

M. Moche¹
 D. S. C. Hui²
 K. Huse³
 K. S. Chan⁴
 D. K. L. Choy²
 G. H. Scholz³
 H. Gosse⁵
 J. Winkler¹
 J. Schauer¹
 U. Sack⁶
 G. Hoheisel¹

Matrix-Metalloproteininasen und deren Inhibitoren bei Lungenkarzinomen mit malignem Pleuraerguss

Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Lung Cancer with Malignant Pleural Effusion

Zusammenfassung

Matrix-Metalloproteininasen (MMP) und deren Inhibitoren, tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP), spielen eine wesentliche Rolle beim physiologischen und pathologischen Umbau von Geweben. Ziel dieser Studie war, das Vorkommen von MMP und TIMP bei Patienten mit Lungenkarzinomen und malignem Pleuraerguss (CA) zu bestimmen. **Methoden:** Die Konzentrationen von MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 wurden in Pleuraergussflüssigkeit und Plasma von 31 Patienten mit CA und 14 mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF) und in Plasma von 18 Gesunden (CON) mittels ELISA und Zymographie bestimmt. **Ergebnisse:** ELISA-Konzentrationen von MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 waren in CA Pleuraflüssigkeit vs. CA Plasma erhöht ($p < 0,005$, $p < 0,005$, $p < 0,05$), im Gegensatz zu MMP-9 mit erhöhten Werten im Plasma ($p < 0,005$). MMP-1 und MMP-8 fand sich in CA vs. CHF Pleuraflüssigkeit erhöht ($p < 0,05$, $p < 0,005$). MMP und TIMP zeigten keinen Unterschied der Plasma-Konzentrationen in CA vs. CHF, dagegen waren MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 erhöht vs. CON (jeweils $p < 0,005$). Die MMP-9/MMP-2-Zymography-Quotienten waren in CA Plasma vs. Ergussflüssigkeit, in CA vs. CHF Plasma und CA vs. CHF Ergussflüssigkeit (jeweils $p < 0,005$) und in CA vs. CON Plasma erhöht ($p < 0,05$). **Schlussfolgerung:** MMP-2-, TIMP-1- und TIMP-2-Konzentrationen finden sich bei CA und CHF im Pleuraraum erhöht, vermutlich als Folge einer unspezifischen pleuralen Re-

Abstract

Matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) play a crucial role in physiological and pathological matrix turnover. This study aimed to determine the occurrence of MMP and TIMP in lung cancer patients with malignant pleural effusions (CA). **Methods:** MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, TIMP-1, and IMP-2 concentrations were determined by ELISA and zymography in pleural effusions and plasma of 31 CA and 14 congestive heart failure (CHF) patients and in plasma of 18 healthy controls (CON). **Results:** MMP-2, TIMP-1, and TIMP-2 ELISA-concentrations were increased in CA pleural fluid vs. CA plasma ($p < 0,005$, $p < 0,005$, $p < 0,05$), in contrast to MMP-9 being higher in plasma ($p < 0,005$). Pleural fluid MMP-1 and MMP-8 were increased in CA vs. CHF ($p < 0,05$, $p < 0,005$). MMP and TIMP plasma concentrations were not different in CA vs. CHF, but MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 were increased vs. CON ($p < 0,005$, each). Gelatine zymography MMP-9/MMP-2 ratios were increased in CA plasma vs. effusion fluid ($p < 0,005$), in CA vs. CHF plasma, CA vs. CHF effusions ($p < 0,005$ each), and in CA vs. CON plasma ($p < 0,05$). **Conclusions:** MMP-2, TIMP-1, and TIMP-2 accumulate in the pleural compartment in CA and CHF, probably reflecting an unspecific pleural reaction. MMP-1 and MMP-8 are increased in cellular rich CA pleural effusions only. The determination of MMP-9/MMP-2 ratios in pleural fluid may contribute to differentiate CHF from CA effusions.

Institutsangaben

¹ Medizinische Klinik und Poliklinik I, Abteilung Pneumologie, Universität Leipzig

² Department of Medicine and Therapeutics, Pulmonary Unit; Prince of Wales Hospital, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China

³ Medizinische Klinik und Poliklinik III, Abteilung Endokrinologie, Universität Leipzig

⁴ Pulmonary and Palliative Care Unit, Haven of Hope Hospital; Hong Kong, China

⁵ Robert-Koch-Krankenhaus, Städtisches Klinikum St. Georg, Leipzig

⁶ Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität Leipzig

Korrespondenzadresse

Priv.-Doz. Dr. med. Gerhard Hoheisel · Fachpraxis für Pneumologie und Allergologie · August-Bebel-Str. 71 · 04275 Leipzig · E-mail: gerhard.hoheisel@t-online.de

Eingang: 11. Februar 2005 · **Nach Revision akzeptiert:** 20. Juni 2005

Bibliografie

Pneumologie 2005; 59: 523–528 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
 DOI 10.1055/s-2005-870966
 ISSN 0934-8387

aktion. MMP-1 und MMP-8 finden sich nur in zellreichen CA Pleuraergüssen erhöht. Die Bestimmung der MMP-9/MMP-2 Quotienten in Pleuraergüssen könnte zur Differenzierung von CHF und CA Ergüssen beitragen.

Einleitung

Der Nachweis eines malignen Pleuraergusses durch Tumorzellen im Pleuragewebe oder der Pleuraflüssigkeit bedeutet im Allgemeinen Inkurabilität [1,2]. Matrix-Metalloproteinasen (MMP), eine Familie Zellmatrix abbauender, Zink abhängiger Enzyme, sowie ihre endogenen Inhibitoren, die tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP), spielen nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Bindegewebe, der Zellwanderung und einer Vielzahl physiologischer Prozesse, sondern sind auch an pathologischen Prozessen wie Rheumatoider Arthritis, Tuberkulose, verschiedene Lungenerkrankungen und der Invasion und Metastasierung von Tumoren, einschließlich des Lungenkarzinoms beteiligt [3–8]. Die bisher vorliegenden Studien berichten über hohe Konzentrationen von MMP und TIMP in Pleuraergüssen unterschiedlicher Ätiologie [7–12]. Auch fanden sich erhöhte MMP- und TIMP-Konzentrationen im Plasma von Lungenkarzinompatienten [13–16]. Unterschiedliche Konzentrationen von MMP und TIMP in Pleuraflüssigkeit und Plasma können wichtige Informationen über deren Verteilung und pathophysiologische Rolle bei Patienten mit Lungenkarzinom mit malignem Pleuraerguss geben. Ziel der Studie war MMP und TIMP bei Patienten mit Lungenkarzinom und malignem Pleuraerguss zu bestimmen und mit Werten von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und von Gesunden zu vergleichen.

Patienten und Methoden

Patienten

33 Patienten (12 weiblich, 21 männlich, Alter 70 ± 2 Jahre) mit primärem Lungenkarzinom und malignem Pleuraerguss wurden fortlaufend in die Studie aufgenommen. Die Diagnose eines Lungenkarzinoms basierte auf radiologischen, klinischen, histologischen oder zytologischen Kriterien und dem Nachweis maligner Zellen in Pleuraflüssigkeit oder Pleurabiopsien. Patienten mit Lungenmetastasen durch einen Primärtumor außerhalb der Lunge wurden ausgeschlossen. Die histologische Typisierung zeigte Adenokarzinome ($n = 12$), Plattenepithelkarzinome ($n = 3$), kleinzellige Karzinome ($n = 5$) und undifferenzierte Karzinome ($n = 9$). Bei vier weiteren Patienten konnte der histologische Typ nicht näher zugeordnet werden. Zum Vergleich wurden Plasma und Pleuraflüssigkeit von 16 Patienten (6 weiblich, 10 männlich, Alter 74 ± 3 Jahre) mit Pleuraergüssen bei chronischer Herzinsuffizienz untersucht. Die Diagnose einer Herzinsuffizienz basierte auf radiologischen und klinischen Kriterien, dem transudativen Charakter der Pleuraflüssigkeit und dem Ausschluss anderer Ätiologien. Von 6 Herzinsuffizienz-Patienten war nur Ergussflüssigkeit verfügbar. Das Plasma von 18 Gesunden (6 weiblich, 12 männlich, Alter 35 ± 2 Jahre) diente als Kontrolle.

Sammeln von Pleuraflüssigkeit und Blut

Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der beteiligten Krankenhäuser genehmigt. Die Proben wurden bei der ersten diagnostischen oder therapeutischen Pleurapunktion gesammelt. Pleuraflüssigkeit wurde in EDTA-Röhrchen zur MMP- und TIMP- und in Serum-Röhrchen zur Laktatdehydrogenase (LDH)- und Gesamteiweiß-Bestimmung aspiriert. Zellen und Überstand wurden durch Zentrifugation getrennt. Die Gesamtzell- und Leukozytenzahl sowie das Differenzialzellbild wurden durch lichtmikroskopische Auszählung (May-Grünwald-Giemsa-Färbung) bestimmt. Venöses Blut wurde in EDTA-Röhrchen zur MMP- und TIMP- und in Serum-Röhrchen zur LDH- und Gesamteiweiß-Bestimmung aspiriert. Die Gesamteiweiß- und LDH-Bestimmung erfolgte durch standardisierte Methoden. Plasma, Serum und Ergussflüssigkeit wurden bis zur Parameterbestimmung bei -70°C gelagert.

Bestimmung von MMP und TIMP mittels Enzyme Linked Immunosorbend Assay (ELISA)

Zur Bestimmung immunreaktiver Konzentrationen von MMP-1 (interstitial collagenase), MMP-2 (human type IV collagenase 72 kDa, gelatinase-A), MMP-3 (stromelysin-1), MMP-8 (neutrophil collagenase), MMP-9 (human type IV collagenase 92 kDa, gelatinase-B), TIMP-1 und TIMP-2 wurde Pleuraflüssigkeit und Plasma unter Verwendung kommerziell erhältlicher zweischichtiger ELISA-Kits (Biotrak® Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wie zuvor beschrieben untersucht [7].

Bestimmung von MMP-2 und MMP-9 mittels Gelatine-Zymographie

Zur Bestimmung der Aktivitäten von MMP-2 und MMP-9 wurde eine Gelatine-Zymographie wie zuvor beschrieben durchgeführt [7,17]. Kurzgefasst wurden die Plasma- oder Pleuraflüssigkeitsproben nach Verdünnung und Pufferung auf die Gele aufgetragen. Die Proteine wurden durch Anlegen einer elektrischen Spannung getrennt. Nach Inkubation in Entwicklungspuffer wurden die Gele mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Nach Entfärben in Essigsäure waren die Bänder als dunkelblaue Linien auf dem blauen Gel zu erkennen, wodurch eine Identifizierung der Lysebänder mit den standardisierten Bändern ermöglicht wurde. Zur semiquantitativen Bestimmung der gelatinolytischen Aktivitäten wurden die Zymogramme mittels des E.A.S.Y.-Plus-Video-dokumentationssystem (Herolab, Wiesloch) densitometrisch ge-scannet. Die Intensität der mit MMP-2 und MMP-9 korrespondierenden lytischen Zonen wurde als Einheiten festgelegt und der MMP-9/MMP-2-Quotient berechnet [18].

Statistik

Die Angaben erfolgen als Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit der SigmaStat™ Software (Jandel, Erkrath, FRG). Zur Risikominimierung falsch positiver Ergebnisse wurde trotz Normalverteilung der meisten Werte der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test angewendet. p-Werte für Trendtests widerspiegeln einseitige Werte; alle anderen p-Werte repräsentieren zweiseitige Bestimmungen. $p < 0,05$ und für multiple Vergleiche $p < 0,005$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Für paarweise Vergleiche wurde die Spearman rank order Korrelation angewendet. Für Paare mit $p < 0,05$ wurde die Beziehung zwischen den beiden Variablen als signifikant gewertet.

Ergebnisse

Charakteristika der Pleuraflüssigkeit

Die LDH- und Gesamteiweißkonzentrationen in Pleuraflüssigkeit sind in Abb. 1a und 1b dargestellt und charakterisieren Karzinom-Pleuraflüssigkeit als Exsudate und Herzinsuffizienz-Pleuraflüssigkeit als Transudate gemäß den Kriterien nach Light [19]. Bei Karzinomen war die Gesamtzellzahl 37021 ± 15629 und die Leukozytenzahl 9078 ± 5285 Zellen/mm³ mit $19 \pm 8\%$ Polymorphkernigen, $53 \pm 9\%$ Lymphozyten und $34 \pm 8\%$ Monozyten. Die entsprechenden Zahlen bei Herzinsuffizienz waren: Gesamtzellen 2488 ± 1663 und Leukozyten 320 ± 113 Zellen/mm³ mit $16 \pm 7\%$ Polymorphkernigen, $50 \pm 16\%$ Lymphozyten und $57 \pm 11\%$ Monozyten (Abb. 1).

Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA)

Immunreaktive Ergussflüssigkeits- und Plasma-Konzentrationen von MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 sind in Abb. 2a-f dargestellt. Da MMP-3-Konzentrationen häufig unterhalb der Nachweigrenze lagen, wurden nicht alle Proben bestimmt. MMP-3 wurde im Plasma bei 8 von 18 Karzinom-Patienten nachgewiesen ($5,1-8,1$ ng/ml) und in Pleuraergüssen bei 19 von 26 ($1,8-65,2$ ng/ml). Bei Herzinsuffizienz war MMP-3 unterhalb der Nachweigrenze in zwei Plasmaproben, jedoch nachweisbar in vier von fünf Pleuraergussproben ($5,9-11,3$ ng/ml). In 8 von 17 Plasmaproben Gesunder lagen die MMP-3-Konzentrationen zwischen $1,6-17,4$ ng/ml.

Bei Karzinomen waren die mittleren Pleuraflüssigkeits-Konzentrationen von MMP-1, MMP-2, MMP-8, TIMP-1 und TIMP-2 höher im Vergleich zu Plasma mit signifikanten Unterschieden für MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2. MMP-9-Konzentrationen waren erheblich niedriger in Pleuraflüssigkeit im Vergleich zu Plasma. Karzinom-Plasma-Konzentrationen aller MMP und TIMP zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich Herzinsuffizienz-Patienten, es zeigte sich lediglich ein Trend mit höheren Werten bei Herzinsuffizienz für MMP-2 ($p=0,054$) und TIMP-1 ($p=0,087$). Der Vergleich von Karzinom-Patienten mit Gesunden zeigte im Plasma signifikant höhere Werte für MMP-9, TIMP-1

und TIM-2. In Pleuraflüssigkeit waren MMP-1- und MMP-8-Konzentrationen bei Karzinomen signifikant höher im Vergleich zu Herzinsuffizienz. Der Vergleich der übrigen Parameter zeigte keinen Unterschied. Bei Herzinsuffizienz waren die MMP-2- und TIMP-1-Konzentrationen in Ergussflüssigkeit signifikant höher im Vergleich zu korrespondierendem Plasma. MMP-8- und MMP-9-Konzentrationen waren dagegen signifikant niedriger in Ergussflüssigkeit im Vergleich zu Plasma. Herzinsuffizienz-Plasma zeigte signifikante Unterschiede für MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 im Vergleich zu Gesunden.

MMP-2 und MMP-9-Gelatine-Zymographie

MMP-2 und MMP-9 zeigten sich als lytische Bände mit einem Molekulargewicht von ungefähr 70 respektive 90 kDa (Abb. 3a-b). Gereinigte Enzymproben wurden parallel zur Identifikation von MMP-2 (Abb. 3b, Bahn 7) und MMP-9 (Abb. 3b, Bahn 1) aufgetragen. In Karzinom-Ergussflüssigkeit zeigte sich ein variables Muster lytischer Bande sowohl für MMP-2 als auch für MMP-9, mit einem mehr gleichförmigen Muster von MMP-2, im Gegensatz zu dem in einigen Ergüssen kaum nachweisbaren MMP-9 (Abb. 3a).

In Herzinsuffizienz-Ergussflüssigkeit zeigte sich die Helligkeit und Breite der MMP-9-Lysezonen sehr schwankend, im Gegensatz zu mehr gleichförmigen MMP-2-Lysezonen sowohl in Pleuraflüssigkeit als auch im Plasma. Das Beispiel eines Patienten zeigt Abb. 3b.

Zum Vergleich der Enzymaktivitäten wurde der MMP-9/MMP-2-Quotient bestimmt (Abb. 4). Die Quotienten von MMP-9/MMP-2 waren bei Karzinomen signifikant höher in Plasma vs. Pleuraflüssigkeit. Desgleichen fanden sich signifikant höhere Werte sowohl im Plasma als auch in Pleuraflüssigkeit für Karzinome vs. Herzinsuffizienz. Plasma Gesunder zeigte gleichförmige Bande für MMP-2 und MMP-9 (Abb. 3b, Bahn 4) mit nur geringer Streubreite der MMP-9/MMP-2-Quotienten und signifikantem Unterschied vs. Karzinomen, jedoch nicht vs. Herzinsuffizienz.

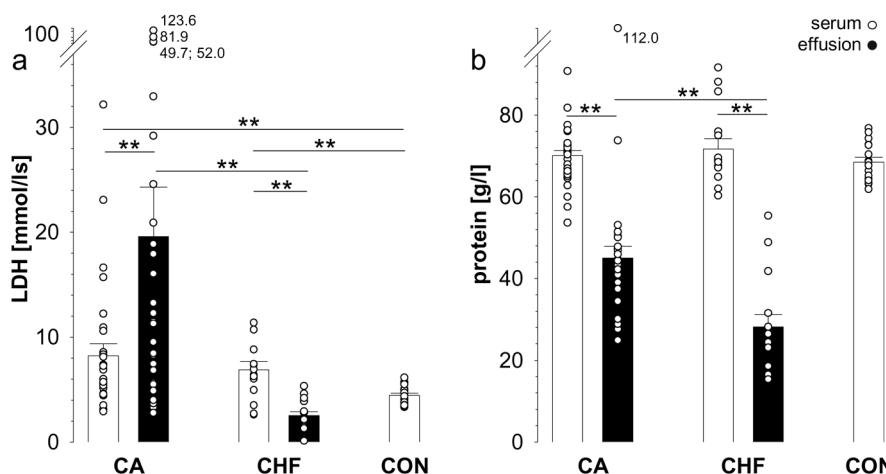


Abb. 1 Konzentrationen von Laktatdehydrogenase (LDH) und Gesamteiweiß (Protein) in Serum (offene Säulen) und Pleuraergussflüssigkeit (geschlossene Säulen) von 33 Patienten mit Lungenkarzinom und malignem Pleuraerguss (CA), 13 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (congestive heart failure, CHF) und im Serum von 18 Gesunden (CON). Die Säulen repräsentieren mean \pm SEM. ** $p < 0,005$.

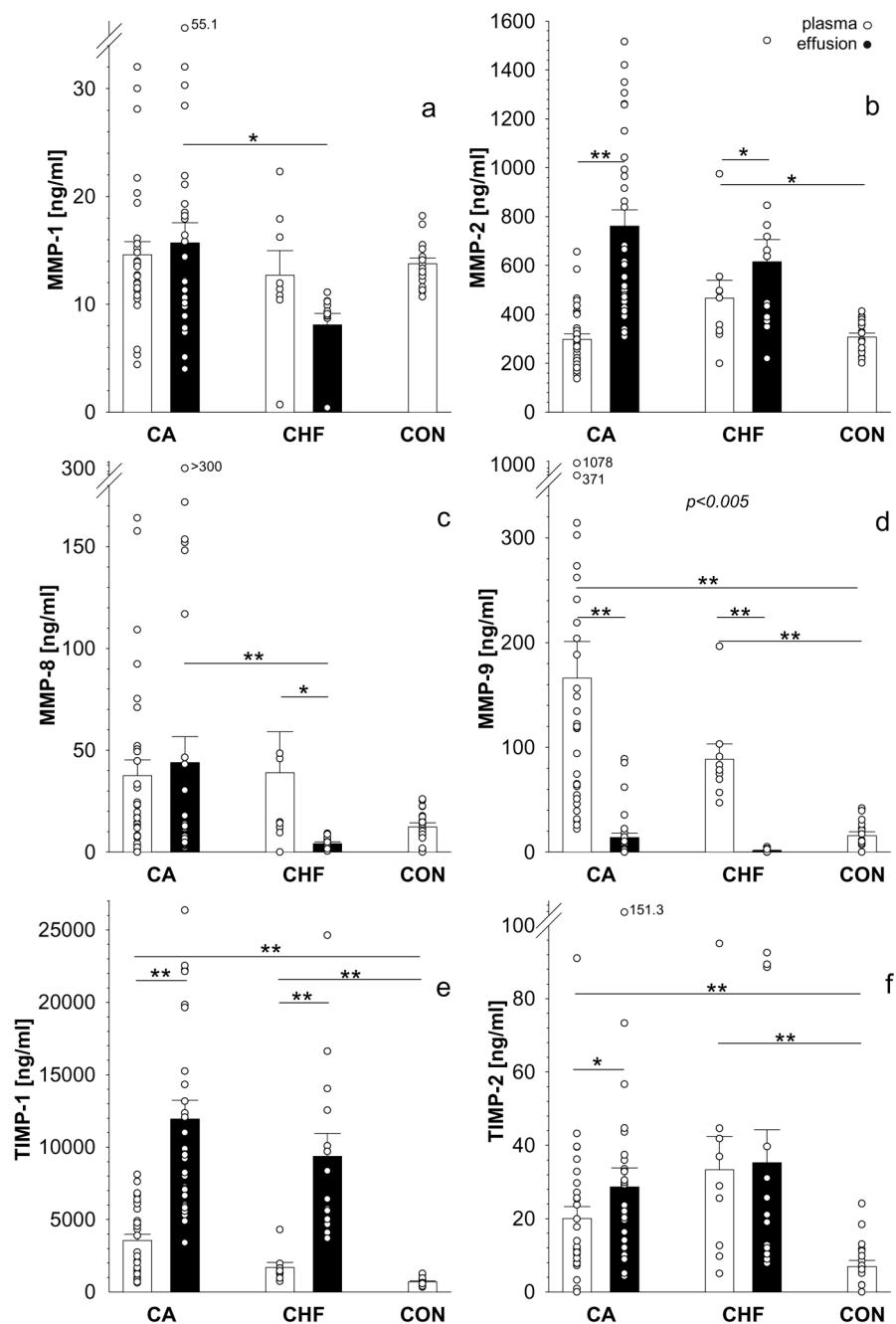


Abb. 2 a-f Konzentrationen von MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 im Plasma (offene Säulen) und Pleuraflüssigkeit (geschlossene Säulen) von 33 Lungenkarzinompatienten mit malignem Pleuraerguss (CA), 16 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (congestive heart failure, CHF) und im Plasma von 18 Gesunden (CON). Die Säulen repräsentieren mean \pm SEM. * $p < 0,05$ and ** $p < 0,005$.

Diskussion

Diese Studie zeigt, dass MMP und TIMP in hohen Konzentrationen im Plasma und Ergussflüssigkeit von Lungenkarzinompatienten mit malignem Pleuraerguss gefunden werden. Immunreaktive Konzentrationen von MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 waren signifikant höher in Karzinom-Ergussflüssigkeit vs. -Plasma außer für MMP-9 mit höheren Plasmawerten. Der Vergleich der Ergusskonzentrationen zeigt, dass nur MMP-1 und MMP-8 signifikant höher in Karzinomen vs. Herzinsuffizienz waren. Im Plasma fand sich kein signifikanter Unterschied von MMP- und TIMP-Konzentrationen in Karzinomen vs. Herzinsuffizienz, jedoch höhere Werte für MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 in Karzinomen und Herzinsuffizienz vs. Gesunden. Die Gelatine-Zymographie zeigte unterschiedliche Lysebandmuster von MMP-2 und MMP-9 in

Karzinom-Ergussflüssigkeit und -Plasma und eine geringere Variabilität in Herzinsuffizienz, im Gegensatz zu konstanten Banden im Plasma Gesunder. Die MMP-9/MMP-2-Quotienten zeigte höhere Werte bei Karzinomen in Ergussflüssigkeit vs. Plasma, in Ergussflüssigkeit bei Karzinomen vs. Herzinsuffizienz und in Plasma bei Karzinomen vs. Herzinsuffizienz und vs. Gesunden.

Eine Erklärung für die hohen Konzentrationen von MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 im pleuralen Kompartiment könnte deren Produktion durch Tumor- oder Stromazellen der Lunge sein, durch Mesothelzellen und Fibroblasten der Pleura oder durch Entzündungs- und Tumorzellen in der Pleuraflüssigkeit. Tatsächlich konnte in pleuralen und peritonealen Mesothelzellen eine mRNA-Expression für MMP-1, MMP-2, MMP-9 und TIMP nachgewiesen werden, die sich durch Stimulation mit Phorbolmyri-

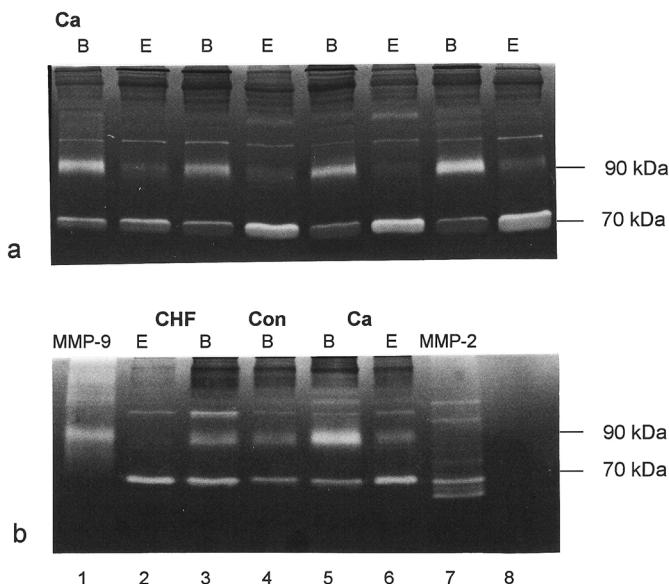


Abb. 3 a u. b Zymographischer Nachweis von MMP-2 und MMP-9 in Blutplasma (B) und pleuraler Ergussflüssigkeit (E). a Vier Lungenkarzinompatienten mit malignen Pleuraergüssen. Die Bahnen 1, 3, 5 und 7 repräsentieren Plasma, die Bahnen 2, 4, 6 und 8 korrespondierende Ergussflüssigkeit. b Gereinigtes proMMP-2 und die aktivierte Form daneben (Bahn 7) und gereinigtes proMMP-9 (Bahn 1). Zum Vergleich Patient mit Lungenkarzinom und malignem Pleuraerguss (CA), Patient mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF) und Gesunder (CON). Plasma: Bahnen 3, 4, 5; Ergussflüssigkeit: Bahnen 2, 6.

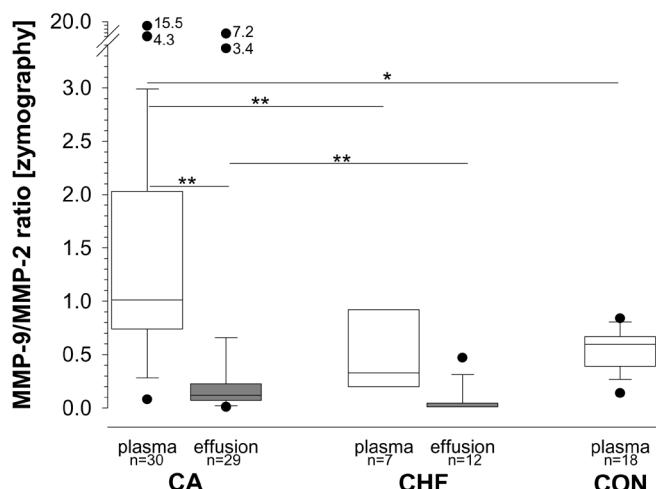


Abb. 4 Quotienten von MMP-9/MMP-2 mittels Gelatinezymographie im Plasma und Pleuraflüssigkeit (effusion) von 33 Lungenkarzinompatienten mit malignem Pleuraerguss (CA), 12 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF) und im Plasma von 18 Gesunden (CON). Die Werte werden im Box-Plot-Format dargestellt. Die Boxen beinhalten alle Werte zwischen der 25. und 75. Perzentile, die horizontalen Linien stellen die Medianwerte dar, die Streubalken repräsentieren Werte innerhalb des 95% Konfidenzintervalls ausgenommen Extremwerte. * $p < 0,05$ and ** $p < 0,005$.

stataacetat (PMA) für MMP-1, MMP-9 und TIMP, nicht jedoch für MMP-2 verstärken ließ [20]. Fibroblasten, Endothelzellen und Zellen der Monozyten/Makrophagen-Reihe produzieren MMP-1, wohingegen MMP-8 ausschließlich von Polymorphkernigen produziert wird [5]. Dies und die hohe Zellularität von Karzinom-

Pleuraergüssen könnte die höheren MMP-1- und MMP-8-Konzentrationen im Vergleich zu Herzinsuffizienz erklären. Bei Plattenepithelkarzinom der Lunge wurden mittels mRNA und Immunzytologie MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 in unterschiedlicher Intensität nachgewiesen [21–23]. MMP-9 mRNA wurde in Plattenepithelkarzinom der Lunge und Stromazellen nachgewiesen, jedoch nicht in Adenokarzinom [24]. Andere Autoren fanden mRNA von MMP-1, MMP-2 und MMP-9 in Zellen von Adeno-, Plattenepithel- und kleinzelligen Lungenkarzinom sowie in Stromazellen, mRNA von TIMP-1 und TIMP-2 jedoch primär in Stromazellen [25]. Diese Studie zeigte vergleichbare ELISA-Konzentrationen von TIMP-1 und TIMP-2 in Pleuraflüssigkeit bei Karzinom als auch bei Herzinsuffizienz, im Gegensatz zu einer früheren Arbeit, in welcher mittels Western-Blot-Analyse nur geringe Mengen von TIMP-2 in exsudativen Pleuraergüssen gefunden wurden [11].

In dieser Studie fanden sich vergleichbare Plasma-Konzentrationen von MMP und TIMP in Karzinom und Herzinsuffizienz, jedoch viel höhere Plasma-Werte von MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 in Karzinom im Vergleich zu Gesunden. Die Produktion von MMP-9 durch eine Vielzahl von Zellen mit bevorzugter Sekretion in das Blut oder vermehrter Neutralisierung im pleuralen Kompartiment könnte die höheren MMP-9-Plasma-Konzentrationen im Vergleich zur Ergussflüssigkeit erklären. Erhöhte MMP-9-Plasma-Spiegel wurden bei Patienten mit Karzinom von Magen, Colon, Mamma, Prostata, Harnblase und Lunge nachgewiesen [13, 14, 26–28]. Einige Studien untersuchten die Wertigkeit dieser Proteine als Tumormarker mit unterschiedlichen Ergebnissen. So korrelierten hohe MMP-9- und TIMP-1-Werte im Serum bei Lungenkarzinompatienten mit einer niedrigeren Überlebenszeit [14]. Bei Patienten mit nicht kleinzelligen Lungenkarzinom (non-small-cell lung cancer, NSCLC) konnten die Serum-MMP-9-Konzentrationen vor der Resektion als unabhängige prognostische Faktoren für die Überlebenszeit in einer multivariablen Regressionsanalyse identifiziert werden [16]. Bei Patienten mit vollständig resezierten NSCLC ohne Metastasen konnte eine Korrelation zwischen immunhistochemischer MMP-9-Expression und einer verkürzten Überlebenszeit gezeigt werden [29]. Eine weitere Studie zeigte nicht nur erhöhte MMP-2-Serum-Werte bei Patienten mit fortgeschrittenen Lungenkarzinom vs. Gesunden und bei Patienten mit Fernmetastasen im Vergleich zu solchen ohne, sondern auch einen Zusammenhang zwischen Therapieversagen und erhöhten Werten bei Patienten unter Chemotherapie [30].

Diese Studie zeigt unterschiedliche Muster lytischer Bande von MMP-2 und MMP-9 in Karzinom- und Herzinsuffizienz-Pleuraergüssen und demonstriert wie bereits zuvor mittels ELISA die Inhomogenität der proteolytischen Aktivitäten. Im Gegensatz dazu finden sich gleichförmige Bande von MMP-2 und MMP-9 aufgrund vergleichbarer Plasma-Konzentrationen bei Gesunden. In anderen Studien zeigte die quantitative Zymographie erhöhte MMP-9- jedoch vergleichbare MMP-2-Plasma-Werte bei Lungenkarzinompatienten im Vergleich zu Gesunden [15], sowie eine erhöhte gelatinolytische Aktivität von MMP-2 und MMP-9 im Gewebe von NSCLC im Vergleich zu nicht befallenem Gewebe [31]. Die höheren MMP-9/MMP-2-Quotienten in Karzinom- vs. Herzinsuffizienz-Ergussflüssigkeit unterstützt die Vermutung einer früheren Studie, dass sich MMP-2 konstitutiv in Pleuraflüs-

sigkeit gleich welchen Ursprungs findet, wohingegen die Produktion von MMP-9 in Exsudaten wie malignen Ergüssen vermehrt produziert wird [11]. Diese Studie zeigt ferner signifikante Unterschiede der MMP-9/MMP-2-Quotienten in Plasma bei Karzinomen im Vergleich zu Herzinsuffizienz und zu Gesunden.

Zusammenfassend finden sich MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 in Pleuraflüssigkeit im Vergleich zu Plasma sowohl bei Karzinomen als auch Herzinsuffizienz, möglicherweise als unspezifische pleurale Reaktion, erhöht. MMP-1 und MMP-8 finden sich jedoch nur im pleuralen Kompartiment bei Karzinomen erhöht, erkärbbar durch die höhere Zellularität maligner Ergüsse. Plasma-Konzentrationen von MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 sind bei Lungenkarzinomen und Herzinsuffizienz im Vergleich zu Gesunden erhöht. Die MMP-9/MMP-2-Quotienten im Plasma sind bei Karzinomen höher und erlauben eine Abgrenzung zur Herzinsuffizienz und zu Gesunden.

Anmerkungen

Die Studie wurde unterstützt durch: Stipendium 423/hk-rl des Joint Research Project Deutscher Akademischer Auslandsdienst (DAAD)/Research Council of Hong Kong; Förderverein Pneumologie, Universität Leipzig; Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), Universität Leipzig.

Diese Arbeit enthält Teile der Dissertation von Michael Moche.

Die Autoren danken Po-Kit Ma, Ramona Blaschke, Watson W.S. Wong, Stephen L.S. Yiu und Danny Gutknecht für exzellente technische Assistenz und Dres. Kam-Keung Chan, Thomas S.T. Li, Hans-Jürgen Seyfarth und Matthias Vogtmann für die Bereitstellung von Proben und klinischer Daten.

Literatur

- 1 Sahn SA. Pleural diseases related to metastatic malignancies. *Eur Respir J* 1997; 10: 1907 – 1913
- 2 Light RW, Hamm H. Malignant pleural effusion: would the real cause please stand up? *Eur Respir J* 1997; 10: 1701 – 1712
- 3 Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK et al. Matrix metalloproteinases: A review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 197 – 250
- 4 Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis, and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994; 7: 2062 – 2072
- 5 O'Connor CM, Fitzgerald MX. Matrix metalloproteinases and lung disease. *Thorax* 1994; 49: 602 – 609
- 6 Crawford HC, Matrisian LM. Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis* 1994; 14: 234 – 245
- 7 Hoheisel G, Sack U, Hui DSC et al. Occurrence of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in tuberculous pleuritis. *Tuberculosis* 2001; 81: 203 – 209
- 8 Hoheisel G, Sack U, Hui DS et al. Immunohistochemische Lokalisierung von Matrixmetalloproteinasen (MMP) und Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) bei tuberkulöser Pleuritis. *Pneumologie* 2004; 58: 305 – 308
- 9 Hurewitz AN, Zucker S, Mancuso P et al. Human pleural effusions are rich in matrix metalloproteinases. *Chest* 1992; 102: 1808 – 1814
- 10 Hurewitz AN, Wu CL. Tetracycline and doxycycline inhibit pleural fluid metalloproteinases. *Chest* 1993; 103: 1113 – 1117
- 11 Eickelberg O, Sommerfeld CO, Wyser C et al. MMP and TIMP expression in pleural effusions of different origin. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1987 – 1992
- 12 Iglesias D, Alegre J, Aleman C et al. Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in exudative pleural effusions. *Eur Respir J* 2005; 25: 104 – 109
- 13 Iizasa T, Fujisawa T, Suzuki M et al. Elevated levels of circulating plasma matrix metalloproteinase 9 in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 149 – 153
- 14 Ylisirnio S, Hoyhtya M, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer-TIMP-1 as a prognostic marker. *Anticancer Res* 2000; 20: 1311 – 1316
- 15 Hrabec E, Strek M, Nowak D et al. Elevated level of circulating matrix metalloproteinase-9 in patients with lung cancer. *Respir Med* 2001; 95: 1 – 4
- 16 Laack E, Kohler A, Kugler C et al. Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2002; 13: 1550 – 1557
- 17 Tyagi SC, Matsubara L, Weber KT. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. *Clin Biochem* 1993; 26: 191 – 198
- 18 Tyagi SC, Ratajska A, Weber KT. Myocardial matrix metalloproteinase(s): Localisation and activation. *Molec Cell Biochem* 1993; 126: 49 – 59
- 19 Light RW, MacGregor MI, Luchsinger PC et al. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972; 72: 507 – 513
- 20 Marshall BC, Santana A, Xu QP et al. Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in mesothelial cells. Cellular differentiation influences expression. *J Clin Invest* 1993; 91: 1792 – 1799
- 21 Karameris A, Panagou P, Tsilalis T et al. Association and expression of metalloproteinases and their inhibitors with the metastatic potential of squamous lung carcinomas: A molecular and immunohistochemical study. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1930 – 1936
- 22 Nakagawa H, Yagihashi S. Expression of type IV collagen and its degrading enzymes in squamous cell carcinoma of lung. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 934 – 938
- 23 Schütz A, Schneidenbach D, Aust G et al. Differential expression and activity status of MMP-1, MMP-2, MMP-9 in tumor and stromal cells of squamous cell carcinomas of the lung. *Tumor Biol* 2002; 23: 179 – 184
- 24 Canete-Soler R, Litzky L, Lubensky I et al. Localization of the 92 kd gelatinase mRNA in squamous cell and adenocarcinomas of the lung using in situ hybridisation. *Am J Pathol* 1994; 144: 518 – 527
- 25 Urbanski SJ, Edwards DR, Maitland A et al. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas. *Br J Cancer* 1992; 66: 1188 – 1194
- 26 Zucker S, Hymowitz M, Conner C et al. Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878: 212 – 227
- 27 Yoshikawa T, Suzuki K, Kobayashi O et al. Clinical significance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in peripheral blood of patients with gastric carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 1998; 25: 1461 – 1464
- 28 Baker T, Tickle S, Wasan H et al. Serum metalloproteinases and their inhibitors: markers for malignant potential. *Br J Cancer* 1994; 70: 506 – 512
- 29 Sienel W, Hellers J, Morresi-Hauf A et al. Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003; 103: 647 – 651
- 30 Garbisa S, Scagliotti G, Masiero L et al. Correlation of serum metalloproteinase levels with lung cancer metastasis and response to therapy. *Cancer Res* 1992; 52: 4548 – 4549
- 31 Brown PD, Bloxridge RE, Stuart NSA et al. Association between expression of activated 72-kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 574 – 578