

* *Debreceni Orvostudományi Egyetem Fül-orr-gégeklinika*

(igazgató: Lampé István dr. egyetemi tanár) és

** *Verzár Frigyes Nemzetközi Kísérletes Gerontológiai Laboratórium*

Magyar Szekciója, Debrecen (igazgató: Zs.-Nagy Imre dr. c. egyetemi tanár)

Gégetumорок intracelluláris Na^+/K^+ arányának meghatározása energia-diszperzív röntgen-mikroanalízissel

TÓTH LÁSZLÓ DR.*, LAMPÉ ISTVÁN DR.*, SZÁLLÁSI ZOLTÁN** és
ZS. NAGY IMRE dr.**

Közlésre érkezett 1986. április 6.

Méréseinket 19 gégeszövetmintán végeztük, melyekből 15 carcinoma planocellularis és 4 nem tumoros kontroll volt. Gégeeltávolítás, mikrolaryngosopia és lokális anesztéziában történt próbakimetszéssel vettünk mintát. A fagyasztvatörés, fagyasztvaszarítás révén végzett előkészítés után energiadiszperzív röntgen-mikroanalízissel mértük a monovalens ionkoncentrációt adott térfogatban intracellularisan. A kapott intracelluláris Na^+/K^+ arányt összevetve a szövettani diagnózissal, szignifikáns kapcsolatot találtunk e hányados nagysága és a malignitás között. A vizsgálatok emberi urogenitális és pajzsmirigy tumorok után emberi gégetumорокban is bizonyítják, hogy a malignitás emelkedett intracelluláris Na^+/K^+ aránnyal jár. Ismertetjük ezen tény esetleges gyakorlati hasznosításával kapcsolatos lehetőségeket.

A gége rosszindulatú daganatainak előfordulása fokozatosan növekszik. A diagnosztikus lehetőségek fejlődésével a tumoros folyamatot esetleg még a makroszkópos elváltozás megjelenése előtt ki lehet mutatni.

Vizsgálataink alapján Cone 1971-ben közölt elmélete képezi [3]. Teóriája a normál és daganatos sejtosztódás kontrolljának mechanizmusát tárgyalja. Szoros összefüggést találtak a sejtmembrán működése és a mitotikus aktivitás szabályozása között [4, 5]. Cone [3] szerint a sejtmembrán tartós depolarizációja olyan sejtleletani változásokat indít meg, melyek a sejt osztódásához vezetnek. A tartós depolarizáció az intracelluláris térben emelkedett Na^+ szinttel és valamelyest csökkent K^+ tartalommal jár.

A röntgen mikroanalitikai módszer lehetővé tette a sejten belüli elemek, monovalens ionok koncentrációjának direkt mérését. Normál sejtekben [1, 2, 13, 14], invazíve növekvő humán urogenitális carcinómákban [17] és különböző malignitási fokú pajzsmirigy tumorban [9] már vizsgálták az intracelluláris Na^+/K^+ arány változását. Az eddig vizsgált humán tumorokban igazolták, hogy tumoros szövetben jelentősen megemelkedett az intracelluláris Na^+/K^+ arány. Az arány emelkedéséből tehát következtetni lehet a sejtek malignus transzformációjára. Vizsgálatunk célja, hogy gégetumорок esetén is bizonyítsuk a megemelkedett Na^+/K^+ hányados kórjelző szerepét.

Anyag és módszer

Mintavétel: A humán tumorokból nyert biopsiás anyagoknak az alábbi szigorú kritériumoknak kell megfelelniük, hogy alkalmasak legyenek röntgen mikroanalitikus Na^+/K^+ koncentráció meghatározásra:

- a) A mintavételre csak olyan beteg alkalmas, aki nem részesült sugárkezelésben, és nem kapott citosztatikus kezelést.
- b) Részletes szövettani vizsgálat adja a pontos diagnózist.

- c) A kivett anyag mechanikusan és metabolikusan is ép legyen. A kivétel és a minta folyékony nitrogénes fagyasztása között legfeljebb 1 perc telhet el.
- d) A mintavétel indikációja a malignitás gyanúja.
- e) A kontroll minta kivételének feltételei azonosak a vizsgált mintáéval.
- A fenti kritériumoknak megfelelnek az általunk vizsgált laryngealis tumorok.

A mintavétel:

1. Gégeeltávolítás során még részleges vérellátással rendelkező gégeből;
2. mikrolaryngoscopiás vizsgálati anyagból;
3. lokális anesztéziában történő próbakimetszés során történt.

Az eltávolított anyag fele rutin patohisztológiai vizsgálatra került, a másik felét használtuk mikroanalízisre.

Anyag: A mintavételt 18 betegnél végeztük 19 esetben. Mind férfiak voltak, korban 39 és 81 év között. 15 esetben carcinoma laryngis, míg 4 esetben nodulus laryngealis volt a patohisztológiai diagnózis. Ez utóbbi eseteket kontrollcsoportként használtuk. 12 esetben a szövettani diagnózis carcinoma planocellulare volt, 3 mintában pedig cc. planocellulare keratoides diagnózist kaptunk, míg néhány esetben diszkeratózis jeleit is megfigyelhettük. A tumoros betegek átlag életkora $55,5 \pm 9,6$ év volt. Egyik betegnél a különböző időpontban vett két minta szövettani diagnózisa, és a Na^+/K^+ arány is eltérő volt. A tumoros folyamat nagysága a betegeknél a hangszalag érintettségtől a sinus piriformist kitöltő nyaki metasztatizis folyamatig terjedt.

Röntgen mikroanalízis: A biopsziás anyagot energia-diszperzív röntgen-mikroanalízissel vizsgáltuk. A kivétel után 1 percen belül folyékony nitrogénben -160°C -ra fagyasztott mintát a továbbiakban a freeze-fracture, freeze-drying (FFFD) módszerrel készítettük elő. FFFD (fagyasztva-törés, fagyasztva szárítás) módszer lényege, hogy még fagyott állapotban a mintát eltörjük, így a törési felszínen intakt belső sejtkompartmenek tárulnak fel. A továbbiakban a mintát JEOL JEE-4X típusú „vákuum-szárítóval” fagyasztva szárítjuk 4×10^{-6} Torr nyomáson 5 órán keresztül, -80 , -100°C -on, s további 2 óráig szobahőmérsékleten. A mérés megkezdéséig az így előkészített anyagot vákuum alatt tartottuk.

A mérés menete: A metodika csak a sejtmag, a citoplazma és a sejthatárok elkülönítését teszi lehetővé. A sejtek ionkoncentrációjának mérése *Zs.-Nagy* és *mtsai* [15] által kidolgozott módszer szerint történt, amelynek leírása az urogenitális [17], és a pajzsmirigy tumorokról [9, 18] szóló közleményekben megtalálható. A JEOL JESM—35C—EDAX system F műszeregyüttesben kapott röntgen spektrumokat (1., 2. ábra) számítógép segítségével értékeltük, a *Hall* és *mtsai* [7] által bevezetett csúcs/háttér formula alapján. Egyéb, a kvantitatív számításra vonatkozó részletek megtalálhatók a korábbi közleményekben [15, 18, 17]. A mag becsült víztartalmára vonatkoztatott monovalens ionkoncentrációkat, továbbá a Na^+/K^+ hányadost számítottuk ki. A kapott eredményeket statisztikailag értékeltük (Student „t” teszt, χ^2 teszt).

Eredmények

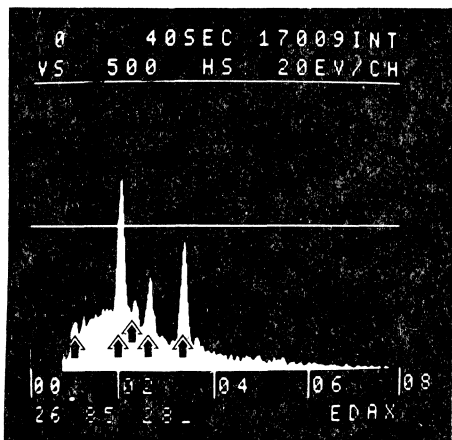
Az FFFD előkészítés után kapott felszín röntgen mikroanalízis céljára alkalmas, de mivel nem gőzöltük semmilyen vezető réteggel, pásztázósugaras elektronmikroszkópos morfológiai tanulmányozásra nem ideális. A gége hámszövetének jellegzetes morfológiai képe mégis felismerhető. A tumoros szövetet polimorfizmus, szegényes intercelluláris kapcsolódás, irregularis struktúra jellemzi. Fontos, hogy a nekrotikus sejteket a vizsgálatból kizárjuk: A sejtmag

nem ismerhető fel, nincs extra- és intracellularis iongradiens, magas Ca^{++} koncentráció van. Gégetumorok esetén a nekrotikus sejtek aránya alacsony ($<5\%$) volt.

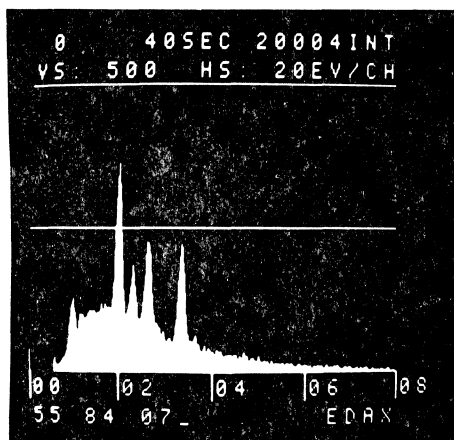
A vizsgált 18 beteg 19 mintájából 15 volt tumoros a szövettani diagnózis szerint is, míg 4 nem.

A tumoros mintákból 641 sejtben, míg a kontrollcsoportnál 135 sejtben történt mérés. Az 1—2. ábrán egy normál ill. egy tumoros minta röntgen spektruma látható.

A tumoros sejtek intracellularis Na^+/K^+ koncentráció hányadosa sokkal magasabb a normál sejtekénél. A normál sejtek $0,13 \pm 0,01$ ionarányával szemben tumoros sejtek esetében $0,67 \pm 0,03$ a Na^+/K^+ arány. A normál és tumoros szövetekben talált Na^+/K^+ arány eloszlási hisztogramját a 3. ábra mutatja. A hisztogramok közötti statisztikai összehasonlítás χ^2 teszttel szignifikáns különbséget mutatott ($p < 0,001$). Eredményeink jól mutatják a kapcsolatot a minták kórszövettani malignus diagnózisa és az átlagos intracellularis Na^+/K^+ arány nagysága között. Az arány növekedését elsősorban a Na^+ intracellularis megemelkedése, és sokkal kisebb mértékben a K^+ tartalom csökkenése okozza. A tumoros hisztogramon a sejtek egy részében még normális értékű a Na^+/K^+ hányados, míg másokban jelentősen emelkedett ez a hányados.



1. ábra. Nem tumoros gégeszövet egy hámsejtjéről készült jellegzetes rtg spektrum. A nyílak balról sorrendben a Na^+ , foszfor, kén, Cl^- és K^+ csúcsokat jelzik



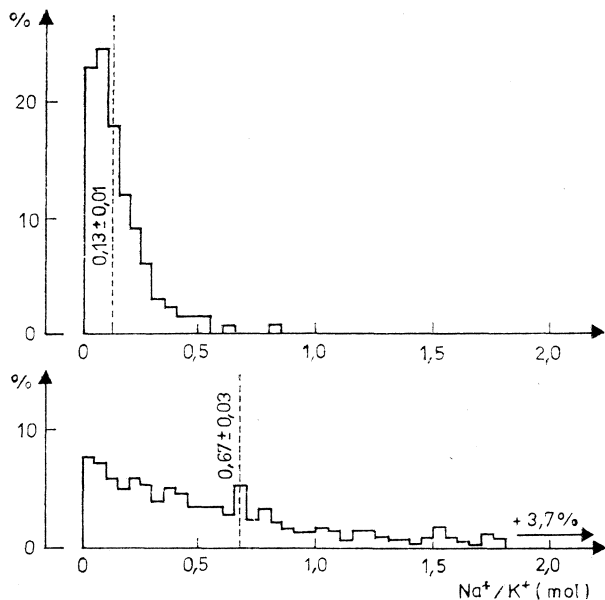
2. ábra. Tumoros gégeszövet egy hámsejtjéről készült rtg. spektrum. Jellegzetes a magas Na^+ csúcs

Megbeszélés

Mérési eredményeink az eddig még nem vizsgált gégetumorok esetében is igazolják a tumor malignitásának és az intracellularis Na^+/K^+ hányadosának korrelációját. A hányados növekedését elsősorban az intracellularis Na^+ emelkedése okozza. A K^+ csökkenése sokkal kisebb mértékű. A Na^+ növekedését sejten belüli tumoros folyamatok esetén állatkísérletekben [1, 2, 13, 14], humán urogenitalis tumorokban [17] és pajzsmirigy tumorokban [9, 18] is igazolták. Az intracellularis Na^+ szint emelkedésének mechanizmusa malignusan transzformált sejtekben még ismeretlen. Elvileg két mechanizmus képzelhető el, akár együttesen is:

1. a membránhoz kötött $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dependens ATP-ase (a „pumpa”-enzim károsodik),
2. a sejtmembrán Na^+ -permeabilitása nő, amit nem tud kompenzálni a $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ „pumpa” működése.

Állatkísérletekben a karcinogénnel indukált májrákban a legkorábban detektálható hisztokémiai eltérés a „pumpa”-enzim működésének megszűnése [6].



3. ábra. A nem tumoros (felső) és a tumoros (alsó) gégeszövetből származó sejtek adatait ábrázoló hisztogram. A vízszintes tengelyen a Na^+/K^+ mólarány, a függőleges tengelyen a százalékos megoszlás látható. Feltüntetjük a sejtek átlagos Na^+/K^+ mólarányát és a standard errort is. Az alsó hisztogram jobb oldalán a nyíl feletti szám jelzi, hogy a sejtek 3,7 %-a esik még a nem ábrázolt tartományba

Emberi pajzsmirigy carcinoma esetén a Na^+/K^+ „pumpa”-enzim aktivitása jelentősen (kb. 10-szeresre) növekedett [10]. Az emelkedett intracelluláris Na^+ -szint megváltoztatja számos vonatkozásban a sejt metabolikus aktivitását [16]. Több adat szól a magas intracelluláris Na^+ -szint és a sejtosztódás megindulása közti oki kapcsolatról in vitro kísérletekben [8, 11, 12]. Ezen elméleti kérdéseknek nagyon fontos klinikai vonatkozásai is lehetnek, ha sikerül bizonyítani a sejtmembrán Na^+ -permeabilitásának szerepét a karcinogenezisben. A makroszkóposan még épnek tűnő szövet megemelkedett Na^+/K^+ aránya már utalhat a kórosan megváltozott sejtfunkcióra, a tumoros átalakulásra. Terápiás jelentőségű lehet a jövőben, ha kétségtelenül tisztázódik a specifikus Na^+ beáramlást gátló vegyület, az amilorid (esetleg újabb molekulák) szerepe. Ez esetben specifikus Na^+ -csatorna blokkolókkal gátolni lehetne malignus folyamatban a sejtosztódást. In vitro és in vivo körülmények között laboratóriumban már sikerült gátolni a sejtproliferációt és a rákos sejtek növekedését is [8, 11, 12].

IRODALOM: 1. *Cameron, I. L. and Smith, N. K. R.*: Energy dispersive X-ray microanalysis of the concentration of elements in relation to cell reproduction in normal and cancer cells. *Scanning Electron Microsc.*, 2, 463—474, (1980). — 2. *Cameron, I. L., Smith, N. K. R., Pool, T. B. and Sparks, R. L.*: Intracellular concentration of sodium and other elements are related to mitogenesis and oncogenesis in vivo. *Cancer Res.*, 40, 1493—1500, (1980). — 3. *Cone, C. D. jr.*: Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. *J. theor. Biol.*, 30, 151—181, (1971). — 4. *Cone, C. D. jr. and Tongier, M.*: Contact inhibition of division: involvement of the electrical transmembrane potential. *J. Cell. Physiol.* 82, 373—386, (1973). — 5. *Cone, C. D. jr. and Cone, C. M.*: Introduction of mitosis in mature neurons in central nervous system by sustained depolarization. *Scienc* (Wash. D. C.), 192, 155—158, (1976). — 6. *Emmelot, P. and Scherer, E.*: The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis. A quantitative approach. *Biochim. Biophys. Acta*, 605, 247—304, (1980). — 7. *Hall, T. A., Clarke-Anderson, M. and Appleton, T.*: The use of thin specimens for X-ray microanalysis in biology. *J. Microsc.* (Oxford), 99, 177—182, (1973). — 8. *Koch, K. S. and Leffert, H. L.*: Increased sodium ion influx is necessary to initiate rat hepatocyte proliferation. *Cell*, 18, 153—163, (1979). — 9. *Lukács, G., Zs.-Nagy, I., Lustyik, Gy. and Balázs, Gy.*: Microfluorimetric and X-ray microanalytic studies on the DNA-content and Na^+/K^+ ratios of the cell nuclei in various thyroid tumors. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, 105, 1280—1284, (1983). — 10. *Mizukami, X., Matsubara, F. and Matsukawa, S.*: Changes in localization of ouabain-sensitive, potassium-dependent-p-nitrophenyl-phosphatase activity in human thyroid carcinoma cells. *Lab. Investig.*, 48, 411—418, (1983). — 11. *Moolenaar, W. H., Mummery, C. L., Van Der Saag, P. T. and De Laat, S. M.*: Rapid ionic events and the initiation of growth in serum-stimulated neuroblastoma cells. *Cell*, 23, 789—798, (1981). — 12. *Mummery, C. L., Boonstra, J., Van Der Saag, P. T. and De Laat, S. M.*: Modulations of Na transport during the cell cycle of neuroblastoma cells. *J. Cell Physiol.* 112, 27—34, (1982). — 13. *Smith, N. K. R., Rozenqurt, E.*: Serum stimulates the Na^+ , K^+ pump in quiescent fibroblast by increasing Na^+ entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 5560—5564, (1978). — 14. *Smith, N. K. R., Sparks, R. L., Pool, T. B. and Cameron, I. L.*: Differences in the intracellular concentration of elements in normal and cancerous liver cells as determined by X-ray microanalysis. *Cancer Res.*, 38, 1952—1959, (1978). — 15. *Zs.-Nagy, I., Pieri, C., Giuli, C., Bertoni-Freddari, C. and Zs.-Nagy, V.*: Energy dispersive X-ray microanalysis of the electrolytes in biological bulk specimen. I. Specimen preparation, beam penetration and quantitative analysis. *J. Ultrastruct. Res.* 58, 22—33, (1977). — 16. *Zs.-Nagy, I.*: The role of membrane structure and function in cellular aging: A review. *Mech. Ageing Dev.*, 9, 237—246, (1979). — 17. *Zs.-Nagy, I., Lustyik, Gy., Zs.-Nagy, V., Zarándi, B. and Bertoni-Freddari, C.*: Intracellular Na^+/K^+ ratios in human cancer cells as revealed by energy. *J. Cell. Biol.* 90, 769—777, (1981). — 18. *Zs.-Nagy, K., Lustyik, Gy., Lukács, G., Zs.-Nagy, V. and Balázs, Gy.*: Correlation of malignancy with the intracellular Na^+/K^+ ratio in human thyroid tumors. *Cancer Res.*, 43, 5395—5402, 1983.

Л. Тот, И. Лампе, З. Саллаши, И. Ж.-Надь: *Определение внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ в опухолевой ткани гортани энергия-дисперсным*

Авторы определяли внутриклеточное содержание моновалентных ионов в образцах опухолевых тканей у больных с опухолью гортани, пользуясь энергия-дисперсным рентген-микроанализом. Образцы тканей получали в случаях удаления гортани, микроларингоскопии и при биопсиях, произведенных под локальной анестезией. Из 19 проб 15 были опухолевыми, 4 являлись контролем. Выявилась корреляция между повышенным при опухоли соотношением внутриклеточных Na^+/K^+ и степенью малигнизации. Исследования и в случае опухоли гортани подтверждают, уже описанное для других человеческих опухолей, повышение соотношения Na^+/K^+ внутри клетки, сопровождающее малигнизацию.

L., Tóth, I. Lampé, Z. Szállási, I. Zs., Nagy: *Determination of ratio of intracellular Na^+/K^+ in laryngeal tumours with energy-dispersive X-ray microanalysis*

The authors determined the intracellular monovalent ion-concentration of histological samples gained from patients with laryngeal tumours, with the energy-dispersive X-ray microanalysis-method. The sample was taken in the course of laryngeal ablation, micro-laryngoscopy and getting specimen in local anesthesy. 15 of 19 were tumorous, till 4 were controls. The authors found correlation between increased intracellular Na^+/K^+ quotient of tumorous processes and, malignancy. These investigations also prove the still published increase of intracellular Na^+/K^+ in other human malignancies.

L. Tóth, I. Lampé, Z. Szállási und, I. Zs. - Nagy: *Die Bestimmung des intrazellulären Na⁺/K⁺-Verhältnisses mit der Energie-dispersiven Röntgen-Mikroanalyse bei Kehlkopftumoren*

An Gewebeprouben aus Kehlkopftumoren bestimmten die Verff. den intrazellulären monovalenten Ionengehalt mit Hilfe der Energie-dispersiven Röntgen-Mikroanalyse. Die Proben stammten aus exstirpierten Kehlköpfen oder wurden in Mikro laryngoskopie bzw. Lokalanaesthesie als Probeexzision entnommen. 15 von 19 Proben waren Tumoren, 4 dienten als Kontrollgruppe. Es wurde eine Korrelation zwischen dem intrazellulären Na⁺/K⁺-Verhältnis und der Malignität gefunden. Die Untersuchungen bestätigen den bei anderen humanen Tumoren bereits beschriebenen Anstieg der intrazellulären Na⁺/K⁺-Relation auch für die Kehlkopftumoren.

HÍREK

**A Magyar Fül-orr-gégeorvosok Egyesülete 32. kongresszusát rendezi
Budapesten, nemzetközi részvétellel**

1987. augusztus 26—28. között

- Fő témák: 1. Műtéti hallásjavítás
2. Az orr és melléküregei megbetegedései és kezelésük
3. Szabadon választott témák

A kongresszus helye: Semmelweis Orvostudományi Egyetem Elméleti Tömb
(Budapest, VIII., Nagyvárad tér 4.)

Hivatalos nyelvek: angol, német, magyar