



Prognosztikus értékű-e a COX-2, MMP-9 és VWF expresszió az endometriális carcinoma különböző szöveti altípusaiban?

Gombási Krisztina¹, Chira Liliana², Horváth Emőke²

¹egyetemi hallgató, ²Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Patológia Tanszék

Expresia COX-2, MMP-9 și VWF în diferite subtipuri histologice ale carcinomului endometrial: potențiali markeri cu valoare prognostică?

Carcinomul endometrial se dezvoltă de obicei pe fond de hiperplazie sau atrofie endometrială, și subtipurile histologice astfel dezvoltate, împreună cu stadiul tumorii au valoare prognostică. Scopul studiului nostru este cercetarea unor biomarkeri implicați în carcinogeneză, care la nivelul țesutului tumoral favorizează creșterea, diseminarea și creșterea capacității de metastazare în oglinda posibilității aplicării unei terapii individualizate. Am examinat expresia biomarkerilor COX-2, MMP-9, VWF cu metoda imunohistochimică în 23 carcinoame de tip endometrioid cu diferite grade de diferențiere, în 7 adenocarcinoame mucinoase, 7 adenocarcinoame seroase. Vizualizarea reacției am efectuat cu cromogenul DAB (diamino-benzidină). Rezultatele au fost evaluate de doi patologii, în mod independent, în scopul evaluării cantitative și calitative în funcție de localizarea reacțiilor. Rezultatele obținute au demonstrat corelarea directă a proteinei COX-2 cu gradul de diferențiere a tumorii în carcinomul de tip endometrioid. Se exprimă intens și difuz în adenocarcinomul de tip mucinos, iar expresia este focală și puternică în subtipul seros. Expresia biomarkerului MMP-9 este identică în cele trei tipuri de adenocarcinoame, iar VWF ca marcaj endotelial scoate în evidență angiogeneza intensă în carcinomul de tip seros și mucinos, față de carcinomul endometrial de tip endometrioid, fără expresia acestei proteine la nivelul celulelor tumorale și celor stromale. Coexpresia COX-2 și MMP-9 este un marker al invazivității, VWF este un factor care contribuie la mecanismul angiogenezei. În acest sens, inhibitorii Cox-2 ar contribui la creșterea eficacității chimioterapiei, împreună cu terapia antiangiogeneză în cadrul terapiei individualizate.

Cuvinte cheie: adenocarcinoame endometriale, factori de prognostic, MMP-9, COX-2, VWF

Has the COX-2, MMP-9 and VWF expression a prognostic value in different histologic subtypes of endometrial carcinoma?

Hiperplasia or atrophy of the endometrium is usually the background of endometrial carcinoma, prognostical value is given by the development of histological subtypes together with the tumor staging. The aim of our study is to examine the biomarkers implicated in the carcinogenesis, that promotes tumor growth on the cellular level, dissemination, capacity to metastasize in hope of the possibility of apply an individualized therapy. The expression levels of COX-2, MMP-9, VWF were evaluated in 23 endometrioid type endometrial carcinoma samples with different histological differentiation grade, 7 mucinous, 7 serous adenocarcinoma. We used DAB (diamino-benzidine) chromogen for viewing reaction. Two pathologists examined the results, which were evaluated quantitatively, qualitatively in function of the reaction's localisation. The results demonstrated a direct correlation between COX-2 protein with the differentiation grade of endometrioid carcinoma. It expresses intense and diffuse in mucinous adenocarcinoma, expression is focal and strong in the serous type. Expression of MMP-9 is almost similar in the three type of adenocarcinoma, VWF demonstrates intense angiogenesis by endothelial and stromal cells marking in serous and mucinous type of carcinoma, towards of endometrioid type endometrial carcinoma. Co-expression of COX-2 and MMP-9 contributes to an invasiveness increase, VWF is a factor of angiogenesis mechanism. In this regard, the increase of the effectiveness of chemotherapy and antiangiogenesis therapy is a contribution of COX-2 inhibitors would help in individualized therapy.

Keywords: cendometrial adenocarcinoma, prognostic factors, MMP-9, COX-2, VWF

Gombási Krisztina

445100 Nagykároly – Carei

4 Cal. 25 Octombrie utca 29, ap. 14

E-mail: gombasikrisztina@yahoo.com

A méhtest endometriumából kiinduló daganatok nagyon elterjedtek az utóbbi 2 évtizedben. A daganatok nagyrésze a mirigykomponensből indul ki, az endometrium hiperplázia vagy atrófia talaján. A daganatoknak 75% - 80%-a endometrioid adenocarcinoma, 5% mucinózus típusú, 4% szerózus, a fennmaradó részt más, ritkább szövettani típusok képviselik [1], és a szövettani típusnak prognosztikus értéke van.

A klasszikus prognosztikai faktorok (szöveti típus, a miometriális invázió mélysége, a daganat differenciáltsági foka) mellett számos olyan molekuláris elváltozás mutatható ki a daganatsejtek szintjén, amelyek a klaszikus prognosztikus markerekkel értékelve személyre szabott terápiás lehetőséget nyújtanak [2].

Az utóbbi évek irodalmában egyre nagyobb szerephez jut azon új biomarkerek vizsgálata, amelyek a daganat metasztatizisképző hajlamát jellemzik.

A ciklo-oxigenáz - 2 (COX-2) fontos szerepet játszik a prosztaglandinok szintézisében, és a termelődését nagymértékben befolyásolja a daganatos sejtek növekedési tendenciája, a sejtek növekedésében és differenciálódási irányában szerepet játszó gén, ezért a COX-2 egy meghatározó szerepet tölt be a tumorgenézisben [3].

A matrix – metallo – proteináz - 9 (MMP-9) fiziológiai körülmények között az endometrium stróma sejtjeiben is termelődik, miáltal feltehetően szerepet játszik a strómareakció kialakításában és az érinvázió egyik végrehajtó molekulája. Számos irodalmi adat bizonyítja az MMP-9 tumorgenézisben és angiogenézisben betöltött szerepét, azáltal, hogy befolyásolja a tumor növekedését és terjedését és elősegíti az epitheliális sejtek progenitor őssejtjeinek beépülését a tumor érhalózatába [4].

A von Willebrand factor (VWF) egy plazma fehérje, amelynek a véralvadásban és gyulladásban betöltött szerepét jól feltérképezett mechanizmusok bizonyítják [5]. A VWF-ről feltételezik, hogy szerepet játszik a tumor terjedésében, és a metasztatizis kialakulásában azáltal, hogy a daganatsejtek kapcsolatba lépve a véralvási kaskád faktoraival, elősegítik a trombociták extravazációját és behatolását a daganat körüli szövetekbe, megkönnyítve a daganatsejtek kilépését a daganat kötélkéből [5].

Az irodalmi adatok ismeretében a COX-2 és MMP-9 koexpressziójára fókuszáltunk, arra keresve a választ, hogy a két protein expressziójának a mértéke különbözik-e az endometrium carcinoma különböző szöveti típusaiban és összefügg-e a daganat differenciáltsági fokával. A VWF expresszióját vizsgálva a faktor és a daganatsejtek kölcsönhatását kerestük a daganatsejtek és a daganatos stróma szintjén.

Anyag és módszer

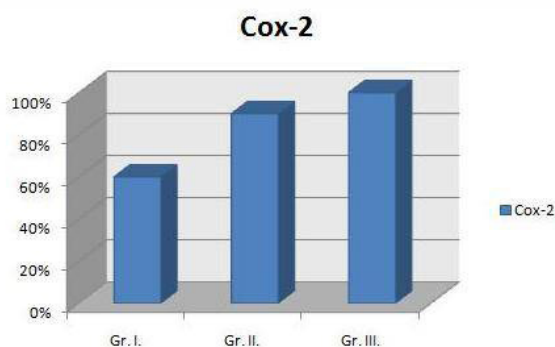
37 méhüri kaparékból különböző szöveti típusú carcinomának diagnosztizált és klinikailag dokumentált daganat esetében vizsgáltuk a COX-2, MMP-9 és VWF expressziót. A szöveti típus gyakoriságát és prognosztikai jelentőségét figyelembe véve 23 endometrioid (10 GI, 9 GII, 4 GIII), 7 mucinózus és 7 szerózus endometriális adenocarcinomát vizsgáltunk.

Az antigének immunhisztokémiai kimutatását a formalinban fixált, paraffinba ágyazott tumormintákból 5 µm vastag metszeteken végeztük el, a metszetek megfelelő előkészítése után. Az antigén feltárást követően (nedves hővel és nyomás alatt, 1mM citrát pufferben (pH:6 és pH:9) az antigének azonosítását 30 perces inkubálással a COX-2 (Dako, klón CX-294, hígítás 1:100), MMP9 (Novocastra, klón 15W2, hígítás 1:40) és VWF (Novocastra, klón 36B11, hígítás 1:200) primér antitestekkel végeztük a protokollban jelölt hígításban. Másodlagos antitestként UltraVision LP Large Volume HRP Polymer Detection System (Lab Vision) használtunk. A reakciótermékeket DAB (diaminobenzidin) kromogénnel vizualizáltuk. A lokalizáció meghatározására hematoxinin háttérfestést alkalmaztunk. Az antitestek specificitását pozitív és negatív kontrollokkal ellenőriztük.

Az eredményeket a biomarkerek expressziójának intenzitása és a lokalizáció függvényében minőségileg és mennyiségileg értékeltük. Fokálisnak tekintettük a daganatsejtek kevesebb mint 10 %-át jelölő reakciót, míg a daganatsejtek több mint 50 %-át jelölő diffúz expresszióként értékeltük. A reakciók kvantifikálását egymástól függetlenül két patológus végezte a sejtstruktúrákhoz kötött lokalizáció (mag/citoplazma/membrán) függvényében.

Eredmények

Az endometrioid adenocarcinoma esetén a COX-2 expresszió jól tükrözi a daganat differenciáltsági fokát (**1. ábra**), a daganatsejtek erős, citoplazmatikus és membránfestődést mutatnak, melynek intenzitása a daganat grádusának emelkedésével fokozódik (**2.a ábra**), az expresszió csökkent a gyengén differenciált daganatokban. Mucinózus adenocarcinomában a reakció diffúz és erőteljes, citoplazmára lokalizálódik (**2.c ábra**). Ezzel szemben a szerózus típusban fokális és erőteljes az expresszió, citoplazmatikus megjelenéssel (**2.b ábra**).



1. ábra. COX-2 expresszió különböző differenciáltsági fokú endometrioid típusú endometriális carcinómában.

Az MMP-9 expresszió az endometrioid adeno-carcinoma mindhárom differenciálódási fokaiban egyenlő arányban oszlik el. A reakció főleg a citoplazmában van jelen, néhol a magban is előfordul. A mucinózus adenocarcinómában diffúz, de gyenge expressziót mutat citoplazmatikus festődéssel, egyes helyeken a magban is fellelhető. A szerózus típusban nem specifikus, magra lokalizálódó reakció jellemző.

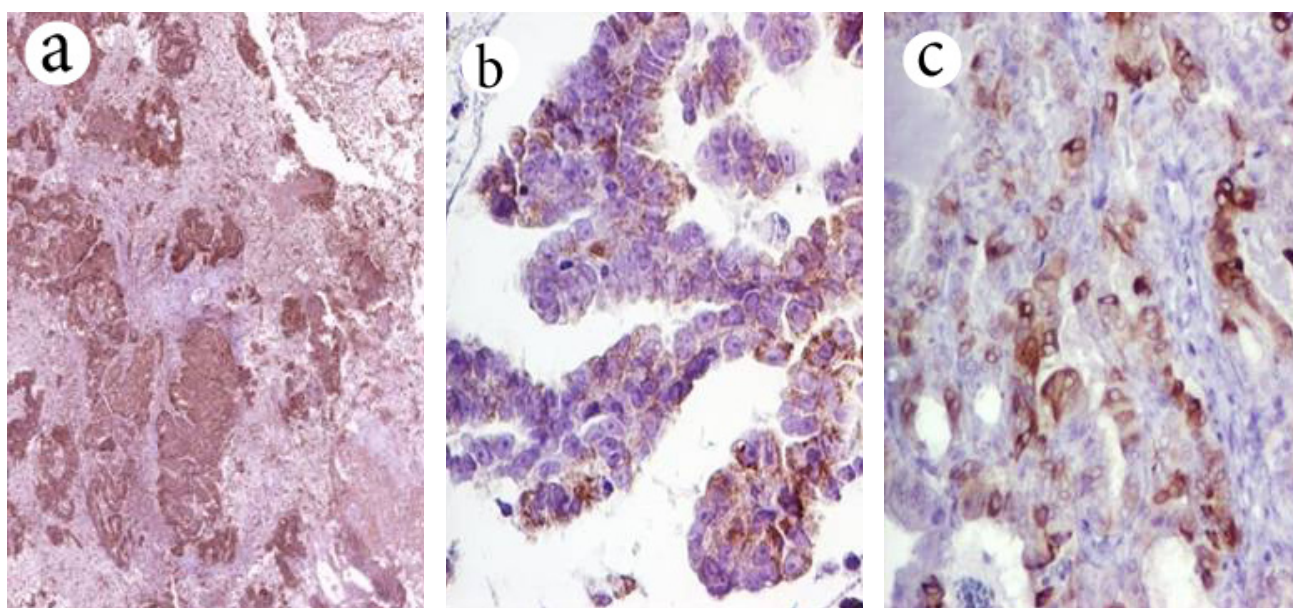
A VWF expresszió mindhárom szöveti altípusban csupán az endothélre lokalizálódik, a daganatsejtek és a stróma szintjén immunhisztokémiai módszerrel a fehérjét nem sikerült vizualizálni. Az antitest erőteljes érproliferációt jelöl a szerózus (**3.a ábra**) és mucinózus (**3.b ábra**) szövettani típusban, kevésbé az endometrioid típusú carcinoma mindhárom differenciáltsági típusában.

Megbeszélés

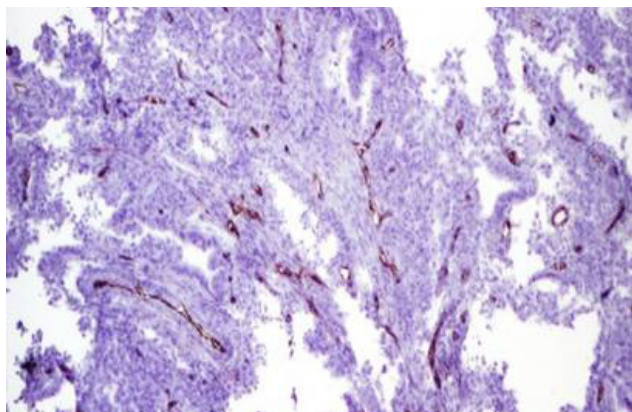
A COX-2 (döntően a képződő PGE₂ révén) a multifaktoriális carcinogenesis folyamatát számos helyen befolyásolhatja, szerepet játszik a daganatos progresszióban, az apoptózis rezisztenciában, az angiogenezisben valamint a tumorinvázióban és a metasztázisképzésben.

Az eredményeink azt mutatják, hogy a COX-2 expresszió növekvő tendenciát mutat az endometrioid adenocarcinoma differenciálódási fokával, minél kevésbé differenciáltak a daganatos sejtek, annál erőteljesebb a reakció intenzitása. Az irodalmi adatoktól eltérően ennek az antigénnek az expressziója a membránt is érintette a citoplazmatikus megjelenéssel párhuzamosan [3]. A membránhoz való kötődését azzal magyarázzuk, hogy a normál sejtekben a COX-2 a sejtmembrán két oldalán, illetve az endoplazmatikus retikulum felőli oldalon helyezkedik el, ami arra enged következtetni, hogy az expresszió lokalizációjának a változása a sejten belül a sejt daganatos átalakulásával, illetve ennek differenciáltsági fokával hozható összefüggésbe. Mucinózus és szerózus adenocarcinómában erőteljes, csak a citoplazmára lokalizálódó antigénexpresszió figyelhető meg, azzal az eltéréssel, hogy a mucinózus típusban a reakció diffúz, míg a szerózusban fókális.

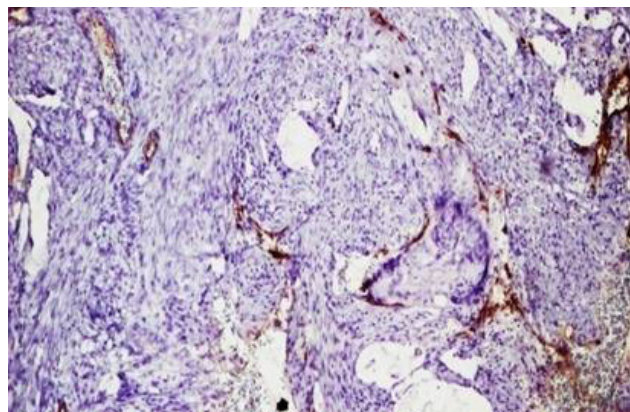
Az irodalmi adatok szerteágazóak a COX-2 expresszióját illetően. Ismert tény, hogy perimenopauzában az egész-



2. ábra. COX-2 expresszió (DAB kromogén): a. endometrioid típusú adenocarcinómában (diffúz, 10X), b. serosus adenocarcinómában (gócós, 20X), c. mucinosus adenocarcinómában (diffúz, 20X)



3. ábra a. VWF expresszió, mint az angiogenezis markere (DAB kromogén): serosus adenocarcinómában (10X).



3. ábra b. VWF expresszió, mint az angiogenezis markere (DAB kromogén): mucinosus adenocarcinómában (20X).

séges endometrium is enyhén expresszálja az epithelium felszínén függetlenül a menstruációs ciklus fázisától. Az endometrium hiperplázia és az endometriális carcinoma szövettani kiértékelése során bebizonyosodott, hogy hiperpláziában is megjelenik a COX-2 expresszió. Ezzel ellentétben nem találtak jelentős különbséget a hisztológiai grádust és a rák stádiumát illetően [6].

Más szerzők [7] szerint a COX-2 expresszió korrelál egy magasabb hisztológiai grádussal és egy mély miometriális invázióval, de nem függ össze a nyirokcsomókba történő áttétképző hajlammal, és a daganat ösztrogén-és progeszteron receptor státuszával [3,7].

Az MMP-9 expresszió az endometrioid adenocarcinoma mindhárom (GI-GIII) differenciálódási altípusában nagymértékben jelen van és egyenlő arányban oszlik el. Míg a mucinózus típusban egy diffúz, de gyenge expressziót mutat, nagyrészt a citoplazmára lokalizálódva, addig a szerózus adenocarcinómában nukleáris expressziót mutat, de fokálisan a citoplazmában is megtalálható.

Néhány tanulmányban megfigyelték, hogy rosszindulatú daganatokban az MMP-9 nem feltétlenül csak a daganatos sejtekben expresszálódik, hanem a stroma sejtekben is fellelhető például a fibroblasztokban, így feltételezhető, hogy a stroma sejtei által szekretált MMP-9 részt vesz az angiogenezisben és az alaphártya lebontásában, elősegítve a daganat növekedését és terjedését [8].

Az sem kizárt, hogy a daganatos sejtek aktiválják az MMP-9 biomarkert a stroma sejtekből az invázió megkönnyítésére [9].

Az endotélsejtek és a trombociták által termelt VWF a cancerogenezis célpontjába került azáltal, hogy bebizonyosodott, hogy a daganatsejtek a véralvadási kaskád faktoraival és a trombocitákkal való interakciója angiogenezist

indukál, és elősegíti a szolid tumorok terjedését illetve növeli az áttétképzési hajlamot. Az általunk használt antitesttel és a módszerrel nem sikerült vizualizálnunk az antigént sem a daganatsejtekben, sem az őket körülvevő stroma sejteiben, ellenben erőteljesen jelölve az endotélsejteket, az angiogenezis mértékét lazább vagy sűrűbb háló formájában jelölte a daganat differenciáltsági fokának függvényében. Annak ellenére, hogy az angiogenezist morfológiai módszerekkel nem kvantifikáltuk (nem képezve a kutatásunk tárgyát), meg kell említenünk, hogy az immunhisztokémiai szöveti értékelés során fokozott angiogenezist találtunk a gyengén differenciált daganatokban (endometrioid típusú carcinoma GIII és szerózus carcinoma).

Egyes szerzők a VWF-t az angiogenezis negatív modulátorának tekintik, a proapoptotikus tulajdonsága révén csökkentve a metasztázisok számát a programozott sejthalál beindításával. Ezt az észrevételt VWF hiányos ereken kísérletezve be is bizonyították [5].

Következtetések

A COX-2 a multifaktoriális carcinogenesis mechanizmusát számos ponton befolyásolhatja, szerepet játszik a daganatos progresszióban, az apoptózis gátlásában, az angiogenezisben valamint a tumorinvázióban és a metasztázisképzésben.

Az expresszió lokalizációjának a változása a sejten belül a prognosztikus jelentőséggel bíró különböző szöveti típusokban daganat differenciáltsági fokával hozható összefüggésbe. Koexpressziója az MMP-9-el növeli a daganatok inváziókészségét, kimutatásuk a tumorszövetben prognosztikus jelentőségű.

A VWF megbízható markere az angiogenezisnek, mely fokozottnak bizonyult szerózus adenocarcinómában a mucinózus és endometrioid szöveti altípusokhoz viszonyítva.

A szelektív COX-2 gátlók alkalmazása a kemoterápiás kezelés hatékonyságának a fokozására az individualizált terápia részét képezheti az angiogenezis ellen irányuló terápiával társítva az endometriális carcinomák különböző szöveti altípusaiban.

Irodalom

1. Tamara L.C., Aaron B.C. - Blueprints Obstetrics And Gynecology, Lippincott Williams & Wilkins, USA, Kansas City, 2008, 458-467.
2. Jonathan S.B. - Berek & Novak's Gynecology, Fouteenth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, USA, Philadelphia, 2007, 1343-1401.
3. Jeffrey M.F., Nilsa R., David E.C. et al. - Correlation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and aromatase expression in human endometrial cancer: Tissue microarray analysis, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2005, 192: 1262-73.
4. Diego S., Giovanni Francesco F. et al. - Human matrix metalloproteinases: An ubiquitarian class of enzymes involved in several pathological processes, Molecular Aspects of Medicine, 2012, 33: 119-208.
5. Massimo F., Francesco F., Silvia C. et al. - von Willebrand factor and cancer: A renewed interest, Thrombosis Research, 2013, 131: 290-292.
6. Francisco J.O., Lois M.R., Judith S. et al. - Estrogen and progesterone receptors and cyclooxygenase-2 expression in endometrial cancer, endometrial hyperplasia, and normal endometrium, Gynecologic Oncology, 2005, 97: 483 - 488.
7. Gabriella F., Franco O.R., Valerio G. et al. - Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), receptors for estrogen (ER), and progesterone (PR), p53, ki67, and neu protein in endometrial cancer, Gynecologic Oncology, 2005, 98: 383 - 389.
8. Yu W., LiuJinhua, et al. - Expression of MMP9 and CD147 in invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix and their implication, Pathology - Research and Practice, 2009, 205: 709-715.
9. Feng-qiang W., Edgardo V.A. et al. - Lysophosphatidic acid (LPA) effects on endometrial carcinoma in vitro proliferation, invasion, and matrix metalloproteinase activity, Gynecologic Oncology, 2010, 117: 88-95.