

# Tumorsejt-invázió/migráció szerepe kísérletes tüdőmetasztázisok ereződésében

Szabó Vanessza<sup>1</sup>, Bugyik Edina<sup>1,2</sup>, Dezső Katalin<sup>1</sup>, Tóvári József<sup>2,3</sup>, Döme Balázs<sup>2,3,5</sup>, Paku Sándor<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet; <sup>2</sup>Országos Onkológiai Intézet; <sup>3</sup>Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet; <sup>4</sup>MTA-SE Molekuláris Onkológia Kutatócsoport, Budapest; <sup>5</sup>Bécsi Orvostudományi Egyetem, Mellkassebészeti Osztály, Bécs

*Kutatási támogatások:*

A munka témájában folytatott kutatásainkat a KTIA AIK 12-1-2013-0041, OTKA-K109626, OTKA-K108465, OTKA-SNN114490, OTKA-K116151 és OTKA-K116295 számú pályázatokból fedezzük.

*Napjainkban is nagy kihívást jelent a tüdőáttétes betegek kezelése. A terápiák egy lehetséges célpontja a metasztázisok ereződésének gátlása. Vizsgálataink célja az volt, hogy a különböző eredetű tumorok esetében meghatározzuk a kísérletes tüdőmetasztázisok vaszkularizációjának lehetséges mechanizmusait. Öt tumorsejtvonal (HT1080, HT25, B16, C26 és MATB) intravénás oltásával hoztunk létre tüdőáttéteket. Mindegyik sejtvonal ugyanazt a vaszkularizációs formát mutatta. A tumorok a meglévő alveoláris kapillárisok bekebelezésével tettek szert saját érhálózatra. A tumorsejtek inváziójuk/migrációjuk során leválasztották a pneumocitákat a kapillárisokról úgy, hogy az azok között található kettős bazális membránt szétválasztották. A folyamat előrehaladtával a tumor belsejében található, erősen komprimált pneumociták degradálódtak, de a bekebelezett és lecsupaszított erek funkcionálisak maradtak, így képesek maradtak a metasztázis vérellátását biztosítani. Magyar Onkológia 59:319–323, 2015*

**Kulcsszavak:** tüdőmetasztázis, ereződés, érbekebelezés, tumorsejt-migráció

*Treatment of patients with lung metastases remains a major challenge. A possible target for therapies is the inhibition of vascularization of metastases. Our study aimed to determine the possible mechanisms of the experimental lung metastasis vascularisation for tumours of various origins. We created lung metastases by intravenous injection of five tumour cell lines (HT1080, HT25, B16, C26 and MATB). Each cell line showed the same vascularisation type. Tumours gained vasculature by advancing through the alveolar spaces thereby incorporating the pre-existing alveolar capillaries (i.e. vessel co-option). From the alveolar spaces tumours entered into the alveolar walls. The tumour cells during the invasion/migration separated the pneumocytes from the capillaries. During this process the basement membrane was split into an epithelial and an endothelial layer. The heavily compressed pneumocytes inside the tumour became fragmented but the incorporated and stripped vessels remained functional, so they were able to provide blood supply for the metastases.*

Szabó V, Bugyik E, Dezső K, Tóvári J, Döme B, Paku S. Role of tumour cell invasion/migration in the vascularisation of experimental lung metastases. Hungarian Oncology 59:319–323, 2015

**Keywords:** lung metastasis, vascularization, vessel co-option, tumour cell migration

Levelezési cím: Szabó Vanessza, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Angiogenezis munkacsoport, H-1085 Budapest, Üllői út 26. Tel.: +361 459-1500/54428, e-mail: nesszy20@gmail.com

Közlésre érkezett: 2015. szeptember 1. • Elfogadva: 2015. október 10.

## BEVEZETÉS

Számos daganatos betegségben (mell-, vastagbélrák, melanoma, hasnyálmirigy-, vese-, petefészekrák) a halálos végkimenetel fő oka az áttétképzés, ami a rosszindulatú sejtek primer helyről más szervekre történő áttérjedését jelenti. A tüdő is egy olyan szerv, amibe gyakran adnak áttétet más lokalizációjú daganatok (1), az extratorakális tumorok 20–54%-ában mutathatóak ki tüdőáttétek (2–4). Az angiogenezis fogalmán endotélsejt-proliferációval járó érdenzitás-növekedést értünk. Széles körben elfogadott, hogy az angiogenezis fontos szerepet tölt be a primer és metasztatikus tumorok növekedésében (5). A daganatellenes terápiák egy lehetséges célpontja a tumorok ereződésének gátlása. Folkman 1971-ben fogalmazta meg hipotézisét, amely napjainkban is széles körben elfogadott, miszerint a tumorok növekedése angiogenezisfüggő (6). Azonban az a felfedezés, hogy a tumorok angiogenezis nélkül, a meglévő erek bekebelezésével is képesek növekedésre szert tenni állati és humán rendszerekben egyaránt, megmutatta, hogy ez a hipotézis nem minden esetben helytálló. Ezek a megfigyelések új aspektusba helyezik az erek és tumorok közti kölcsönhatásokat, és bizonyítják, hogy léteznek olyan tumorok, melyek angiogenezis nélkül is képesek növekedni, ami megkérdőjelezi az antiangiogén terápiák jelentőségét ezekben az esetekben. Metasztázisok nagy arányban vannak jelen a tüdőben, de eddig nem állt rendelkezésre elég adat arról, hogy a tumorsejtek hogyan lépnek kapcsolatba az ép/normális tüdőszövet ereivel. Korábbi vizsgálataink alapján felmerült, hogy a metastázisok ereződése, a célszervek nagy érdenzitása következtében, másképpen zajlik (7, 8), mint a primer tumoroké (9), ami új terápiák kidolgozását teheti szükségessé. Vizsgálataink célja az volt, hogy a különböző eredetű tumorok esetében meghatározzuk a kísérletes tüdőmetasztázisok vaszkularizációjának lehetséges mechanizmusait.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### Kísérleti állatok és sejtvonalak

A kísérleti állatok tartása és kísérletbe vonása a Semmelweis Egyetem állatvédelmi szabályzata (Állatkísérlet engedély Ikt. sz.: 22.1/1155/3/2010) alapján az állattartási és kísérleti előírások betartása mellett történt. Az állatok a kísérlet során szükségletüknek megfelelően fogyasztottak rágcsálótápot (Charles River) és csapvizet. A kísérleti állatokat állandó hőmérséklet és nedvességtartalom, valamint 12 órás fény/sötét-ség napi váltakozást biztosító feltételek mellett tartottuk.

A kísérletekhez SCID, C57BL/6, Balb/c egér és Fischer 344 patkány beltenyésztett rágcsálótörzseket használtunk. A tüdőmetasztázisokat öt tumorsejtvonal intravénás ol-

tásával hoztuk létre: a HT1080 humán fibroszarkómát, a HT25 humán kolonkarcinómát és a MATB III patkány emlőkarcinómát SCID egerekben és F344 patkányokban, a B16 egér melanómát C56BL/6 egerekben, a C26 egér kolonkarcinómát Balb/c egerekben.

Az exponenciális növekedési fázisban lévő HT25, HT1080, B16, C26, valamint MATB III sejteket *in vitro* tenyésztettük RPMI-1640 médiumban, melyhez 10% FBS-t és gentamicint adtunk. A sejteket T75-ös flaskában, termosztátban 37 °C-on, 5%-os CO<sub>2</sub>-koncentráció mellett tartottuk. A tenyészetben tartott, exponenciális növekedési fázisban lévő sejteket (a MATB III sejtek kivételével) 1× tripszin-EDTA-val 5 percen át 37 °C-on történő inkubálással vittük szuszpenzióba, majd az enzimet 5 ml RPMI-1640 (+10% FBS, + gentamicin) médiummal állítottuk le. Mosást (szérummentes RPMI) követően a sejteket megszámloltuk és lecentrifugáltuk (10 perc, 800 rpm), majd szérummentes RPMI-ben vettük fel a pelletet. Az oltások során tumorsejttípustól függően a következő sejtszámokat használtuk: HT25 10<sup>6</sup>/0,1 ml, B16 10<sup>5</sup>/0,2 ml, C26 5×10<sup>5</sup>/0,1 ml, MATB III 2×10<sup>4</sup>/0,2 ml. Az *in vitro* tenyésztett HT1080 sejtek az állatokba való oltásuk során nem tudtak kolonizálni a tüdőszövetbe, ezért 2×10<sup>6</sup> sejtet fecskendeztünk szubkután a SCID egerekbe, majd 3 héttel az oltást követően a szubkután kinőtt tumorok felapritása és átszűrése után sejtsuszpenziót készítettünk. Az élő HT1080 sejteket leszámolva 0,1 ml térfogatban 2×10<sup>5</sup> sejtet fecskendeztünk a SCID egerek farokvénájába. Az állatokat 4 héttel a HT25, 3 héttel a B16, MATB, HT1080, 2 héttel a C26 sejtek oltását követően öltük le.

### Immunfluoreszcens vizsgálatok

Az állatok tüdejét az eltávolítást követően folyékony nitrogénen hűtött izopentánban lefagyasztottuk. A mintákból 15 µm-es fagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket –20 °C-os hőmérsékletű metanolban fixáltunk. Ezután PBS-es mosást követően a megfelelő primer ellenanyaggal (1. táblázat) történő 1 órás, szobahőmérsékletű inkubáció következett, amit a félórás, Alexa fluor 488 fluorokrómmal jelölt szamar poliklonális másodlagos ellenanyaggal (Life Technologies, 400-szoros hígítás) történő inkubáció köve-

**1. táblázat.** Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt elsődleges ellenanyagok

Ellenanyag	Faj/klonalitás	Gyártó	Kat. szám	Hígítás
BrdU	Egér monoklonális	BD Pharmingen	347580	1:50
CD31	Patkány monoklonális	BD Pharmingen	550275	1:50
Podoplanin	Kecske poliklonális	R&D Systems	AF3244	1:200
Laminin	Nyúl poliklonális	Dako	Z0097	1:200

tett. Végül PBS-es mosás után 10 perces inkubációs idővel magfestést (TOTO-3, Invitrogen, kat. szám: T3604, 500-szoros hígítás) végeztünk a metszeteken. A mintákat konfokális lézer szkennings mikroszkóppal (Bio-Rad MRC-1024) vizsgáltuk.

### Elektronmikroszkópia

A B16 és HT1080 tumoros tüdőminták egy részét elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára készítettük elő. Ennek során az elaltatott állatokat heparinos PBS (10 perc), majd jégen hűtött 2%-os glutáraldehid-tartalmú 0,05 mol/l Na-kakodilat puffer (pH 7,2, 15 perc, 20 °C) oldattal perfundáltuk. A tumort tartalmazó szövetet pengével 1-2 mm<sup>3</sup>-es darabokra vágtuk. A mintákat 2 órán át a fixálóoldatban hagytuk (4 °C), majd PBS-es mosást (éjszakán át) követően 5 mg/ml K-ferrocianidot tartalmazó 1% OsO<sub>4</sub>-oldatban utófixáltuk (2 óra), ezután felszálló acetonsorban víztelenítettük. A beágyazáshoz Spurr-gyantát használtunk. Ezt követően a mintákból félvékony (0,5 µm), majd ultravékony (70–100 nm) metszeteket készítettünk. Az ultravékony metszetek vizsgálata Philips CM10 (Philips Research, Eindhoven, Netherlands) elektronmikroszkóppal történt.

### Peri- és intratumorális endotélsejt-proliferáció meghatározása

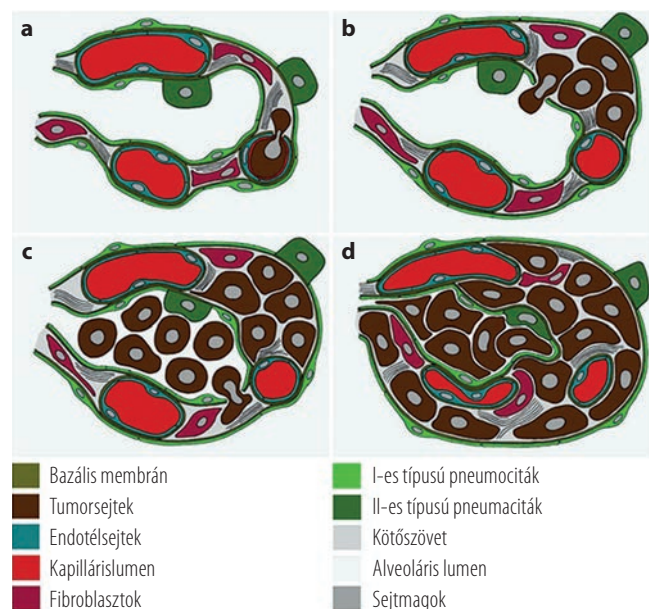
Az endotélsejt-proliferáció mérését (BrdU-inkorporáció) patkány MATB metasztázisokban végeztük, ugyanis e tumorok mérete bizonyosan meghaladta az 1-2 mm átmérőt, amit az angiogenezis megindulásához szükségesnek tartanak (6).

Az állatok a terminálás előtt egy órával 200 mg/kg brómdezoxiuridint (BrdU) kaptak intraperitoneálisan. Különböző módszereket alkalmazva határoztuk meg az intra- és peritumorális endotélsejtek (EC) proliferációs rátáját. Az első esetben a korábban már leírt immunfluoreszcens technikát használtuk. A fagyasztott metszeteket BrdU és laminin ellenanyagokkal inkubáltuk. A tumorban levő, erős lamininjelzéssel körbehatárolt BrdU-pozitív sejteket tekintettük endotélsejteknek. Öt állatból származó 14 metasztázisból 2300 sejtet számoltunk le. Fixálást és mosást követően a mintákat 2 N HCl-ben inkubáltuk 10 percen át szobahőmérsékleten (a DNS-denaturáció az ellenanyag bekötődésének feltétele).

A fagyasztott tüdőmetszeteken a rendkívül sűrű hajszálérhálózat miatt lehetetlen meghatározni a BrdU-pozitív endotélsejtek pontos lokalizációját a peritumorális szövetben, ezért egy másik módszert alkalmaztunk, a tüdőmintákat perfúzióval fixáltuk annak érdekében, hogy a kapillárisok ne essenek össze. Az állatokat ketaminxilazin (80:12 mg/kg dózis, Sigma) intraperitoneális in-

jekciójával altattuk és a bal kamrán keresztül PBS-sel (10 perc), majd 4% PFA-val (pH 7,2, 15 perc) perfundáltuk az állatokat. A tüdőmetasztázisokat eltávolítottuk és 4%-os PFA-ban inkubáltuk (4 °C, 2 óra). Ezután a tüdőt lebenyekre vágtuk és 24 órán át 15% szacharózban, ezt követően újabb 24 órán át 30% szacharózban történő inkubáció következett. A lebenyeket lefagyasztottuk és 30 µm-es fagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket 1%-os collodionnal borított tárgylemezre vettünk fel. A metszeteket száradás után PBS-sel mostuk és 10 percen át 2 N HCl-ben inkubáltuk 20 °C-on. PBS-es mosás után a metszeteket monoklonális anti-BrdU antitesttel (2 óra), majd biotinált anti-egér ellenanyaggal inkubáltuk (2 óra). Kromogénként diaminobenzidint használva az ABC-reakció által színes csapadék keletkezett. A metszeteket ozmifikáltuk (1% OsO<sub>4</sub> PBS-ben), felszálló etanolsorral dehidráltuk és Spurr-gyantával feltöltött kapszulákat helyeztünk rájuk. A kapszulákat metszettel együtt folyékony nitrogénbe merítve távolítottuk el. Beágyazott metszetekből félvékony sorozatmetszeteket készítettünk, hogy meg-

**1. ábra.** a) A vaszkularizáció folyamata. A tumorsejtek extravazálnak az alveolusok interstíciumába. b) A tumorsejtek szaporodásnak indulnak, kisebb kolóniák kialakítása után betörnek az alveolus lumenébe. Ezután a tumorsejtek intenzív szaporodásnak indulnak. c) Később a tumorsejtek ismét belépnek az alveolusfal kötőszövetébe. Ezzel megkezdődik az epitélium leválasztása a kapillárisokról. d) A folyamat során történik meg a bazális membrán szétválása egy alveoláris és egy endoteliális rétegre, melynek eredményeképpen a tumorsejtek által körbezárt és ezzel teljesen lecsupaszított kapillárisok jönnek létre

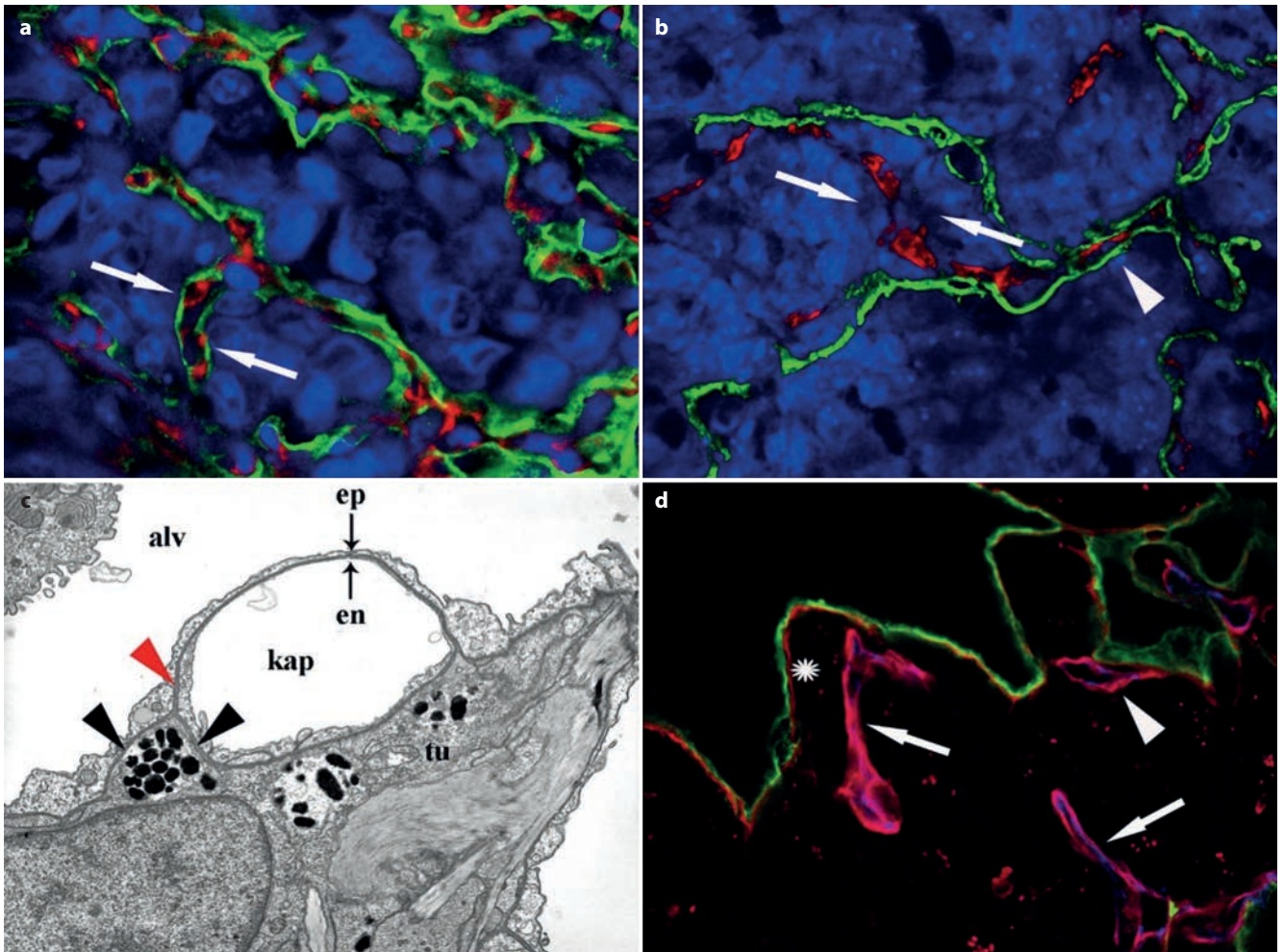


találjuk a reakcióterméket tartalmazó részt. A metszeteket enyhén, 0,5% toluidinkékkel (pH 8,5) festettük. Három állat 6 metasztázisának peritumorális szövetét vizsgáltuk meg. A félvékony metszeteket 100-szoros immerziós objektívvel vizsgáltuk, és a kapillárisok, valamint venulák 329 endotélsejtjét analizáltuk.

## EREDMÉNYEK

Mind az öt sejtvonal esetében a tüdőmetasztázis ugyanazt a vaszkularizációs formát mutatta. A tumorok növekedésének alapvető módja a proliferáló tumorszövet alveolusról alveolusra történő „áramlása” volt, amely folyamat a ko-

**2. ábra.** a) HT1080 metasztázis periferiája. A pneumocitákat podoplanin (zöld), a kapillárisokat CD31 (piros), a tumorsejteket TOTO (kék) festés jelzi. Az alveoláris tereket tumorsejtek töltik ki, de még megtartott a pneumocita-kapillaris-pneumocita szerkezet (nyilak). b) B16 metasztázis széli része, melyen a pneumociták podoplanin (zöld), a kapillárisok CD31 (piros), a tumorsejtek sejtmagjai TOTO (kék) festéssel vannak jelölve. A tumorsejtek kitöltik az alveolusok lumenét. Nyilak jelölik azokat a tumorsejteket, melyek az endotélsejtek (CD31) és a pneumociták (podoplanin) között helyezkednek el. Nyílhegy jelöli a még intakt alveolusszerkezetet. c) Elektronmikroszkópos felvétel egy B16 tumorsejtről (tu), amely az alveolus falában helyezkedik el. A tumorsejt inváziója/migrációja során úgy választja le az epitéliumot a kapillárisról, hogy az azok között lévő bazális membránt szétválasztja egy epitél és egy endotél bazális membrán rétegre (fekete nyílhegyek). Piros nyílhegy jelöli a még nem szétválasztott kettős bazális membránt (ep: epitélium; en: endotélium; alv: alveoláris tér; kap: kapillárislumen). d) HT1080 metasztázis lecsupaszított, pneumocitamentes (podoplanin, zöld) kapillárisa (CD31, kék, nyilak), melyet már minden oldalról tumorsejtek (fekete területek) határolnak. A nyílhegy egy másik érre mutat, aminek egy része még kapcsolatban van az epitéliummal, itt még nem teljes a leválasztás. A leválasztott pneumociták bazális membrán rétegen nyugszanak (laminin, piros, csillag), mely vékonyabb, mint az ereket körülvevő bazális membrán



rábban már Pezzella által humán primer és metasztatikus tüdőtumorkok esetében leírt alveoláris mintázat kialakulását eredményezi (10). A folyamat első lépéseként az intravénásan oltott tumorsejtek az alveolusfalak kötőszövetébe extravazáltak. Itt kisebb kolóniák kialakítása után betörték az alveoláris térbe, majd ott is szaporodásnak indultak (1. ábra). A metasztázisok szélén elhelyezkedő, de már tumorszövet által kitöltött alveolusok falának szerkezete kezdetben megtartott volt (pneumociták – kettős bazális membrán – endotélium) (2.a ábra).

A tumorsejtek által borított alveolusfalakat elektronmikroszkópos szinten is megvizsgáltuk. Az inkorporált kapillárisok lumenjében tumorsejtek nincsenek, a tumorsejt és a pneumocita plazmamembránjai szoros kapcsolatban vannak. A kapilláris mindkét oldalán a szabályos szerkezetű vér-gáz gát van jelen a pneumocita, bazális membrán és endotéliumrétegekkel.

A peritumorális szövetben elhelyezkedő kapillárisok endotéliumsejtjeinek proliferációs aktivitása csak csekély mértékben emelkedett, ami azt mutatja, hogy érképződés nem zajlik ebben a régióban. Az ereződés folyamata azonban nem fejeződik be az alveolusok lumenének elfoglalásával. A különböző eredetű proliferáló tumorsejtek az alveoláris térből a pneumociták rétegén keresztül behatolnak az intersticiumba, ahol tovább szaporodnak és inváziójuk/migrációjuk során leválasztják a pneumocitákat a kapillárisok felszínéről (2.b,c ábra), aminek végeredményeképpen a tumorsejtek elfoglalják a kapillárisok teljes felszínét. Ennek következményeként lecsupaszított – pneumocitamentes – erek jelennek meg a metasztázisok belsejében (2.d ábra). A tumorsejtek a pneumociták leválasztását a kapillárisokról az endotéliumsejt és a pneumociták között található kettős bazális membrán szétválasztásával érik el (2.c ábra). A folyamat előrehaladtával a tumor belsejében található, erősen komprimált pneumociták degradálódnak, de a bekebelezett és lecsupaszított erek funkcionálisak maradnak, így képesek a metasztázis vérellátását biztosítani.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Megállapítottuk, hogy a vizsgált tumorvonalak (B16, HT1080, HT25, C26 és MATB) a tüdőszövetben alveolusról alveolusra terjednek, így a terjedés kezdeti szakaszában

inkorporálják az intakt alveolusfalakat a bennük levő kapillárisokkal együtt. A bekebelezés folyamatának kezdetén a kapillárisok körül még jelen vannak a pneumociták. A tumorsejtek később belépnek az alveolusok falába, és az epiteliális és endoteliális bazális membrán között migrálva leválasztják a pneumocitákat bazális membránjukkal együtt az erekről. A leválasztott pneumociták fragmentálódnak a tumor belsejében. A lecsupaszított erek azonban funkcionálisak maradnak és képesek biztosítani a tumor vérellátását.

Összefoglalva, az adatok azt mutatják, hogy a tüdőmetasztázisok vaszkularizációja a pulmonális érhálózat bekebelezésével történik. Mindezen információ a jövőben fontos klinikai jelentőséggel bírhat az antiangiogén terápia hatékonyságának megítélésében, illetve antivaszkuláris terápia kidolgozásában.

## IRODALOM

1. Krishnan K, Khanna C, Helman LJ. The molecular biology of pulmonary metastasis. *Thorac Surg Clin* 16:115–124, 2006
2. Snyder BJ, Pugatch RD. Imaging characteristics of metastatic disease to the chest. *Chest Surg Clin N Am* 8:29–48, 1998
3. Davis SD. CT evaluation for pulmonary metastases in patients with extrathoracic malignancy. *Radiology* 180:1–12, 1991
4. Crow J, Slavin G, Kreel L. Pulmonary metastasis: a pathologic and radiologic study. *Cancer* 47:2595–2602, 1981
5. Döme B, Hendrix MJ, Paku S, et al. Alternative vascularization mechanisms in cancer: pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 170:1–15, 2007
6. Folkman J, Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol* 16:207–248, 1976
7. Dezso K, Bugyik E, Papp V, et al. Development of arterial blood supply in experimental liver metastases. *Am J Pathol* 175:835–843, 2009
8. Bugyik E, Dezso K, Reiniger L, et al. Lack of angiogenesis in experimental brain metastases. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:979–991, 2011
9. Döme B, Paku S, Somlai B, et al. Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol* 197:355–362, 2002
10. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, et al. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol* 151:1417–1423, 1997