

## Nőgyógyászati rosszindulatú daganatos betegek gyűjtőeres-vér granulocitáinak szuperoxid-anion termelése

PÓKA RÓBERT DR.<sup>1</sup>, SZÜCS SÁNDOR DR.<sup>2</sup>, ÁDÁNY RÓZA DR.<sup>2</sup>, SZIKSZAY EDIT DR.<sup>3</sup>

Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika<sup>1</sup>, Közegészségtani Intézet<sup>2</sup>, Gyermekgyógyászati Klinika<sup>3</sup>,  
Debreceni Orvostudományi Egyetem, Debrecen

**ÖSSZEFOGLALÁS** A szerzők 58 nőgyógyászati daganatos betegből származó mintában vizsgálták a szemcsés-fehérvérsejtek (granulociták) szuperoxid-anion termelését, és összehasonlították az egészséges nőkben mért értékekkel. A phorbol-dibutyrráttal serkentett szuperoxid-anion termelést spektrofotometriás módszerrel vizsgálták, és a ferricitokrom-c megkötésének szuperoxid dizmutázzal gátolható változásaként mérték. Az egészséges nőkből származó szemcsés-fehérvérsejtek átlagos szuperoxid-anion termelése  $1.855 \text{ nM/perc}/10^5$  (SD =  $0.211 \text{ nM/perc}/10^5$  sejt) volt. A betegek mintái lényegesen alacsonyabb szuperoxid-anion termelést mutattak. A betegek és az egészségesek eredményei is széles határok között változtak. Az egészséges nőkben mért átlag értékektől több mint 2SD-vel alacsonyabb szuperoxid-anion termelés gyakorisága a klinikai stádiummal párhuzamosan emelkedett. Megállapítják, hogy a nőgyógyászati daganatos betegek szemcsés-fehérvérsejtek szuperoxid-anion termelése már a betegség korai stádiumában is alacsonyabb, mint az egészségesek nőké.

**Kulcsszavak** szemcsés-fehérvérsejtek, szuperoxid-anion, nőgyógyászati rosszindulatú daganatok

**ABSTRACT** The superoxide-anion production of the granulocytes was measured in 58 gynaecological cancer patients and compared to that of healthy controls. Baseline and phorbol-dibutyrate stimulated superoxide-anion productions were measured spectrophotometrically as superoxide-dismutase inhabitable reduction of ferricytochrome-c absorbency. The mean

superoxide-anion production of the granulocytes of the healthy controls was  $1.855 \text{ nM/min}/10^5$  cells (SD =  $0.211 \text{ nM/min}/10^5$  cells). The granulocytes superoxide-anion production in gynaecological cancer patients and healthy controls varied in a wide range. Cancer patients had lower baseline and stimulated activity than those of healthy volunteers. The frequency of a mean superoxide-anion production at least 2SD below the control showed a parallel increase with advanced stages. It is concluded that the granulocytes of the gynaecological cancer patients have reduced capacity and their superoxide-anion production is already diminished at an early stage of the disease.

**Key words** gynaecological cancer, granulocytes, superoxide-anion

**BEVEZETÉS** Ismert tény, hogy a reaktív oxigéngyökök szerepet játszanak a rosszindulatú daganatok kialakulásában (1-2). A reaktív oxigéngyököknek ezen túl még a baktériumok és a daganatsejtek elleni nem-sajátságos immunválaszban is igazolható szerepük van (3). A szemcsés-fehérvérsejtek (szabálytalanmagvú fehérvérsejtek, granulociták) szuperoxid-anion termelését számos enzim működése befolyásolja. A mieloperoxidáz, kataláz, citokrom-c és a szuperoxid dizmutáz enzimek szerepe a legfontosabb. Együttes hatásuk eredményezi a célsejt pusztulását (4).

Bár emberi daganatokban igen kevés adat áll rendelkezésre, az eddigi vizsgálatok arra utalnak, hogy a reaktív oxigéngyökök termelése nőgyógyászati daganatokban is összefügg a betegség kiterjedésével. A szemcsés-fehérvérsejtek szuperoxid-anion termelésének csökkenését írták le petefészekrákos betegek ciszplatín kezelése után (5). A kezelési ciklusok befejeztével a termelés normalizálódott.

Állatkísérletes modellben a forbol-mirisztát-acetáttal kiváltott szuperoxid-anion termelés a daganatos betegség kezdetén

Levelezési cím:

Dr. Póka Róbert  
Női Klinika  
Debreceni Orvostudományi Egyetem  
4012 Debrecen, Pf. 37  
Telefon (36 52) 417144 Fax (36 52) 417171  
E-posta poka@mail.mtav.hu

emelkedett, majd a daganat növekedésével párhuzamos csökkenést mutatott (6). A szemcsés-fehérvérsejtek működésének csökkenését a daganatos betegség előrehaladása során a neutrofil fehérvérsejtek számának növekedése kísérte.

Jelen tanulmányunkban azt kívántuk megvizsgálni, hogy a fenti változások nőgyógyászati rosszindulatú daganatos megbetegedésben szenvedő nőkben is hasonlóan következnek-e be.

**ANYAG ÉS MÓDSZER** Tájékoztatót belezve követően, mindennemű kezelési beavatkozást megelőzően, éhgyomri könyök vérmintát vettünk 51 nőgyógyászati rosszindulatú daganatos betegről (23 méhnyak-, 20 méhtest-, 5 petefészek- és 3 szeméremtestrák), valamint 25 egészséges nőtől. A mintavételhez EDTA-tartalmú zárt rendszerű eszközöket alkalmaztunk. Az egészségesek között 19 szakdolgozó, 2 myoma és 2 kúrteredtetű meddőség miatt kezelt nő szerepelt. Gyógyszert egyikük sem szedett. A vérmintákat Ficoll oldatra (1.0772 g/ml) rétegeztük, és a vörösvérsejteket szobahőmérsékleten történő centrifugálással (1 g 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 200°C-on. A két Percoll réteg közé ülepedett szemcsés-fehérvérsejteket kétszer mostuk Hank's oldattal (pH 7.4). A sejtek életképességét Tripánkék festék-kizárási próbával ellenőriztük, és a sejtek 98%-a bizonyult életképesnek. Mikroszkópos vizsgálattal az oldatban 94-98% volt a szemcsés-fehérvérsejtek aránya. A vörösvérsejtek elhanyagolható mennyisége miatt hipotóniás oldásra nem volt szükség.

A szuperoxid-anion termelést a ferricitokró-m-c megkötésének szuperoxid dizmutázzal gátlható csökkenéseként mértük. A szemcsés-fehérvérsejtek ( $3 \times 10^5$ ) Hank's oldatban (pH 7.4) inkubáltuk forbol-12.13-dibutyráttal (PDBu) 15 percig 370°C-on. A minták végső térfogata 0,5 ml, a ferricytokró-m-c és a PDBu koncentrációja pedig 50 illetve 100 nmol/l volt. A megkötődés változását 550 nm-en mértük kettős sugarú Shimadzu UV-160A spektrofotométerrel (*Shimadzu Seisakusho Ltd., Kyoto, Japan*) 250°C. Az oldatba kiválasztott szuperoxid-anion mennyiségét a redukált ferricitokró-m-c moláris extinkciós koefficiense ( $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) alapján számítottuk ki. A szuperoxid-anion termelést jelentősen csökkentenek tekintettük, ha az nem érte el az egészségesek átlagától 2SD-vel alacsonyabb értéket.

A nőgyógyászati daganatok stádium beosztásában a jelenleg érvényben lévő FIGO ajánlásokat követtük. A viszonylag alacsony esetszámok miatt az alstádiumokra való bontást mellőztük.

A Student-féle t-próbát alkalmaztuk a folytonos változók átlagértékeinek összehasonlítására. A  $p < 0.05$  különbséget tekintettük szignifikánsnak.

**EREDMÉNYEK** Az egészséges nők szemcsés-fehérvérsejtjeinek átlagos szuperoxid-anion termelése 1,855 nM/perc/ $10^5$  sejt volt

(SD = 0,211 nM/perc/ $10^5$  sejt). A nőgyógyászati rosszindulatú daganatban szenvedő betegek szemcsés-fehérvérsejtjeinek szuperoxid-anion termelése 0,317 és 1,825 nM/perc/ $10^5$  sejt értékek között változott. A betegekből származó szemcsés-fehérvérsejtek ingerelt tevékenységének átlaga lényegesen alacsonyabb volt (1,149 nM/perc/ $10^5$  sejt, SD = 0,399 nM/perc/ $10^5$  sejt), mint az egészséges nőké. A különböző nőgyógyászati rosszindulatú daganatban szenvedő betegek szemcsés-fehérvérsejtjeinek stádiumfüggő szuperoxid-anion termelését az 1. táblázat mutatja be. Átlag értéktől több mint 2SD-vel alacsonyabb értékek gyakorisága a klinikai stádium emelkedésével párhuzamosan növekedett. Az I, II, III és IV stádiumú esetek között sorrendben 62,5, 75, 90 és 100%-ban fordult elő lényegesen csökkent szemcsés-fehérvérsejtek működés. A stádium előrehaladásával párhuzamosan csökkenő átlagos szuperoxid-anion termelés szintén megfigyelhető volt (1. táblázat).

1. táblázat A szemcsés-fehérvérsejtek átlagos szuperoxid-anion termelése nőgyógyászati daganatok különböző stádiumaiban (nM/perc/ $3 \times 10^5$  sejt)

Stádium	Szeméremtestrák (3)	Petefészekrák (5)	Méhtestrák (20)	Méhnyakrák (23)
I	–	–	1,204 (16)	1,303 (7)
II	0,984 (2)	–	0,967 (4)	1,398 (5)
III	0,899 (1)	1,120 (2)	–	1,033 (9)
IV	–	0,830 (3)	–	0,317 (2)

Az esetszámokat zárójelben tüntettük fel. Egészséges nők átlaga = 1,855 SD = 0,211 (25)

**MEGBESZÉLÉS** A reaktív oxigéngyökök fontos szerepet játszanak mind a mikroorganizmusok, mind pedig a rosszindulatú daganatok elleni védekezésben (1, 7). Állatkísérletek eredményei elmentmondó adatokat szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy a szemcsés-fehérvérsejtek szuperoxid-anion termelése hogyan változik a daganatos betegség folyamán. Kísérletek igazolták, hogy a reaktív oxigéngyökök nemcsak a rák kialakulásában, hanem a daganatsejtek elpusztításában is részt vesznek. Állatkísérletben a szemcsés-fehérvérsejtek szuperoxid-anion termelése csökkent a betegség előrehaladásával (6). Emberben végzett vizsgálatok szintén azt mutatták, hogy a szemcsés-fehérvérsejtek reaktív oxigéngyök termelése csökkent gyomorbél daganatokban és tüdőrákban, bár az irodalomban fokozott szemcsés-fehérvérsejtek működéséről szóló tanulmány is előfordul (7-8). Ciszplatin-alapú gyógyszeres kezelésben részesülő petefészek- és méhnyakrákos betegeknél a szuperoxid-anion termelés kezeléseket követő rövid tartamú csökkenését írták le (5). A kezelési szakaszok befejeztével a szemcsés-fehérvérsejtek működése visszatért az eredeti szintre, vagy azt meg is haladta.

Tudomásunk szerint eddig még nem vizsgálták a szemcsés-fehérvérsejtek szuperoxid-anion termelését nőgyógyászati daga-

natok különböző stádiumaiban. Eredményeink szerint a nőgyógyászati daganatos betegek szemesés-fehérvérsejtjeinek szuperoxid-anion termelése széles határok között változik (0,317-1,825 nM/perc/ $10^5$  sejt). A betegek szemesés-fehérvérsejtjeinek serkentést követő működése lényegesen alacsonyabb, mint az egészséges nőké (1,149 illetve 1,855 nM/perc/ $10^5$  sejt). A szemesés-fehérvérsejtek szuperoxid-anion termelését számos tényező befolyásolja, melyek között legfontosabbak a pH, az elektrolitok és tápanyagok szérumban-koncentrációja. Daganatos betegségekben ezek a tényezők csak előrehaladott stádiumban változnak meg jelentősen. Vizsgálatainkat csak azon betegekre korlátoztuk, akiknek az általános állapota jó volt, tehát az említett tényezők lényeges eltérése a szokásos szérumban biokémiai vizsgálatokkal is kizárható volt. A szemesés-fehérvérsejtek működésének vizsgálatára még a kivizsgálás idején került sor, tehát akkor, amikor a betegek még kezelésben nem részesültek. Az egészségesek átlagos szuperoxid-anion termelésétől legalább 2SD-vel kisebb értékek gyakorisága a betegség stádiumával párhuzamos emelkedést mutatott. Még igen korai stádiumú esetekben is, mint például I stádiumú méhnyak- és méhtráék, kimutatható volt a szemesés-fehérvérsejtek csökkent szuperoxid-anion termelése. Ezekben az esetekben a betegség klinikailag és kórszövettanilag is a kiindulási szervben helyezkedett el, amit a műtéttel eltávolított szövetek mikroszkópos vizsgálata is igazolt. Valóban, a vizsgált I stádiumú méhnyakrákos betegek egyikénél sem igazolódott nyirokcsomó áttét.

Az a tény, hogy a szemesés-fehérvérsejtek csökkent szuperoxid-anion termelése már a daganat képződés igen korai szakaszában kimutatható, arra utal, hogy a károsodott immunválasz nem a daganatos növekedés eredménye. Ez szemben áll az állatkísérletek alapján született feltételezéssel, mely szerint a reaktív oxigéngyökök csökkent termelése csak a betegség előrehaladásával alakul ki. Eredményeink arra utalnak, hogy a nem-sajátságos immunválasz károsodása elsődleges szerepet játszhat a rosszindulatú daganat klinikai megnyilvánulásában. Adataink alapján a nőgyógyászati rosszindulatú daganatoknak már a korai stádiumában jelen van a nem-specifikus védekező rendszer előrehaladott károsodása.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a nőgyógyászati rosszindulatú daganatos betegek szemesés-fehérvérsejtjei csökkent szuperoxid-anion termelést mutatnak. A szemesés-fehérvérsej-

tek csökkent működését már igen korai stádiumú, jó kórjóslatú esetekben is ki tudtuk mutatni. Eredményeink arra utalnak, hogy a károsodott szemesés-fehérvérsejt működés már a betegség korai szakaszában kialakul, és a betegség előrehaladásával már csak kis mértékben esökken tovább. Az általunk alkalmazott szemesés-fehérvérsejt működési módszer alkalmazásának klinikai jelentősége lehet olyan esetekben, amikor veszélyeztetett egyének között, még a klinikailag nem felismerhető szakaszában próbáljuk igazolni a kialakulóban lévő betegséget. A vizsgálat hasznos lehet továbbá a betegek állapotának nyomon követésére is. Nyomon követéses vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy a feltételezett változásokat egy-egy beteg esetében igazoljuk.

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

#### IRODALOM

1. Troll W, Frenkel K, Teebor G. Free oxygen radicals: necessary contributors to tumor promotion and cocarcinogenesis. Princess Takamatsu Symp 1983; 14:207-218.
2. Weitzman SA, Weitberg AB, Clark EP, Stossel TP. Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. Science 1985; 227:1231-1233.
3. Weiss SJ, Slivka A. Monocyte and granulocyte-mediated tumor cell destruction. A role for the hydrogen peroxide-myeloperoxidase-chloride system. J Clin Invest 1982; 69:255-262.
4. Dallegri F, Frumento G, Patrone F. Mechanisms of tumour cell destruction by PMA-activated human neutrophils. Immunology 1983; 48:273-279.
5. 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.
6. 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.
7. Hara N, Ichinose Y, Asoh H, Yano T, Kawasaki M, Ohta M. Superoxide anion-generating activity of polymorphonuclear leukocytes and monocytes in patients with lung cancer. Cancer 1992; 69:1682-1687.
8. 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.