

A Lung Rezisztencia Protein (LRP) expressziójának vizsgálata hererákokban

Dr. Sugár János professzor 80. születésnapjára
készített előadás alapján

Mándoky László, Géczi Lajos², Doleschall Zoltán¹, Csuka Orsolya¹,
Bodrogi István², Bak Mihály

Országos Onkológiai Intézet, Cytopathológiai osztály, ¹Pathogenetikai osztály,
²Kemoterápiás és Klinikai Farmakológiai osztály, Budapest

A germinális sejtes hererákok kemoterápiával jól gyógyíthatók, mert kb. 80%-os remisszió érhető el. Ennek ellenére a daganat kemorezisztenciája (DR) miatt a betegek 15–20%-a meghal. A multidrug-rezisztencia (MDR) fenotípus számos mechanizmusa ismert, amelybe az MDR/P-glycoprotein (P-gp), továbbá az ún. multidrug-rezisztencia protein (MRP) tartozik. A Lung Rezisztencia Protein (LRP) ATP-hez kötött kazetta (ABC) transzporter fehérje, amely az MDR-hez kapcsolódik. Jelen munkánkban hererákokban az LRP expresszióját tanulmányoztuk, amelyet immunhisztokémiai (IH), Western blot (WB) és RT-PCR eljárásokkal, a klinikai rezisztenciát pedig a klinikai onkológia szabályai alapján határoztuk meg. 70 primer testicularis tumor IH vizsgálata során 29 (41%), a WB módszerrel 35 esetből 22-ben (63%) emelkedett LRP-szintet állapítottunk meg. Ez utóbbi 60%-ban az LRP mRNS-szint is emelkedett expressziót mutatott. A 15 seminomából 6, az 55 non-seminomából (NSGCT) pedig 23 bizonyult pozitívnak. Az LRP-expresszió és a hererákos betegek stádiummegoszlása között nem volt összefüggés. A seminoma csoportban mind a 15 beteg kemoszenzitívnek bizonyult annak ellenére, hogy 6 tumorminta LRP-pozitív volt. A 39 kemoszenzitív NSGCT csoportba tartozó tumoros beteg közül 27 volt LRP-negatív, ezzel szemben a kemorezisztens csoportba tartozó 16 beteg 11 tumormintája bizonyult LRP-pozitívnak ($p=0,04$). Megállapítottuk, hogy az LRP jelenléte a NSGCT-ban a klinikai kemorezisztenciával függ össze, és ebben a rosszindulatú daganatban a klinikai gyógyszer-rezisztencia újabb mechanizmusát képezheti. *Magyar Onkológia*, 46:339–345, 2002

Germ cell testicular cancers are well-curable neoplasms, because total remission can be achieved in about 80% of the cases. However, 15–20% of the patients die due to drug resistance (DR). A number of mechanisms of the multidrug resistance phenotype are known, including MDR/P-glycoprotein (P-gp) and the so-called multidrug resistance associated protein (MRP). Lung Resistance Protein (LRP) is an ATP dependent membrane transporter protein associated with MDR. In our present work we studied the expression of LRP in testicular cancers. LRP expression was determined by immunohistochemistry (IH), Western blot (WB) and RT-PCR techniques. Clinical resistance was defined in accordance with the clinical oncologic rules. In 29 (41%) of 70 primary testicular tumours and in 22 (63%) of 35 cases, elevated LRP levels were established by IH and WB, respectively. In the latter 63%, the LRP mRNA levels were elevated as well. Six cases of the 15 seminomas and 23 cases of the non-seminomatous germ cell tumours (NSGCT) proved to be positive. No relationship was demonstrated between LRP expression and the stage of the disease. Despite the LRP positivity of 6 tumour samples, all of the seminomas proved sensitive. Of the 39 sensitive NSGCT, 27 cases were LRP-negative, whereas 11 tumour samples of 16 patients belonging to the resistant group proved LRP-positive ($p=0.04$). The authors concluded that the expression of LRP is responsible for clinical drug resistance in non-seminomatous testicular cancer patients. *Mándoky L, Géczi L, Doleshall Z, Csuka O, Bodrogi I, Bak M. Lung Resistance Protein analysis in testicular cancer. Hungarian Oncology 46:339–345, 2002*



Közlésre érkezett: 2002. augusztus 1.
Elfogadva: 2002. november 5.

Levelezési cím: Prof. Dr. Bak Mihály,
Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth Gy. u. 7-9. Telefon: 224-8780, Fax: 224-8620, E-mail: bak@oncol.hu

Bevezetés

A heretumorok a férfiakban előforduló összes rosszindulatú daganat 1–2%-át teszik ki. A testisrákok több mint 95%-a germinális sejt kiindulású, és kétharmaduk nem-seminoma típusú daganat (NSGCT). A germinális sejtes hererákok kemoterápiával jól gyógyíthatók, mert metasztázisú esetekben is a Cisplatinra alapozott kombinált kemoterápiás kezeléssel kb. 80%-ban remisszió érhető el. Ennek ellenére a betegek 15–20%-a elsősorban a daganat kemorezisztenciája miatt meghal (28). A drugrezisztencia (DR) a rosszindulatú daganatos betegségek eredménytelen kezelésének egyik leggyakoribb oka. Ma már nyilvánvaló, hogy a DR oka multifaktoriális és heterogén (25).

A multidrug-rezisztencia (MDR) fenotípus számos mechanizmusa ismert, amely leukémiák illetve solid daganatok eredménytelen kemoterápiáját okozhatja (1, 9, 16, 20).

Az MDR1/P-glycoprotein (P-gp) expresszióját hererákokban 41%-ban mutattuk ki. A P-glycoprotein-expresszió incidenciája szignifikánsan ($p=0,0000$) gyakrabban fordult elő az előrehaladott (II/B-III), mint a korai (I, II A) stádiumú betegekben. Megállapítottuk továbbá, hogy a P-gp pozitív esetekben a klinikai kemorezisztencia gyakrabban jelent meg, bár ez utóbbi nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,16$) (4).

A multidrug-rezisztencia protein (MRP1) egy másik fontos faktor, amely a kemorezisztencia-kutatásokban ismeretes. Az MRP is az ATP-t kötő membrántranszporter protein család tagja, és kis fokú homológiát mutat a P-gp fehérjével (2). A korábbi, MRP-vel foglalkozó tanulmányunkban ezen fehérjét az ép és daganatos hereszövetben egyaránt kimutattuk, vagyis nem bizonyult tumormarkernek, hanem inkább az ép és daganatos here funkcionális fehérjéjének (6). Az MRP-expresszió más tumorokban sem mutatott összefüggést a klinikai kemorezisztenciával (18).

Az LRP egy harmadik, az ATP-hez kötött zsetta (ABC) transzporter protein, amely az MDR-hez kapcsolódik. Az LRP felfedezése tüdőrák sejtvonalak MDR-rezisztencia vizsgálata során történt, amely nem mutatott a P-gp-vel összefüggést (23), de ún. major vault protein (p110) jellegű volt (22). A vault jelentése komplex ribonuclein protein részecske, amely számos minor vault proteint, illetve RNS-t tartalmaz, és főleg a sejtek citoplazmájában, kisebb mértékben a magmembránban lokalizálódik. Az LRP-ről feltételezik, hogy az idegen anyagok intracelluláris, valamint nukleocitoplazmatikus transzportjáért felelős (3, 15, 23).

Az LRP-vel kapcsolatos eddigi tanulmányok megállapították, hogy ovariumrákokban (13), valamint diffúz nagy B-sejtes lymphomákban (10) fontos kemorezisztencia-markernak bizonyult. Ezzel szemben az LRP gyakran expresszálódik emlőrákokban, de ebben a klinikailag fontos tumorban nem bizonyult prognosztikai jelentőségűnek (21).

A germinális sejtes hererákokban az LRP-expresszió és ennek klinikai vonatkozása nem ismert. Jelen dolgozatunkban az LRP expresszióját

hererákokban tanulmányoztuk. Választ kerestünk továbbá arra a kérdésre, hogy az LRP jelenlétének a hererákok kemorezisztenciájában és a betegek túlélésében van-e szerepe.

Betegek és módszerek

Betegek

A daganatos szövetek 70 beteg semicastratiójából származtak, és a műtét előtt radio- vagy kemoterápia nem történt. A reszekált tumorszövetet folyékony nitrogénben lehűtöttük, és a vizsgálatig -80°C -on raktároztuk, vagy pufferolt 4%-os formalinban fixáltuk és paraffinba ágyaztuk be. A kórszövetetani vizsgálatok hematoxin-eozinnal festett metszeteken történtek. A daganatok kórszövetetani osztályozását a WHO kritériumai alapján végeztük (17). Ezek szerint 15 seminoma (SGCTT) és 55 non-seminoma típusú (NSGCTT) tumort vizsgáltunk. Ez utóbbiban 11 embryonális carcinoma (EC), 11 differenciált teratoma (T), 1 choriocarcinoma (CC) volt a diagnózis. A fennmaradó 32 betegnek ún. vegyes tumora volt. A klinikai stádiumbeosztás a fizikális vizsgálat, a vérkép, laborvizsgálat; a szérumbéta-choriagonadotropin hormon (β -HCG), az alfa-fetoprotein (AFP) (14), mellkasröntgen, hasi ultrahang, és komputertomográf (CT) rutinvizsgálata alapján történt. Agyi vagy egyéb szervi CT- vagy MRI-vizsgálatok egyéni indokok alapján történtek. A daganatos betegek stádiumbesorolását a UICC klasszifikáció (26) alapján végeztük. 37 beteg korai stádiumba (I, II A), 28 beteg pedig ún. előrehaladott stádiumba (II/B, II/C, III) tartozott. A hererákos betegek kemoterápiás kezelését az EORTC és a terápiára adott válaszreakcióját, vagyis a gyógykezelések hatékonyságát a WHO ide vonatkozó előírásai szerint értékeltük.

Röviden, klinikailag megítélhető kis tumortömeg esetében VPB kezelést adtunk (Vinblastin $6,0\text{ mg/m}^2$ 1–2. nap iv., Cisplatin $20,0\text{ mg/m}^2$ 1–5. nap iv. infúzió, Bleomycin $30,0\text{ mg}$, 16. nap im.).

Klinikailag megítélhető kiterjedt tumortömeg esetén BEP kezelés történt (Bleomycin 30 mg/m^2 9. nap im., Etoposid 100 mg/m^2 1–5. nap iv. infúzió, Cisplatin 20 mg/m^2 1–5. nap iv. infúzió).

Másod-, ill. harmadlagos kezeléseket VIP kúrával végeztünk (Etoposid (Vepesid) 100 mg/m^2 1–5. nap iv. infúzió, Ifosfamid 40 mg/ttkg 1–5. nap iv. infúzió, Cisplatin 20 mg/m^2 1–5. nap iv. infúzió).

NED (no evidence of the disease): A kezelés előtt nem szükséges, hogy mérhető vagy kimutatható daganat vagy áttét legyen. Pl. az I/A, ill. I/B stádiumoknál castratio után, 2, 3 vagy 5 év múlva megadjuk a NED-et, ami azt jelenti, hogy nincs és nem is volt kimutatható daganata. A NED magába foglalja azokat a CR-ba került betegeket is, akiknek a fenti időpontban a tumora nem újult ki.

CR (complete remission): A kezelés előtt mindig kimutatható élő daganatszövet. Minden daganatos góc teljes regressziója és a biológiai marker normalizálódása legalább 1 hónapig.

PR (partial remission): A mérhető daganat 50%-nál nagyobb mértékű csökkenése és ezzel egyidejűleg a biológiai markerek hasonló, jelentős csökkenése legalább 1 hónapig.

MR (minor response): 25-50%-os tumorredukció legalább 1 hónapig.

SD (stable disease): Nincs objektív daganatredukció, vagy 25%-ot meghaladó daganattömeg-növekedés.

PD (progressive disease), NR (no response): 25%-nál nagyobb a mérhető daganattömeg-növekedés vagy új daganatos góc keletkezése, nagyfokú általános állapotromlás és jelentős biológiai markerszint-növekedés.

LRP protein immunhisztokémiai (IH) meghatározása

Az IH vizsgálatok módszerét korábbi publikációinkban leírtak szerint végeztük (5). Röviden, a 4 µm, formalinban fixált, paraffinba ágyazott metszeteket xyloban deparaffináltuk, csökkenő koncentrációjú ethanolban rehidráltuk, és Tris pufferben tartottuk (0,05 M Tris/HCL, pH 7,6, 0,15 M NaCl) (TBS). Ezt követően citrát-pufferben (10 mM, pH 6,0) 2x5 perc mikrohullámú besugárzással antigénfeltáró eljárást alkalmaztunk. Szobahőmérsékletre történő lehűtés után a metszeteket 1% borjú szérumalbumint tartalmazó TBS-ben inkubáltuk. A preparátumokat primer egér anti-humán LRP monoklonális antitesttel (clone LRP-56, Calbiochem, CA, USA) 1:25 hígításban 4°C-on, egy éjszakán át kezeltük. Második lépésként TBS-ben történő mosás után a metszeteket 30 percig biotinilált anti-egér másodlagos antitesttel (Amersham, Little Chalfont, UK) 1:50 hígításban inkubáltuk. A harmadik lépés Streptavidin-alkalikus foszfatáz komplexszel (DAKO, Glostrup, Denmark) 20 percig történő kezelésből állt. Mosás után az antigén vizuálizálása új fuxin szubsztattal történt, majd Mayer hematoxilinnel enyhe magfestést végeztünk. Pozitív kontrollként humán mellékvese, vastagbél és az általunk szelektált colon carcinoma multidrug-rezisztens sejtvonala (Colon 320) szolgált. Negatív kontroll során az LRP monoklonális antitest helyett normál egérsavót használtunk. Minden tumorból 4 metszetet vizsgáltunk, hogy az immunfestés reprodukálhatóságát biztosítsuk.

Az LRP-immunreaktivitás megállapítása

Az LRP-immunreaktivitás vizsgálatát egymástól függetlenül, a klinikum ismerete nélkül 2 vizsgáló végezte (B.M. és M.L.). Pozitívnak tekintettük azokat a tumorokat, amelyekben a citoplazmában és a membránon a tumorsejtek 10%-ánál ki-terjedtebb festődést észleltünk (13).

Western blot analízis

A 35 daganatos és 8 ép hereszövet-mintát Ripa pufferben oldottuk, és 12000 g-n centrifugával tisztítottuk. A sejtmembrán- és a citoplazma-extraktumokat denaturáltuk, fehérjetartalmukat meghatároztuk és 7,5–12,5% SDS-PAGE gélen

futtattuk, majd Immobilon P membránra (Sigma) átvittük. Az LRP-expressziót az immunhisztokémiai vizsgálat során is alkalmazott antitesttel (clone LRP-56, Calbiochem) mutattuk ki, amelynek vizualizálása BCIP-NBT szubsztattrendszerrel történt. Az optimális jelmérést a BioScan 1,1 software segítségével határoztuk meg (8).

RT-PCR vizsgálatok

A teljes RNS-t a Trizol reagens (Sigma) segítségével nyertük ki, DEPC-kezelt vízben oldottuk, megmértük, a tisztaságát UV-spektrofotométerrel megállapítottuk, és -80°C-on tároltuk.

Az LRP reverz transzkriptáz polimeráz láncreakcióval történő kimutatásához az alábbi primereket használtuk: sense 5'-ttc-ttg-att-tgg-tgg-acg-c-3', antisense 5'-act-tct-ctc-cct-tga-cca-c-3'. A GAPDH RT-PCR-rel történő kimutatáshoz az alábbi primereket használtuk: sense 5'-aag-gct-ggg-gct-cat-ttg-cag-3', antisense 5'-cca-aat-tcg-ttg-tca-tac-cag-g-3' (12).

Statisztikai módszerek

A statisztikai analízisre a Fisher-féle tesztet alkalmaztuk, amely az LRP-expresszió, a hisztológiai szubtypus, a metasztatikus készség, a klinikai stádium és a klinikai rezisztencia közötti összefüggést vizsgálta. Az eseteket két-két csoportra osztottuk: seminoma vs. non-seminoma; nincs metasztázis vs. metasztatikus tumor; korai stádiumú csoport I-II/A vs. előrehaladott stádiumú csoport II/B-II/C-III. A valószínűség 0,05 értéke statisztikai szignifikanciát jelentett.

Eredmények

Az LRP-expresszió kimutatása immunhisztokémiai módszerrel

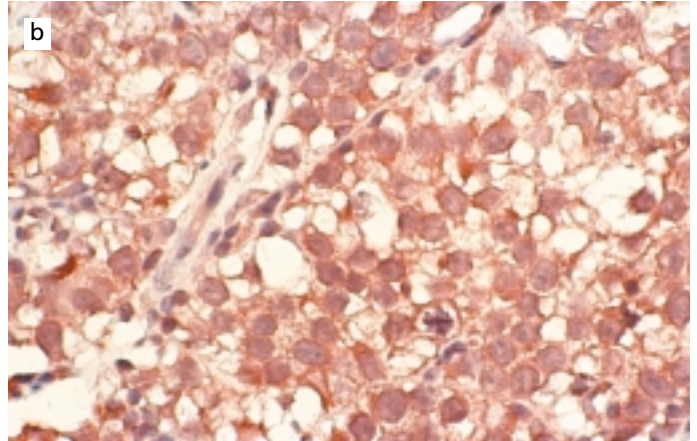
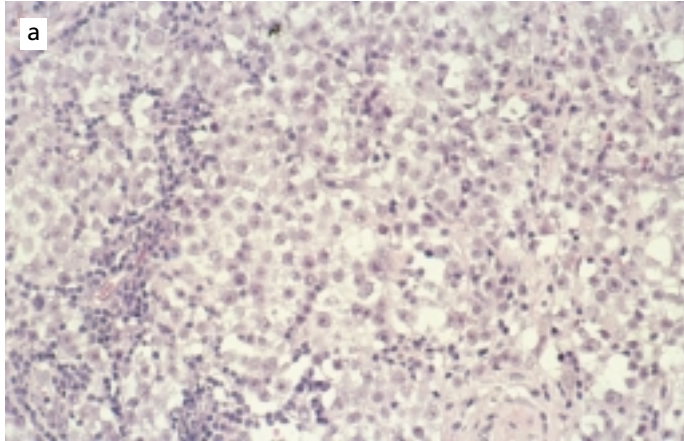
A 70 primer testicularis tumor immunhisztokémiai vizsgálata során 29 (41%) tumorminta pozitív és 41 (59%) negatív festődést mutatott (1. táblázat). Általában a pozitív festési reakció a tumorsejtek citoplazmájában és a membránon mutatkozott. A 15 SGCT-ből 6, és az 55 NSGCT-ből 23 bizonyult pozitívnak. Az NSGCT csoporton belül 8 differenciált teratoma (T), 2 embryonalis carcinoma (EC) és a 32 vegyes tumor közül 13 teratoma komponens mutatott az ép hereszövethez és

1. táblázat.
Összefüggés a kórszöveti típus és az LRP IH expressziója között

Kórszöveti típus	LRP-expresszió (IH)		Összes eset
	+	-	
SGCT			
Seminoma	6	9	15
NSGCT			
Choriocarcinoma	-	1	1
Embryonalis carcinoma	2	9	11
Teratoma	8*	3	11
Vegyes tumor (T komponens)	13*	19	32
Összes	29	41	70

*p=0,02

1. ábra.
TT 157. Seminoma
a. HE-festés
b. pozitív LRP-festődés
a tumorsejtek
membránján és a
citoplazmában (IH)
x125



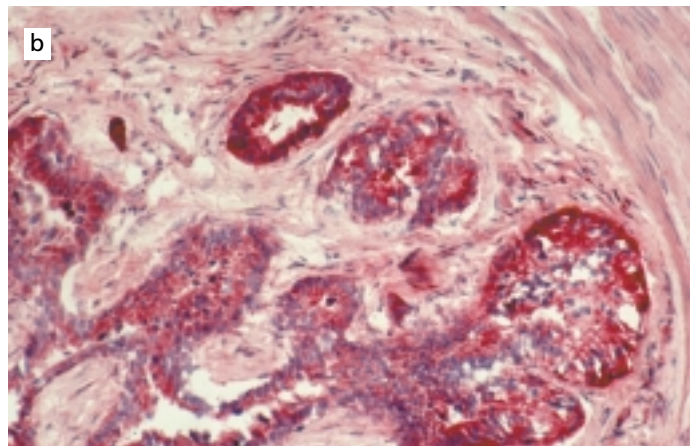
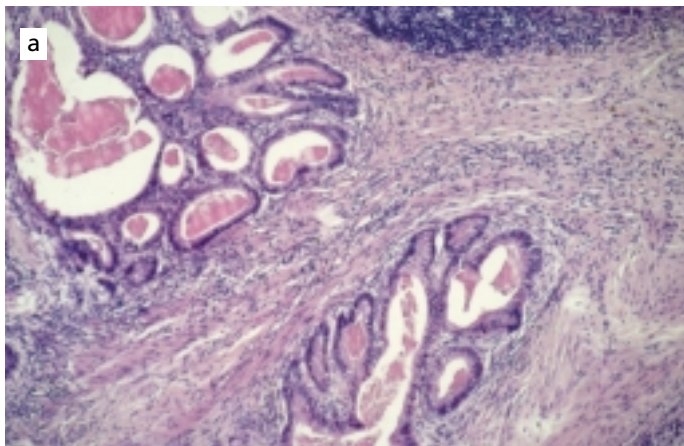
a kontrollokhoz képest pozitív LRP-expressziót ($p=0,02$). A vegyes tumorok közül a teratomák mellett 3 seminoma és 4 embryonalis carcinoma komponens is pozitív volt (1, 2 ábra).

Az LRP-expresszió vizsgálata Western blot módszerrel

A Western blot analízissel megvizsgált 35 dagana-
tos szövetmintából a 110 kD LRP fehérje a nega-

tív kontrollhoz (ép here) képest emelkedett ex-
presszióját 22 (63%) esetben észleltük (2. táblá-
zat, 3. ábra). A Western blot technikával emelke-
dett LRP-expressziót mutatott 22 esetből az im-
munhisztokémiai vizsgálat 17-ben pozitív, 5-ben
negatív eredményt adott. A fenti ellentmondás a
tumorok heterogenitásával és a módszerek szen-
zitivitásának különbségével magyarázható. A
fennmaradó 13 carcinoma mindkét vizsgálómód-
szerrel negatívnak bizonyult.

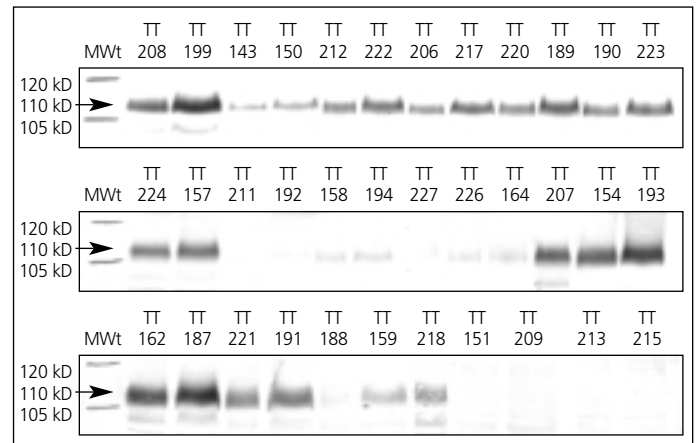
2. ábra. TT 199. Vegyes tumor. Teratocarcinoma. a. HE-festés, b. pozitív LRP-festődés, (IH) x235



2. táblázat. Összefüggés a kórszövettani típus és az LRP Western blot protein analízise között

Kórszövettani típus	LRP-expresszió (WB)		Összes eset
	+	-	
SGCT			
Seminoma	6	5	11
NSGCT			
Embryonalis carcinoma	1	4	5
Teratoma	2	0	2
Vegyes tumor	13	3	16
Egyéb	0	1	1
Összes	22	13	35

3. ábra. WB immunreakciók. A TT 157 (seminoma) és TT 199 (teratocarcinoma) jelzésű tumorok eseteiben pozitív csík látható az LRP-56 monoklonális antitesttel. A TT 188 seminoma mellől származó ép hereszövet a fenti antitesttel nem adott reakciót.



Az LRP mRNS meghatározása RT-PCR módszerrel

Az LRP mRNS expressziója az ép hereszövethez viszonyítva a fent vizsgált 35 tumorszövetben 63%-ban volt kimutatható (4. ábra).

Az LRP-expresszió és a klinikum közötti összefüggés vizsgálata

Az immunhisztokémiai LRP-expresszió és a hererákos betegek stádiuma közötti összefüggést a 3. táblázat mutatja. Ezen vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a GCTT-ban az LRP-expresszió, valamint a klinikai stádiumok (beleértve a korai és késői stádiumokat is) között szignifikáns összefüggés nem volt kimutatható ($p=0,9$; $p=0,22$).

Összefüggés az LRP-expresszió és a klinikai kemorezisztencia között

A seminoma csoportban mind a 15 beteg kemoszénitívnek bizonyult (VPB, BEP) annak ellenére, hogy 6 beteg tumormintájában pozitív LRP-megjelenést észleltünk. A 39 kemoszénitív non-seminoma csoportba tartozó tumoros beteg (VPB, VIP, BEP protokollok) közül 27 volt LRP-negatív, ezzel szemben a kemorezisztens csoportba tartozó 16 beteg 11 tumormintája bizonyult LRP-pozitívnak. Ez utóbbi csoportba tartozó betegek a kemoterápiás kezelésekre nem reagáltak, és 5 beteg időközben elhunyt (4., 5. táblázat). Az immunhisztokémiailag LRP-pozitív és az NSGCT csoportba tartozó kemorezisztens betegek között szignifikáns összefüggést állapítottunk meg ($p=0,04$). A 11 differenciált, érett teratomás beteg közül 8 bizonyult kemorezisztensnek, és az LRP protein is emelkedett volt. Ezen túlmenően érdemes megemlíteni, hogy a fenti 11 beteg közül 9 a IIB és III. stádiumba tartozott.

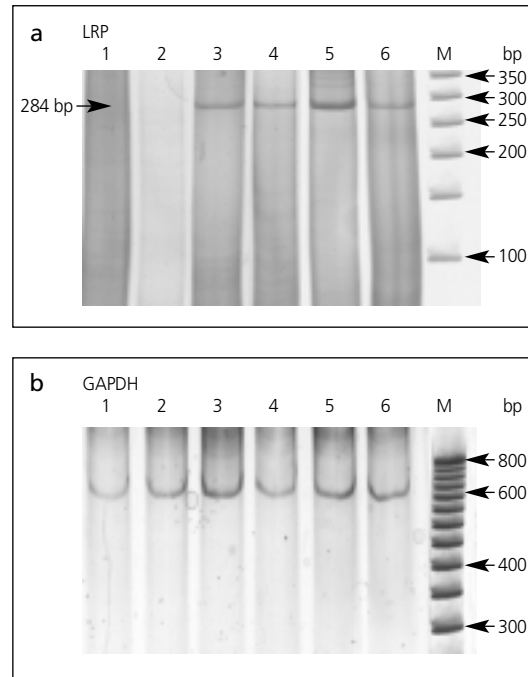
Megbeszélés

A germinális sejtes hererákok incidenciája hazánkban az elmúlt időben emelkedett, jelenleg évente kb. 420 új beteggel számolhatunk. Ezzel szemben a halálozás az 1980-as évek 82 esetéről 2001-re a felére csökkent. A testistumorok egyharmada seminoma, kétharmada nem seminoma típusú daganat. Jól ismert klinikai megfigyelés, hogy a seminoma sugár- és kemoterápiás kezelésre egyaránt érzékeny és prognózisa jobb a non-seminoma típusú heredaganatoknál. Non-seminoma esetén a kemoterápiának és a maradék tumor sebészi eltávolításának van döntő szerepe. Kemoterápia után észlelt maradék tumor eltávolítása az esetek nagy részében a rezisztens sejtek eltávolítását jelenti (11).

Jelen tanulmányunkban hererákos betegek szövetszövetmintáiban különböző módszerekkel az LRP megjelenését vizsgáltuk. Összefüggéseket kerestünk az LRP jelenléte, a kórszöveti típus, a stádium és a klinikai rezisztencia között. LRP-expressziót az újonnan diagnosztizált hererákos betegek 41 %-ában észleltünk, amelyek a 15 semi-

nomából 6, az 55 NSGT-ből pedig 23 esetben mutattak pozitív értéket.

Nem találtunk összefüggést az LRP jelenléte és a hererákos betegek stádiummegoszlása között, beleértve az ún. korai és előrehaladott stádiumokat is ($p=0,90$; $p=0,22$). A differenciált (érett) teratomák, valamint a vegyes tumorok teratoma komponenseiben észlelt pozitív LRP-expresszió az egyéb hererák alcsoportokban való megjelenéshez viszonyítva szignifikáns mérték-



4. ábra.

a. Az LRP gén mRNS-expressziója.
b. GAPDH kontroll 1-es oszlop (TT 188 ép hereszövet) negatív, 2-es oszlop (TT 188 seminoma) negatív, 3-as oszlop (TT 154 CC + EC + T) pozitív, 4-es oszlop (TT 157 seminoma) pozitív, 5-ös oszlop (TT 199 teratocarcinoma) pozitív, 6-os oszlop (TT 224 teratoma, érett) pozitív. M: Marker

3. táblázat. Összefüggés az LRP-expresszió és a klinikai stádiummegoszlás között

Klinikai stádium	LRP-expresszió (IH)		Összes eset
	+	-	
I.	12	19	31
II.	7	9	16
III.	8	10	18
$p=0,90$			
Korai stádiumú csoport IA, B, S, IIA	13	24	37
Késői stádiumú csoport IIB, C, IIIA, B	14	14	28
$p=0,22$			

4. táblázat. Összefüggés az LRP-expresszió és a klinikai rezisztencia között

Kemoterápia eredménye	LRP-expresszió (IH)		Összes eset
	+	-	
Seminoma			
S (szénitív)	6	9	15
R (rezisztens)	-	-	-
NSGST			
S (szénitív)	12	27	39
R (rezisztens)	11	5	16
$p=0,04$			

ben ($p=0,02$) gyakrabban fordult elő. Hasonlóan szignifikáns ($p=0,04$) összefüggést állapítottunk meg az LRP jelenléte és a NSGCT-os betegek klinikai kemorezisztenciája között, mivel ezek a betegek az első kombinált kemoterápiás kezelésre nem reagáltak. Ezen megállapításunk alapján feltehető, hogy az LRP a nem seminoma típusú hererákok bizonyos eseteiben – főleg teratoma komponensek jelenléte esetén – kemorezisztencia-faktor lehet.

Jól ismert az érett teratomáknak vagy a teratoma komponenst is tartalmazó vegyes tumoroknak a klinikumban is megfigyelt relatív kemoterápia-érzékenység, mivel a kemoterápia utáni, a sebészileg eltávolított maradék tumor jelentős részében differenciált, vagy differenciálatlan teratoma elemek találhatók.

Az LRP prediktív, kedvezőtlen prognosztikai szerepét írták le petefészekrákokban (13), diffúz nagy B-sejtes lymphomákban (9) és felnőttkori T-sejtes leukémiákban (19) is. Más szerzők gyomorrákokban a pozitív LRP mRNS-arányt 10%-nak diagnosztizálták és megállapították, hogy az LRP a klinikopatológiai rezisztenciafaktorokkal nem függ össze (7). Hasonló megfigyelésekről számoltak be fejnyci laphámsejtes carcinomás betegek vizsgálata során is (12). Egy másik DR-val foglalkozó tanulmányban, előrehaladott emlőrákos betegekben az LRP fehérje jelenlétét vizsgálták, amelynek emelkedett volta a kemoterápiás kezelések eredményeivel, vagyis a kemorezisztenciával és egyéb prognosztikai faktorokkal nem mutatott összefüggést (24).

Jelen tanulmányunkban a pozitív LRP-értékek és a tiszta seminomás (6 eset) és NSGCT (12

eset) betegek klinikai szenzitivitása között nem találtunk összefüggést. Számos oka lehet annak, hogy az emelkedett LRP-expresszió nincs összefüggésben a daganat kemorezisztenciájával. Például az LRP-expresszió nem függ össze a hererákok biológiai viselkedésével, vagy a kemorezisztenciát más rezisztenciamechanizmus képezi (27). Az eltérés magyarázható még pl. a seminomás betegek viszonylag kisebb számával, korábbi klinikai stádiumával is. Jól ismert, hogy a seminoma később ad haematogen áttétet, sokáig lokálisan nő, majd elsődlegesen lymphogen terjedést mutat.

Az 55 NSGCT-os hererákos beteg közül 39 szenzitívnek, 16 rezisztensnek bizonyult. Ez utóbbi csoportból 5 esetben a pozitív klinikai rezisztencia ellenére IH vizsgálattal az LRP-expresszió negatív volt. E fenti tumorok kórszövet-tanilag az alábbi megoszlást mutatták: CC 1, EC 1, T 2, CC+EC+S+T 1. Az IH-negatív EC a WB módszerrel LRP-expressziót mutatott (TT 150). Az IH-negatív 2 T mindkét esetben érett, elszarusodó laphámmal bélelt cystákat tartalmazott, amelyek LRP-negatívnak bizonyultak.

MDR1/Pgp-expressziót hererákokban az egyik korábbi munkánkban 41%-ban mutattunk ki. A P-gp-pozitív esetek a differenciált teratomákban és a vegyes tumorok teratoma komponenseiben az egyéb szövettani típusokhoz hasonló szignifikáns eltérést mutattak ($p=0,006$). Feltűnt, hogy a P-gp-pozitív esetekben a klinikai rezisztencia gyakrabban jelent meg (5).

Tanulmányainkban az LRP- és P-gp-expresszió összehasonlításakor e két ATP-függő membrántranszporter protein elsősorban differenciált teromás esetekben illetve a vegyes tumorok teratoma komponenseiben egymástól függetlenül megjelenést mutatott. Ez a tény felveti annak lehetőségét, hogy a két membrántranszporter gén és fehérje expressziója germinális hererákokban egyszerre, vagy külön-külön is szerepet játszhat a klinikai kemorezisztencia kialakulásában.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az LRP-expresszió a non-seminoma típusú hererákokban a klinikai kemorezisztenciával összefüggő, és ebben a rosszindulatú daganatban a klinikai drugrezisztencia egyik újabb típusát képezheti.

A jövőben az LRP által létrejött rezisztencia mechanizmusának jobb klinikai megismerésére és felüggesztésére alkalmas kutatások javasolhatók.

Köszönetnyilvánítás

A Szerzők köszönetüket fejezik ki Szabó Judit, Farkas Szilvia, Szőke Gabriella szakasszisztenseknek kifogástalan technikai munkájukért. Köszönettel tartozunk Dr. Köves István osztályvezető sebész tanár úrnak és munkatársainak a semicatratiók elvégzéséért.

A kézirat gépelését Sós Jánosné titkárnő, a mikroszkópos fotók elkészítését Kónya Miklós fényképész mester végezte.

A munka a T-01 573/200. sz. ETT támogatásával készült.

5. táblázat.
Összefüggés
az LRP-expresszió
és a kemorezisztens
NSGCT betegek klinikai
rezisztenciája között

Eset	Szövettani dg.	LRP (IH)		Kezelés	Kezelés eredménye*
		+	-		
1.	T	+		4 VAP	PR, exitus
2.	CC+EC+S+T		-	8 VAP	PR
3.	T	+		2 VAP	MR, exitus
4.	EC	+		6 BEP	PR
5.	T		-	8 BEP	PR
6.	T	+		3 BEP	PR, exitus
7.	T	+		7 BEP	PR
8.	T		-	3 BEP	PR, exitus
9.	CC		-	4 BEP	PR
10.	T	+		4 BEP	PR
11.	S+T	+		5 BEP	PR
12.	EC		-	6 BEP	PR
13.	EC+T	+		6 BEP	PR
14.	S+T	+		6 BEP	PR
15.	T	+		1 BEP	NR, exitus
16.	EC+S	+		4 BEP	PR
Összesen		11	5		

*Az első kombinált kemoterápiás kezelésekre adott terápiás válaszreakció

Irodalom

1. Chan HS, Thorner PS, Haddad G, et al. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol* 8:689-704, 1990
2. Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258:1650-1654, 1992
3. Dalton WS, Scheper RJ. Lung resistance-related protein: Determining its role in multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst* 91:1604-1605, 1999
4. Eid H, Bodrogi I, Csókay B, et al. Multidrug resistance of testis cancers: the study of clinical relevance of P-glycoprotein expression. *Anticancer Res* 16:3447-3452, 1996
5. Eid H, Gulyas M, Géczi L, et al. Expression of bcl-2 in testicular carcinoma correlation with tumour progression and MDR1/Pgp. *Cancer* 83:331-336, 1998
6. Eid H, Mingfang L, Institoris E, et al. MRP expression of testicular cancers and its clinical relevance. *Anticancer Res* 20:4019-4022, 2000
7. Fan K, Fan D, Cheng LF, et al. Expression of multidrug resistance-related markers in gastric cancer. *Anticancer Res* 20:4809-4814, 2000
8. Fazekas K, Csuka O, Köves I, et al. Experimental and clinicopathologic studies on the function of the HGF receptor in human colon cancer metastasis. *Clin Exp Metast* 1:1-11, 2001
9. Filipits M, Suchomel RW, Zöchbauer S, et al. Clinical relevance of drug resistance genes in malignant diseases. *Leukemia* 10(Suppl 3):S10-S17, 1996
10. Filipits M, Jaeger U, Simonitsch I, et al. Clinical relevance of the lung resistance protein in diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res* 6:3417-3423, 2000
11. Géczi L, Biron P, Droz JP. Csírasejt típusú daganatok kezelése a harmadik évezred küszöbén. *Orv Hetil* 142:1673-1679, 2001
12. Hirata S, Katoh O, Oguri T, et al. Expression of drug resistance-related genes in head and neck squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Jpn J Cancer Res* 91:84-90, 2000
13. Izquierdo MA, van der Zee AGJ, Vermorken JB, et al. Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognosis in advanced ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 87:1230-1237, 1995
14. Javadpour N. The role of biologic tumor markers in testicular cancer. *Cancer* 45:1755-1761, 1980
15. Kedersha NL, Rome LH. Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA. *J Cell Biol* 103:699-709, 1986
16. Lai S-L, Goldstein IJ, Gottesman MM, et al. MDR1 gene expression in lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 81:1144-1150, 1989
17. Mostofi FK, Sesterhenn IA, Davis CJ. World health organisation international histological classification of germ-cell tumours of the testis. In: Jones WG, Ward MA and Anderson CK (eds), *Germ-Cell Tumours*, II, 1-23. Pergamon, Oxford, 1986
18. Nooter K, Westerman AM, Flens MJ, et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. *Clin Cancer Res* 1:1301-1310, 1995
19. Ohno N, Tani A, Uozumi K, et al. Expression of functional lung resistance-related protein predicts poor outcome in adult T-cell leukemia. *Blood* 98:1160-1165, 2001
20. Pirker R, Wallner J, Geissler K, et al. MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst* 83:708-712, 1991
21. Pohl G, Filipits M, Suchomel R, et al. Expression of the lung resistance protein (LRP) in primary breast cancer. *Anticancer Res* 19:5051-5056, 1999
22. Scheffer GL, Wingard PLJ, Flens MJ, et al. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nature Med* 1:578-582, 1995
23. Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, et al. Overexpression of a Mr 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res* 53:1475-1479, 1993
24. Schneider J, Lucas R, Sánchez J, et al. Modulation of molecular marker expression by induction chemotherapy in locally advanced breast cancer: Correlation with the response to therapy and the expression of MDR1 and LRP. *Anticancer Res* 20:4373-4378, 2000
25. Teicher BA. *Drug Resistance in Oncology*. Marcel Dekker Inc, New York 1993
26. UICC TNM Classification of Malignant Tumours. Sobin LH, Wittekind C, Willey-Liss, New York 174-179, 1997
27. Volm M. Multidrug resistance and its reversal. *Anticancer Res* 18:2905-2918, 1998
28. Williams DS, Birch R, Einhorn HL, et al. Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N Engl J Med* 316:1453-1440, 1987