 choriocarcinoma sejtek lizátumjaihoz képest ($p=0.0002$, $p=0.0002$). (2. Táblázat)

Minta típusa		MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	VEGF	VEGFR-2
Normál trofoblaszt sejtek	Felülúszó (n=10)	243.9 (SD: 112.9)	23825.9 (SD: 233.5)	208.0 (SD: 87.6)	38.0 (SD:4.49)	7.8 (SD:172.7)	0.025 (SD:0.015)
	Lizátum (n=10)	57.7 (SD: 46.2)	1615.5 (SD: 846.1)	3.78 (SD: 2.5)	22.7 (SD:32.7)	0.0 (SD:14.0)	0.013 (SD:0.005)
JEG-3 chorioc. sejtek	Felülúszó (n=10)	4.36 (SD: 5.3)	384.7 (SD: 287.0)	0.4 (SD: 0.6)	3.4 (SD:3.3)	1196.5 (SD:401.1)	0.0036 (SD:0.001)
	Lizátum (n=10)	192.0 (SD: 208.3)	83.9 (SD: 29.0)	0.6 (SD: 0.8)	2.5 (SD:2.2)	482.0 (SD:460.1)	0.0011 (SD:0.001)
Jar chorioc. Sejtek	Felülúszó (n=10)	2.5 (SD: 3.7)	135459.8 (SD: 521.7)	0.2 (SD: 0.4)	1.0 (SD:1.5)	1713.9 (SD:702.9)	0.0039 (SD:0.001)
	Lizátum (n=10)	151.0 (SD: 196.8)	8013.6 (SD:3092.1)	1.27 (SD: 0.9)	2.0 (SD:1.8)	191.1 (SD:61.1)	0.0021 (SD:0.001)

2. Táblázat: Mátrix metalloproteinázok, a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor és a VEGFR-2 szintje normál trofoblaszt, JEG-3 és Jar choriocarcinoma sejtek felülúszójában és lizátumában (Megjegyzés: az adatok pg/ml egységben értendők.)

3. Sejtproliferációs assay

A normál trofoblaszt és JEG-3 choriocarcinoma sejtek száma az emelkedő metotrexát és etoposid kezelés hatására szignifikánsan csökkent ($p < 0.005$, $p < 0.005$), míg a Jar choriocarcinoma sejtek száma nem változott. A sejteket carboplatinral kezelve egyik csoportban sem észleltünk szignifikáns változást.

MEGBESZÉLÉS

Jelenlegi ismereteink szerint a terhességi szövet inváziója, annak fennmaradása az endometriumban, illetve a méh üregében az anyai immunválasz, a decidua sejtek fehérje profilja és az endometrium vérellátása által szigorúan szabályozott folyamat. Amennyiben a szabályozó folyamatok egyensúlya megbomlik, a trofoblaszt invázió kontrollálatlanná válik, és lokális, valamint távoli áttétet képezve rosszindulatú trofoblaszt tumor alakul ki.

A placentáció során olyan sejtek találhatóak a korai méhlepényben, amelyek a malignus daganat sejtekhez hasonló invazív tulajdonságokkal rendelkeznek, ezért az invazív trofoblaszt sejtek, a tumorsejtek analógiaként, a tumorkutatásban széleskörűen használatosak. Gestációs trofoblaszt betegségek esetén a növekvő trofoblaszt tömegnek a normál terhességhez és egyéb szolid tumorokhoz hasonlóan folyamatosan növekvő vérellátásra is szüksége van a további proliferációhoz. A placentáció folyamata az anyai és embrionális szövetek által termelt növekedési faktorok, citokinek, stb. hatására parakrin és autokrin módon, szigorúan szabályozott. Amennyiben ez a koordinált önregulációs folyamat valamilyen endogén, vagy exogén hatás következtében zavart szenved, az a sejtek kontrollálatlan növekedéséhez, proliferációjához, azaz malignus transzformációjához vezethet. Ennek a beindításához egy-egy gén, illetve fehérjetermékének mutációja, valamint csökkent, illetve fokozott expressziója elegendő lehet.

Az érújdonképződés kiemelkedő jelentőségű számos fiziológiás és patológias folyamatban, így a daganat kialakulásában is. A vaszkuláris endotelialis növekedési faktorok és receptoraik központi szabályozói az érújdonképződésnek. A trofoblaszt sejtek vaszkuláris növekedési faktort termelő képességét számos tanulmány leírta. Ezen faktorok képesek indukálni a trofoblaszt sejtek proliferációját, migrációját és invázióját. A citotrofoblaszt sejtek inváziója a méh falába, valamint a meglévő érhálózat remodellingje szigorúan szabályozott folyamat a terhesség során. Az érújdonképződés és az angiogenetikus faktorok kifejeződésének jobb megismerésével közelebb juthatunk, mind a normál méhlepény működésének, mind a terhességi trofoblaszt betegségek biológiai hátterének megértéséhez.

Az extracelluláris mátrixot szétbontó proteázok különböző családjairól, köztük a mátrix metalloproteinázokról (MMP) kimutatták, hogy közreműködnek az anyai szövetekbe történő trofoblaszt invázió folyamatában. Számos különböző tanulmány igazolta, hogy ezzel a

mechanizmussal az MMP-k bizonyos rosszindulatú daganatok progressziójában és a metasztázis képzésében is fontos szerepet játszanak. Az MMP-k tanulmányozása révén jobban megérthetjük a sejtszintű kommunikációt a rosszindulatú sejtek és a környező sztróma között, ami a daganat invázió és metasztázis képződés kulcsfontosságú kérdése. Az ECM komponenseinek bontásán kívül az MMP-k képesek aktiválni további MMP-eket (pl. MMP-7 aktiválja az MMP-2-t és MMP-9-et, MMP-14 aktiválja az MMP-2-t) is, ezáltal növelve inváziós képességüket. Az MMP-k aktivitásának kifejeződését számos humán malignus tumorban vizsgálták *in vivo* és *in vitro* tanulmányokban. Az MMP-k erős kifejeződése különböző típusú tumorban kimutatott, például az MMP-7,-14 és -28 fokozott aktivitását figyelték meg emlő carcinomában az MMP-21 pedig erős kifejeződést mutat petefészek és vastagbél tumorokban. Ezek alapján érthető, hogy napjainkban az MMP-k családja lehetséges célponttá vált azon intenzív kutatások számára, amelyek egy új anti-neoplasztikus terápia kifejlesztésére irányulnak.

Mindezek alapján vizsgáltuk meg a jó és rosszindulatú trofoblaszt sejtek anyai szövetekbe történő inváziójában szerepet játszó mátrix metalloproteinázok, szöveti gátlók, valamint szabályozói jelenlétét a normál placentában és a terhességi trofoblaszt betegségeiben.

Choriocarcinomában fokozott MMP-7,-14 és -28, valamint csökkent TIMP-3 és -4 aktivitást tapasztaltunk a normál lepényhez, a részleges és teljes molához képest. Korábbi tanulmány már igazolta a fokozott MMP-1 és -2, valamint csökkent TIMP-1 kifejeződést choriocarcinomában. Valószínűsíthetően a choriocarcinoma inváziós képességéhez az emelkedett MMP és csökkent TIMP aktivitása is hozzájárul.

A placentaágyi trofoblaszt tumor (PSTT) lassabban növekszik, később metasztatizál, kevesebb hCG-t termel és kevésbé érzékeny kemoterapeutikumokra, mint a choriocarcinoma. A PSTT alapvetően eltérő viselkedését részben magyarázhatjuk az eltérő MMP profiljával. A choriocarcinomával összehasonlítva PSTT-ban fokozott TIMP-1,-3 és -4, valamint csökkent MMP-14 és -28 aktivitást észleltünk. PSTT-ben magasabb VEGF, Angiopoietin-1 és -2 szint volt kimutatható, mint choriocarcinomában.

A VEGFR-3 fontos az angiogenezisben és lymphangiogenezisben egyaránt a metasztázis képződés stimulálásával. A VEGFR-3 fokozott kifejeződése choriocarcinomában hozzájárulhat inváziós képességéhez.

Az MMP inducer, CD147 kulcsszerepe emlő és petefészek tumorok invazivitásában kimutatott az MMP-1,-2,-3 és -9 aktiválásán keresztül. A normál lepény citotrofoblaszt sejtjeinek erős CD147 festődése igazolja a pseudovasculogenezist, azaz az epiteliális fenotípussal rendelkező citotrofoblaszt sejtek képességét endoteliális átalakulásra, ezáltal képezve új érhálózatot. Agresszív daganatok (pl. melanoma, emlő, prosztata, petefészek és tüdő tumorok) képesek létrehozni a növekedő sejtömegükön belül olyan csatornarendszert, amelyeknek nincs endotelborítása, de közlekedik a normális érrendszerrel. A csatornákat nem endothelsejtek, hanem maguk a daganatsejtek bélelik. Ez a vaszkulogén mimikri jelensége. A genetikailag rendkívül plasztikus daganat sejtek képesek embrionális angioblastos programokat újraindítani, így megjelennek bennük az endotelsejtekre jellemző transzkripciós faktorok, enzimek, sejtfelszíni markerek és adhéziós molekulák. Így az endotelsejtekhez hasonlóvá válva lesznek képesek kapilláriszerű csatornákat képezni, amelyek biztosítják a vérellátásukat. CD147 egyik markere a folyamatnak. A daganatsejtek ezen nagyfokú változékonysága szolgálhat alapjául a kemoterápia rezisztenciának. Choriocarcinómában szignifikánsan erősebb CD147 aktivitást észleltünk a PSTT-hez, valamint a részleges és teljes molához képest.

Az MMP-k serkentő, illetve gátló hatással is lehetnek az angiogenezisre. Az MMP-9 angiogenezis indukáló hatással bír az általa felszabadított VEGF révén. A plazminogén MMP-2,-3,-7,-9,-12 általi hasítása eredményeként létrejövő angiostatin pedig ismert gátlója az érújdonképződésnek. PSTT sejtek szignifikánsan erősebb VEGF aktivitása normál lepényhez, részleges és teljes molához, valamint choriocarcinomához képest nemcsak hozzájárulhat a gyökeresen eltérő viselkedéséhez, hanem új terápiás lehetőségeket is nyújthat a PSTT kezelésében. A Jar choriocarcinoma sejteknél ugyancsak erős VEGF aktivitás észleltünk, valamint a metotrexát és etoposid kezelésnél szignifikáns rezisztenciát tapasztaltunk. A PSTT és Jar choriocarcinoma sejtvonal között észlelhető hasonlóságok felvetik a VEGF szerepét a gyógyszerrezisztencia kialakulásában, melynek tisztázására további vizsgálatok javasoltak.

Az interleukin-6 (IL-6) MMP stimuláló hatása proinflammációs citokinként bizonyított. Emellett a VEGF szabályozó szerepe is igazolt a szövetek széles körében. Különösen malignus elváltozások (méhnyak és emlő tumor) esetében mutattak ki szoros korrelációt az IL-6 és a VEGF szint változása között. A choriocarcinoma sejtekben ellentétben számos más

daganattal (petefészek, emlő) gyengén fejeződik ki az IL-6. A jelenség magyarázataként szolgálhat a choriocarcinoma sejtek által termelt magas hCG szint, melynek következtében kialakult magas szteroid hormon elsősorban ösztrogén szint képes csökkenteni az IL-6 szintet. Ezzel ellentétben, két esetben metasztatikus choriocarcinománál (májban és a tüdőben) emelkedett IL-6 kifejeződést tapasztaltunk. További vizsgálatok javasoltak a jövőben a metasztatikus choriocarcinomák eltérő viselkedésének tanulmányozására.

A terhességi trofoblaszt tumorok általában kifejezetten érzékenyek a kemoterápeutikumok iránt. Azonban néhány alkalommal gyógyszerrezisztens esetek is előfordulnak, ezért folyamatosan szükség van új hatásmechanizmusú és támadáspontú kemoterápiás szerek kifejlesztésére. A jelenleg kísérletes stádiumban lévő MMP-k aktivitását gátló molekulák (Prinomastat, Tanomastat, Marimastat, stb.) új terápiás lehetőséget kínálnak fel a terhességi trofoblaszt tumorok, illetve egyéb malignus daganatok kezelésében. A batimastat és a marimastat az MMP-1, az MMP-2, az MMP-3, az MMP-7, az MMP-9 és az MMP-14 hatását gátolja, ami a TIMP-1 hatásspektrumának felel meg. További újszerű terápiás lehetőséget nyújthat a terhességi trofoblaszt tumorok, elsősorban a PSTT kezelésében a VEGF antagonistá Bevacizumab (Avastin). A Bevacizumab, egy humanizált monoklonális antitest, mely képes gátolni az endotelsejt proliferációt és érújdonképződést. Jelenleg széles körben többek között vastagbél és emlő daganatok kezelésében alkalmazzák.

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a mátrix metalloproteinázok, szöveti inhibitoraik és szabályozói, valamint a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor és receptorai fontos szerepet játszhatnak a terhességi trofoblaszt betegségek patogenezisében és progressziójában. A mátrix metalloproteinázok és angiogenetikus faktorok kifejeződési mintázatának ismerete segítséget nyújthat a normál méhlepény inváziójának, és a terhességi trofoblaszt betegségek viselkedésének jobb megismeréséhez, továbbá lehetőséget adhat új terápiás módszerek bevezetésére is. A mátrix metalloproteinázok és angiogenetikus faktorok aktivitása, és a terhességi trofoblaszt betegségek közötti pontos kapcsolat még sok, eddig ismeretlen kérdést vet fel, melynek tisztázásához még további kutatómunka szükséges.

KONKLÚZIÓ

1. A mátrix metalloproteinázok (MMP) kifejeződési mintázatának ismerete segítséget nyújthat a normál méhlepény inváziójának, és a terhességi trofoblaszt betegségek viselkedésének jobb megismeréséhez, továbbá lehetőséget adhat új terápiás módszerek bevezetésére is. A terhességi trofoblaszt tumorok MMP profiljának pontos ismeretében a megfelelő időben, kellő mennyiségű MMP inhibitor alkalmazásával rendkívül hatékony, kevés mellékhatással járó új terápiás módszert alkalmazhatunk.

2. Vaszkuláris endotelialis növekedési faktor (VEGF), valamint receptorai és szabályozói fontos szerepet töltenek be a terhességi trofoblaszt betegségek patogenezisében. Ezek a faktorok egyben célpontjai is lehetnek új terápiás lehetőségeknek. Eredményeink alapján a Bevacizumab vagy más VEGF ellenes kezelés, valamint a VEGF receptor gátló anyagok hasznosnak bizonyulhatnak a jövőben a terhességi trofoblaszt tumorok kezelésében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni hálámat Dr. Pál Attila professzor úrnak, amiért lehetőséget adott és folyamatos segítséget nyújtott tudományos munkám elvégzésében. Külön köszönöm témavezetőmnek, Dr. Németh Gábor tanár úrnak és tutoromnak, Dr. Szöllősi János professzor úrnak, állandó segítségét és inspirálását a munkám során.

Köszönettel tartozom Dr. Fülöp Vilmosnak, Dr. Berkowitz Ross Stuart professzor úrnak, Dr. Kindelberger Davidnek, Shu-Wing Ngnek, Dr. Wong Yick Fu professzor úrnak és a Harvard Orvostudományi Egyetem Nőgyógyászati Onkológiai Laboratórium összes dolgozójának a lehetőségért, hogy intézményükben végezhettem a tanulmányomhoz szükséges vizsgálatokat, és a tudományos munkám során nyújtott segítségükért.

Köszönöm Dr. Bártfai György professzor úr és kollégáim tudományos munkám során nyújtott segítségét, valamint mindennapi munkámban való közreműködését.

Végül köszönöm családomnak és barátaimnak folyamatos támogatásukat, mely nélkül ez a dolgozat nem jött volna létre.