

Granulocyták szuperoxid-anion termelése endometrium carcinoma felismerésekor és kezelés után

PÓKA RÓBERT DR., SZÚCS SÁNDOR DR.*, ÁDÁNY RÓZA DR.*, SZIKSZAY EDIT DR.** , BORSOS ANTAL DR.

A Debreceni Orvostudományi Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikája (igazgató: Borsos Antal dr., egyetemi tanár), Közegészségtani Intézete (igazgató: Ádány Róza dr., egyetemi tanár) és Gyermekgyógyászati Klinikája* (igazgató: Oláh Éva dr., egyetemi tanár) közleménye*

Összefoglalás: A szerzők 30 endometrium carcinomás betegből származó vérmintában vizsgálták a polymorphonuclearis leukocyták (PMNL) szuperoxid-anion termelését. Méréseiket a komplex kezelés megkezdése előtt és 9 esetben legalább egy évvel a kezelés befejezése után is elvégezték. Az eredményeket összehasonlították az egészséges kontrollokéval. A phorbol-dibutyráttal stimulált szuperoxid-anion termelést spektrofotometriás módszerrel vizsgálták és a ferricitokrómnál c abszorbanciájának szuperoxid dizmutázzal gátolható változásaként mérték. A 31 egészséges kontrollból származó granulocyták átlagos szuperoxid-anion termelése $1,541 \text{ nM/perc}/10^5$ sejt ($SD=0,201 \text{ nM/perc}/10^5$ sejt) volt. A betegek mintái lényegesen alacsonyabb szuperoxid-anion termelést mutattak. A granulocyták szuperoxid-anion termelése az endometrium carcinomának már korai stádiumaiban is alacsonyabb volt ($1,112 \text{ nM/perc}/10^5$ sejt), mint a kontrolloké. A myometrium infiltráció mélységétől függően nem volt lényeges különbség a betegek szuperoxid termelésében. A terápia befejeztével, a klinikailag tumormentes betegek granulocytáinak szuperoxid-anion termelése lényegesen javult ($1,357 \text{ nM/perc}/10^5$ sejt), de az továbbra is alacsonyabb volt, mint a kontrolloké.

Kulcsszavak: *endometrium carcinoma, granulocytá, szuperoxid-anion*

A reaktív oxigéngyököknek egyre nagyobb szerepet tulajdonít a mai orvostudomány. A szabad oxigéngyökök pathogenetikai szerepe több perinatológiai kórképben is igazolható [1] [2]. Régóta ismert, hogy a szabadgyökök szerepet játszanak a rosszindulatú daganatok kialakulásában is [3] [4]. Paradox módon a reaktív oxigéngyököknek a baktériumok és daganatsejtek elleni nem specifikus immunreakciókban is igazolható szerepük van [5]. A polimorfonukleáris sejtek szuperoxid-anion termelését számos enzim működése befolyásolja. A micloperoxidáz, kataláz, cito-

króm-c és a szuperoxid dizmutáz enzimek szerepe a legfontosabb. Együttes aktivitásuk eredője az effektor sejtek szuperoxid-anion szekréciója, mely a célsejt pusztulását idézi elő [6]. Az egészséges sejtek védelmét nagyrészt a vörösvértestek antioxidáns aktivitása biztosítja [1]. Bár humán tumorokban igen kevés adat áll rendelkezésre, az eddig elért eredmények arra utalnak, hogy a reaktív oxigéngyökök termelése nőgyógyászati tumorokban is összefügg a betegség kiterjedésével. A granulocyták szuperoxid-anion termelésének csökkenését írták le petefészekrákos betegek cisz-

platin-kezelése után [7]. A kezelési ciklusok befejeztével a termelés normalizálódott. Állatkísérletes modellben a forbolmirisztát-acetáttal indukált szuperoxid-anion termelés kezdetben emelkedett, majd a daganat növekedésével párhuzamos csökkenést mutatott [8]. A polimorfonukleáris sejtek funkciójának csökkenését a neutrofil sejtszám növekedése kísérte a daganatos betegség előrehaladása során.

Granulocyták szuperoxid-anion termelését még nem vizsgálták endometrium carcinomában. Randszerűen végzett előzetes vizsgálataink arra utalnak, hogy a granulocyták oxigéngyök termelése a petefészek- és méhnyakrákhoz hasonlóan endometrium carcinomában is megváltozik.

Betegek és módszerek

Tájékozott beleegyezést követően ehgyomri perifériás vérmintát vettünk 30 endometrium carcinomás nőtől valamint 31 egészséges nőtől. Az esetek többségében mindennemű terápiás beavatkozást megelőzően került sor a vérvételre. A vizsgálatban résztvevő betegek preoperatív helyi sugárkezelést követően hasi méheltávolításon estek át, majd kombinált posztoperatív sugárkezelésben részesültek. Kilenc betegnél kezelés befejezése után több mint egy évvel lehetőségünk volt a vizsgálat ismételt elvégzésére.

A mintavételhez EDTA-tartalmú zárt rendszerű eszközöket alkalmaztunk. Az egészséges kontollokat jóindulatú betegség miatt hospitalizált nőktől valamint olyan kolléganőktől vettük, akik nem szedtek semmilyen gyógyszert. A vérmintákat Ficoll oldatra (1,0772 g/ml) rétegeztük és a vörösvértesteket szobahőn történő centrifugálással (1g 40-60 percig) távolítottuk el. A fehérvérsejtekben gazdag felülúszót Percoll sűrűségi gradiens oldatra rétegeztük (1,0948-1,0775 g/ml) majd 350 g-vel 20 percig centrifugáltuk 20°C-on. A két Percoll réteg közé ülepedett polimorfonukleáris sejteket kétszer mostuk Hank's oldattal (pH 7,4). A sejtek életképességét Tripánkéék festék-kizárási próbával ellenőriztük és a sejtek 98%-a bizonyult életképesnek. Mikroszkópos vizsgálattal szuszpenziókban 94-98% volt a granulocyták aránya. A vörösvértestek elhanyagolható mennyisége miatt hipotóniás lízisre nem volt szükség.

A szuperoxid-anion termelést a ferricitokrómmal c abszorbanciájának szuperoxid dizmutázzal gátolható csökkenéseként mértük. A granulocytákat (3×10^5) Hank's oldatban (pH 7,4 inkubáltuk forbol-12,13-dibutyrral (PDBu) 15 percig 37°C-on. A minták végső térfogata 0,5 ml volt, a ferricitokrómmal c és a PDBu koncentrációja 50 $\mu\text{mol/l}$ illetve 100 mmol/l volt. Az abszorbancia változását 550 nm-en mértük kettős sugarú Shimadzu UV-160A spektrofotométerrel (Shimadzu Seisakusho Ltd., Kyoto, Japan) 25°C. Az oldatba kiválasztott szuperoxid-anion mennyiségét a redukált

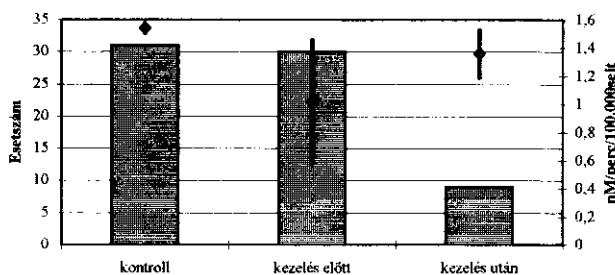
ferricitokrómmal c moláris extinkciós koefficiense ($2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) alapján számítottuk ki. A módszer kifejlesztéséről és részletes értékeléséről korábbi tanulmányok számoltak be [5, 6], de hatékonyságáról állatkísérletes modellen magunk is meggyőződünk [8]. Szenszitivitását flow-cytometriás módszerrel ellenőriztük, s az így kapott eredmények jó korrelációt mutattak a spektrofluorimetriás mérésekkel [11]. A módszer specifikitását az biztosítja, hogy a szuperoxid termelést a szuperoxid-dizmutázzal meggátolható ferricitokrómmal c redukcióként mérjük. Ezáltal kiküszöböljük más reaktív oxigéngyökök torzító hatását. A szuperoxid-anion termelést jelentősen csökkentenek tekintettük, ha az nem érte el az egészségesek átlagától $2 \times \text{SD}$ -vel alacsonyabb értéket.

A nőgyógyászati daganatok stádiumbeosztásában a jelenleg érvényben lévő FIGO ajánlásokat követtük. Az alacsony esetszámok miatt előrehaladott stádiumokban az alstádiumokra való bontást mellőztük.

A Student-féle t-próbát alkalmaztuk a folytonos változók átlagértékeinek összehasonlítására. A $p < 0,05$ különbséget tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

A kontroll esetek átlagos szuperoxid-anion termelése 1,541 nM/perc/ 10^5 sejt volt ($\text{SD}=0,201 \text{ nM/perc}/10^5$ sejt). Kilenc betegünkönél az endometrium carcinoma felismerésekor, a kezelés megkezdése előtt, és átlagosan 20 hónappal (tartomány=12-31 hónap) később is elvégeztük a vizsgálatot. A kezelés előtti átlagos szuperoxid-anion termelés 1,014 nM/perc/ 10^5 sejt volt ($\text{SD}=0,445 \text{ nM/perc}/10^5$ sejt). A kezelés után legalább 1 évvel klinikailag tumormentes betegekben mért átlagos szuperoxid-anion termelés 1,357 nM/perc/ 10^5 sejt volt ($\text{SD}=0,172 \text{ nM/perc}/10^5$ sejt) volt (1. ábra). A felismeréskor mért értékekhez képest jelentős javulást tudunk kimutatni ($p < 0,05$). Ennek ellenére a kezelés előtti és a kezelés utáni értékek is alacsonyabbak voltak, mint a kontrolloké (sorrendben $p < 0,007$ és $p < 0,01$). Endometrium carcinoma korai stádiumaiban a granulocyták

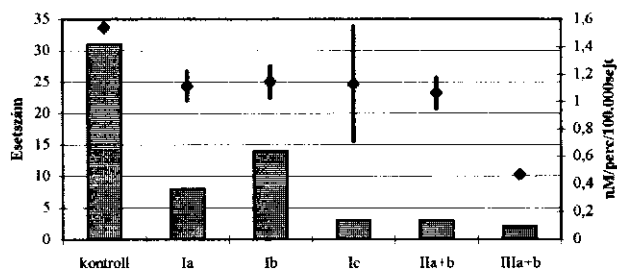


1. ábra Granulocyták szuperoxid-anion termelése endometrium carcinoma kezelése előtt és után.

Oszlopok: esetszám

Súlypontozott vonalak: átlagos szuperoxid termelés $\pm \text{SD}$

cyták szuperoxid-anion termelését nem befolyásolta az, hogy a folyamat milyen mélyen infiltrálta a myometriumot. Felszínes és mély infiltráció esetén 1,145 nM/perc/10⁵ sejt (n=14) illetve 1,061 nM/perc/10⁵ sejt (n=3) volt az átlagos szuperoxid-anion produkció. Az endometriumra lokalizált esetek (n=8) átlagos szuperoxid-anion termelése 1,112 nM/perc/10⁵ sejt volt (SD=0,303 nM/perc/10⁵ sejt) (2. ábra).



2. ábra Granulocyták stádiumfüggő szuperoxid-anion termelése endometrium carcinomában
Oszlopok: esetszám
Súlypontozott vonalak: átlagos szuperoxid termelés ±SD

Megbeszélés

A reaktív oxigéngyökök kedvezőtlen hatása számos kórkép kialakulásáért tehető felelőssé [1] [2]. Ugyanezek a molekulák azonban fontos szerepet játszanak mind a mikroorganizmusok mind pedig a rosszindulatú daganatok elleni védekezésben is [3] [9]. Állatkísérletben a polimorfonukleáris sejtek szuperoxid-anion termelése csökkent a betegség előrehaladásával [8]. Humán gastrointestinalis tumorokban és tüdőrákban szintén a granulocyták reaktív oxigéngyök-termelésének csökkenését igazolták, bár az irodalomban emelkedett granulocytá aktivitásról szóló tanulmány is előfordul [9] [10]. Ciszplatin alapú kemoterápiában részesülő petefészek- és méhnyakrákos betegekben a szuperoxid-anion termelés kezeléseket követő rövid tartamú csökkenését írták le [7]. A kezelési ciklusok befejeztével a granulocytá aktivitás visszatért a normális értékre, vagy azt meg is haladta. Ezek alapján az a következtetés vonható le, hogy maga a kemoterápiás kezelés okozza a szuperoxid-anion termelés csökkenését. Tanulmányunkban az endometrium carcinoma felismerésekor mért értékhez képest jelentős javulást tudtunk kimutatni legalább egy évvel a kezelés befejezése után. Ennek ellenére a kezelés előtti és a kezelés utáni értékek is alacsonyabbak voltak, mint a kontrolloké.

Granulocyták szuperoxid-anion termelését még nem vizsgálták endometrium carcinomában. A betegek polimorfonukleáris sejtjeinek stimulált aktivitása lényegesen alacsonyabb mint az egészséges kontrolloké (1,149 illetve 1,541 nM/perc/10⁵ sejt). A granulocyták szuperoxid-anion termelését számos tényező befolyásolja, melyek között legfontosabbak a pH, az elektrolitok és tápanyagok szérumban koncentrációja. Daganatos betegségekben e tényezők jelentősen csak előrehaladott stádiumban változnak meg. Vizsgálatainkat csak jó általános állapotú, műtethető betegekre korlátoztuk. Az említett faktorok lényeges eltérése rutin szérumban biokémiai vizsgálatokkal is kizárható. A granulocytáfunkciós vizsgálatra többségben még a kivizsgálás idején került sor, tehát akkor amikor a betegek még kezelésben nem részesültek. A patológiai Ia stádiumú esetek szuperoxid-anion termelése markánsan alacsonyabb volt, mint a kontrolloké (1,112 vs. 1,541 nM/perc/10⁵ sejt, p=0,01). A myometrium infiltráció mélysége, ami az endometrium carcinoma egyik legfontosabb prognosztikai tényezője, nem látszik befolyásolni a granulocyták szuperoxid-anion termelését. Eredményeink arra utalnak, hogy a granulocyták csökkent szuperoxid-termelése elsődlegesen nem a gazdaszervezet daganatos progresszióra adott immunválaszának megnyilvánulása. Sokkal valószínűbb, hogy a granulocyták károsodott szuperoxid-anion termelése teremtett kedvező feltételt a daganat kialakulásához. A korai eseteknél a műtéti preparátumok mikroszkópos vizsgálata is igazolja, hogy a daganat nem terjed túl a kiindulási szervezen.

Az a tény, hogy a polimorfonukleáris sejtek csökkent szuperoxid-anion termelése már a tumor progresszió igen korai fázisában kimutatható, arra utal, hogy a károsodott immunválasz nem a tumor progresszió eredménye. Ez szemben áll az állatkísérletek alapján született feltételezéssel, mely szerint a reaktív oxigéngyökök csökkent termelése csak a betegség előrehaladásával alakul ki. Az endometrium carcinoma felismerésekor mért értékekhez képest jelentős javulást mutattunk ki gyógyult betegekben. Ennek ellenére a kezelés előtti és a kezelés utáni értékek is alacsonyabbak voltak, mint a kontrolloké. Eredményeink arra utalnak, hogy a nem specifikus immunválasz károsodása elsődleges szerepet játszhat az endometrium carcinoma kialakulásában és klinikai manifestációjában. Adataink alapján az endometrium carcinoma korai stádiumában már kialakult a nem specifikus védekező rendszer előrehaladott károsodása. További vizsgálatokat igényel annak el-

döntése, hogy a granulocyták szuperoxid-anion termelését hogyan lehet normalizálni, s ennek van-e jelentősége a prevencióban és a terápiában.

Köszönetnyilvánítás A vizsgálatokra a DOTE Mecenatúra Grant 6/96 valamint az OTKA-17002 támogatásával került sor.

Irodalom

- [1] Doszpod J, Sasvári M, Erdei J, Murányi Z, Nyakas Cs. A prenatális hypoxia hatása a magzatok antioxidáns védekező rendszerének állapotára köldökvér vizsgálatok alapján. *Magy Nőorv L* 1995; 58:261–265.
- [2] Doszpod J, Sasvári M, Murányi Z, Erdei J, Nyakas Cs. A magzat intrauterin retardációja és az oxidatív stressz. *Magy Nőorv L* 1997; 60:437–441.
- [3] Troll W, Frenkel K, Teebor G. Free oxygen radicals: necessary contributors to tumor promotion and cocarcinogenesis. *Princess Takamatsu Symp* 1983; 14: 207–218.
- [4] Witzman SA, Weitberg AB, Clark EP, Stossel TP. Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 1985; 227: 1231–1233.
- [5] Weiss SJ, Slivka A. Monocyte and granulocyte-mediated tumour cell destruction. A role for the hydrogen peroxide-myeloperoxidase-chloride system *J Clin Invest* 1982; 69:255–262.
- [6] Dallegri F, Frumento G, Patrone F. Mechanisms of tumour cell destruction by PMA activated human neutrophils. *Immunology* 1983; 48:273–279.
- [7] Fumarulo R, Riccardi S, Restaino A, Giordano D. Effect of cisplatin on the oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes in cancer patients. *Tumori* 1984; 70:227–229.
- [8] Szűcs S, Kávai M, Varga C, Kertai P, Pocsai Z, Karányi Z, Ádány R. Changes in superoxide anion production and phagocytosis by circulating neutrophils during tumor progression in a rat model. *Cell Immunol* 1996; 170:202–211.
- [9] Hara N, Ichinose Y, Asoh H, Yano T, Kawasaki M, Ohia M. Superoxide anion generating activity of polymorphonuclear leukocytes and monocytes in patients with lung cancer. *Cancer* 1992; 69:1682–1687.
- [10] Shigemitsu Y, Saito T, Kinoshita T, Katsuta T, Shimoda K, Kobayashi M. Factors related to impaired bactericidal activity in patients with esophageal cancer. *Surg Today* 1995; 25:302–306.
- [11] Szűcs S, Vámosi G, Póka R, Sárváry A, Bárdos H, Balázs M, Kappelmayer J, Ádány R. Single-cell measurement of superoxide anion and hydrogen-peroxide production by human neutrophils with digital imaging fluorescence microscopy. *Cytometry* 1998; 33:19–31.

Póka R, Szűcs S, Ádány R, Szikszay E, Bor-sos A: *Superoxide-anion production of granulocytes of endometrial cancer patients*

The authors have studied the superoxide anion production of granulocytes from endometrial cancer patients before and after treatment. Polymorphonuclear leukocytes have been separated from peripheral blood samples by density gradient sedimentation. The cells were stimulated with phorbol-dibutyrate and their superoxide-anion production was measured by spectrofluorimetry as superoxide-dismutase inhibitable reduction of ferricytochrome c absorbance. The mean superoxide-anion production of granulocytes from 31 healthy controls was 1.541 nM/min/10⁵ cells (SD= 0.201 nM/min/10⁵ cells). Samples from patients showed significantly reduced superoxide-anion production. PMNL activity was found to be already reduced in the earliest stage of disease (1.112 nM/min/10⁵ cells). The depth of myometrial invasion showed no correlation with the superoxide-anion production of the granulocytes. More than one year after completion of the treatment nine patients with no evidence of disease had significantly improved superoxide-anion production (1.357 nM/min/10⁵ cells), however it still remained below the normal mean level.

Key words: endometrial cancer, granulocytes, superoxide-anion

Közlésre elfogadva: 1999. április 12.