

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXIII, 12

SECTIO D

1968

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr med. Tomasz Borkowski
Wojewódzki Szpital Onkologiczny w Lublinie
Dyrektor: doc. dr med. Mieczysław Kwiatkowski

Maria SANECKA-OBACZ, Zbigniew STELMASIAK
i Stanisława ŻURAWSKA-POLESZAK

**Wydalanie związków indolowych w moczu kobiet chorych na raka
szyjki macicy**

Выделение индоловых соединений в моче женщин, больных раком шейки матки

The Excretion of Indoles in the Urine of Cancerous Patients

Zainteresowanie związkami indolowymi datuje się od momentu ustalenia chemicznej struktury serotoniny jako pochodnej tryptofanu (4, 16). Dalszym bodźcem do badań nad metabolizmem tryptofanu było spostrzeżenie zwiększonego wydalania kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5, 13) oraz 5-hydroksytryptaminy (10) z moczem w chorobach nowotworowych.

Związkiem macierzystym dla wszystkich naturalnych związków indolowych wydalanych z moczem jest tryptofan (3). W normalnych warunkach tylko 1% egzogenego tryptofanu ulega utlenieniu do 5 hydroksyindoli, podczas gdy w chorobach nowotworowych na tej drodze metabolizowane jest około 60% tego aminokwasu (17). Niektóre zmiany w wydalaniu związków indolowych mogą być spowodowane wrodzonymi zaburzeniami metabolizmu. W fenyloketonurii stwierdzono zwiększone wydalanie kwasu indolomlekowego (1) oraz zmniejszoną zawartość kwasu 5-hydroksyindolooctowego w moczu (1, 6, 14). W chorobie Hartnupa obserwowano znaczne wydalanie kwasu indolooctowego oraz indykanu (6).

Badanie związków indolowych w chorobach nabytych było również tematem prac wielu autorów. Między innymi Oka i Leppänen (11) badali metodą chromatografii bibułowej związki indolowe w różnych chorobach wewnętrznych, wykazując znaczne odchylenia od normy w przypadkach nowotworów, gruźlicy, cukrzycy oraz w chorobach nerek. Zwiększone wydalanie związków indolowych w moczu u pacjentów z rakami złośliwymi wykazali także inni autorzy (6, 18). Zmniejszone wydalanie kwasu 5-hydroksyindolooctowego stwierdzono u chorych z udarem mózgu (7), w zawale mięśnia sercowego (9) oraz w chorobie wrzodowej żołądka i dwunastnicy (15). Badano też wydalanie kwasu 5-hydroksyindolooctowego w moczu podczas ciąży i w przebiegu jej powikłań (8).

W dostępnym piśmiennictwie nie spotkaliśmy danych dotyczących wydalania

związków indolowych w moczu kobiet chorych na raka macicy. Podjęto więc badania nad wydalaniem tych związków w przypadkach raka szyjki macicy przed i po leczeniu radem oraz promieniami Rentgena.

MATERIAŁ I METODA

Oznaczenia wykonywano w moczu kobiet zdrowych i kobiet chorych na raka szyjki macicy, leczonych w Wojewódzkim Szpitalu Onkologicznym w Lublinie w latach 1960—1961. Mocz używany do badania nie zawierał składników patologicznych takich jak białko, cukier, aceton, leukocyty, eryocyty, wałeczki.

Badane podzielono na 3 grupy: I grupa — 29 kobiet zdrowych w wieku 20—30 lat, II grupa — 32 kobiety zdrowe w wieku 30—70 lat oraz III grupa — 32 kobiety chore w wieku 30—70 lat. W grupie kobiet chorych u 11 pacjentek rozpoznawano raka stopnia I, u 10 — stopnia II, a u 11 — stopnia III. Badanie histopatologiczne wykazało u 26 kobiet *carcinoma planoepitheliale*, u 5 *adenocarcinoma cylindrocellulare*, a u 1 *carcinoma spinocellulare*. U 17 kobiet chorych badanie moczu wykonano czterokrotnie: przed leczeniem, po leczeniu promieniami radu (dawka łączna radu w pochwie i jamie macicy od 48 do 60 mcd.), w połowie kuracji promieniami Rentgena (3000 r na guz) i po zakończeniu leczenia. We wszystkich przypadkach badane próbki moczu pochodziły z porcji rannej oddanej przed spożyciem pierwszego posiłku. W badaniach oparto się na metodzie podanej przez J e p s o n a (6). 100 μ l moczu nanoszono na bibułę Whatman Nr 1. Chromatogramy rozwijano techniką dwukierunkową wstępującą w układach: I — izopropanol: amoniak:woda (200:10:20) w czasie 16 godzin, II — n-butanol: kwas octowy:woda (150:30:50) w czasie 6 godzin. Wysuszone chromatogramy wywoływano przez zanurzenie w mieszaninie 1 objętości 10% p-dwumetyloaminobenzaldehydu w stężonym kwasie solnym i 4 objętości acetonu. Plamy związków indolowych odczytywano na mokrych chromatogramach, określając ich barwę i natężenie. Identyfikację przeprowadzono na podstawie: porównania z wzorcami, wyznaczania współczynnika R_f i barw charakterystycznych z odczynnikiem Ehrlicha.

Do sporządzania mapy chromatograficznej używano 1% roztworów wzorcowych związków indolowych: tryptofanu (Try), 5-hydroksytryptofanu (5-HTP), 5-hydroksytryptaminy (serotoniny — 5-HT), kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA), kwasu indolooctowego (IAA), kwasu indolopropionowego (IPA), kwasu indolomasłowego (IBA), kwasu kinureninowego (KA), tryptaminy (T) oraz bufoteny (BUF). Mapę standardowych związków indolowych ilustruje ryc. 1. Intensywność plam chromatograficznych oznaczano umownie od + do ++++.

Wyniki poddano analizie statystycznej w oparciu o test "chi kwadrat" (12). Za statystycznie istotne przyjmowano te różnice, dla których prawdopodobieństwo błędu nie przekraczało 1%.

WYNIKI BADAŃ

Celem ustalenia zależności wydalania związków indolowych od wieku porównano wyniki uzyskane w dwóch grupach wieku u kobiet zdrowych. W grupie I (29 kobiet zdrowych w wieku 20—30 lat) znajdowano od 1 do 6 plam, z przewagą chromatogramów o 4 i 5 plamach, natomiast w grupie II (32 zdrowe kobiety w wieku 30—70 lat) rozrzut wynosił

od 1 do 4 plam z przewagą chromatogramów o 2 plamach (tab. 1). Różnice w zakresie rozrzutu między tymi grupami okazały się istotne pod względem statystycznym.

Tab. 1. Rozrzut plam Ehrlicho-dodatnich na chromatogramach moczu kobiet zdrowych i kobiet chorych na raka szyjki macicy
Dispersion of the Ehrlich positive spots on the paper chromatograms in the urine of healthy women and those with cancerous *cervix uteri*

Ilość plam	Ilość przypadków		
	Grupa I	Grupa II	Grupa III
1	1	3	2
2	7	18	15
3	2	8	8
4	6	3	3
5	12	—	3
6	1	—	1

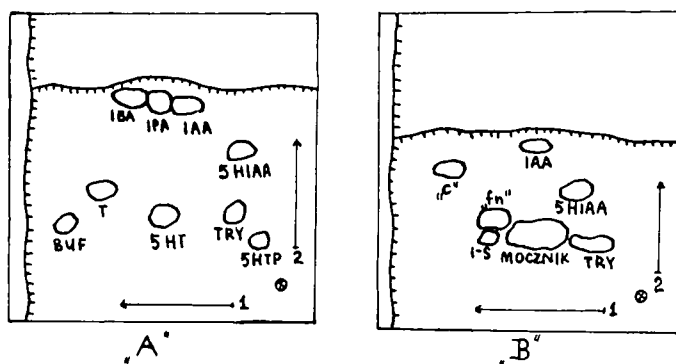
W moczu obu wymienionych grup prawie zawsze znajdowano siarczan indoksyli (w grupie I — 100%, w grupie II — 96,8%) i tryptofan (w grupie I — 96,5%, w grupie II — 93,7%). Statystycznie istotne różnice stwierdzono w wydalaniu 5-HIAA (w grupie I — 65,5%, w grupie II — 9,3%) oraz IAA (w grupie I — 68,9%, w grupie II — 21,8%). Poza tym w 2 przypadkach z grupy II znaleziono 5-HTP. Plamy nie zidentyfikowane: „a”, „b”, „c”, „r”, „f_n” występowały głównie w grupie kobiet młodych (w 14 spośród 29 przypadków) natomiast w grupie kobiet starszych tylko na 1 chromatogramie (tab. 2). W grupie kobiet młodych na chromatogramach stwierdzano częściej plamy o wysokim natężeniu barwy niż w grupie kobiet starszych. Różnice te okazały się nieistotne pod względem statystycznym. Wobec znacznych różnic w obu grupach, jako właściwą grupę kontrolną przyjęto — II (ten sam wiek osób kontrolnych i kobiet chorych).

W tych samych warunkach doświadczalnych w moczu kobiet chorych na raka szyjki macicy (grupa III) znajdowano na każdym chromatogramie od 1 do 6 plam z przewagą chromatogramów o 2 plamach. Porównanie z grupą kontrolną nie wykazało jednak istotnych statystycznie różnic. Zawsze obecny był siarczan indoksyli, a tryptofan występował w 87% przypadków. Sporadycznie, ale częściej niż w grupie kontrolnej, występowały 5-HIAA (15%) oraz IAA (36,3%). Różnice te były nieistotne pod względem statystycznym. Na uwagę zasługuje znalezienie dodatkowych dwóch plam, które oznaczono „c” i „f_n”, których nie udało się zidentyfikować. Plama oznaczona „c” nie występowała

Tab. 2. Częstość występowania związków indolowych w moczu kobiet zdrowych i kobiet chorych na raka szyjki macicy
The frequency of appearance of the indole compounds in the urine of healthy women and those with cancerous *cervix uteri*

Lp.	Związek indolowy	Grupa I		Grupa II		Grupa III	
		Częstość	%	Częstość	%	Częstość	%
1	Try	28	96,5	30	93,7	29	87,8
2	I—S	29	100	31	96,8	32	100
3	5HIAA	19	65,5	3	9,3	5	15,1
4	IAA	20	68,9	7	21,8	12	36,3
5	5HTP	—	—	2	6,2	—	—
6	„a”	3	10,3	—	—	—	—
7	„b”	2	6,8	—	—	—	—
8	„c”	7	24,1	—	—	3	9,3
9	„r”	2	6,8	—	—	—	—
10	„fn”	—	—	1	3,1	13	40,6

w grupie kontrolnej, natomiast stwierdzono ją w grupie młodych, zdrowych kobiet (I grupa) na 7 chromatogramach. Plamę oznaczoną „fn” wykryto w 13 przypadkach w grupie kobiet chorych, podczas gdy w grupie kontrolnej tylko 1 raz. W grupie kobiet młodych (I grupa) plamy tej nie wykryto. Przykład chromatogramu z grupy kobiet chorych ilustruje ryc. 1.



Ryc. 1. A — mapa chromatograficzna standardowych związków indolowych, B — przykład chromatogramu z grupy kobiet chorych na raka szyjki macicy
A — a chromatographic map of standard indole compounds; B — an example of a paper chromatogram in the group of women with cancerous *cervix uteri*

Spośród 13 kobiet chorych, u których w moczu stwierdzono w różnych okresach leczenia niezidentyfikowaną plamę „fn”, u 6 rozpoznano raka szyjki macicy stopnia I, u 5 stopnia II, a u 2 stopnia III. Badanie

histopatologiczne w 10 przypadkach wykazało *carcinoma planoepitheliale*, w 2 *adenocarcinoma cylindrocellulare*, a w 1 — *carcinoma spinocellulare*. Intensywność zabarwienia plam z odczynnikiem Ehrlicha w grupie kobiet chorych była nieznacznie większa niż w grupie kontrolnej (tab. 3), przy czym obserwowane różnice były nieistotne statystycznie. Wydalenie

Tab. 3. Intensywność zabarwienia plam związków indolowych wywołanych odczynnikiem Ehrlicha

The intensity of staining of the spots of indole compounds, developed by the Ehrlich reagent

Związek	Grupa I				Grupa II				Grupa III			
	I l o ś ć p l a m o z n a c z o n y c h											
	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++
Try	10	12	4	2	23	6	1	—	17	6	5	1
I—S	19	10	—	—	24	7	—	—	18	10	4	—
5HIAA	14	5	—	—	3	—	—	—	4	1	—	—
IAA	20	—	—	—	6	1	—	—	11	1	—	—
5HTP	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—
„a”	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„b”	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„c”	4	3	—	—	—	—	—	—	2	1	—	—
„r,”	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„fn”	—	—	—	—	1	—	—	—	4	4	5	—
S u m a	74	30	4	2	59	14	1	—	56	23	14	1

związków indolowych w moczu u tych samych chorych przed leczeniem, po leczeniu promieniami radu, w połowie naświetlań promieniami Rentgena oraz po zakończeniu leczenia nie ulegało widocznym zmianom, co potwierdziła analiza statystyczna ("chi kwadrat" = 8,532, $\nu = 9$).

W poszczególnych okresach leczenia obserwowano jedynie zbieżność występowania nie zidentyfikowanej plamy „f_n” z plamami właściwymi dla 5-HIAA i IAA. W 10 przypadkach, w których stwierdzono obecność 5-HIAA, w 9 była obecna plama „f_n”. Spośród 12 chromatogramów wykazujących obecność IAA, 11 zawierało plamę „f_n”.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Rozrzut zawartości związków indolowych w moczu zdrowych kobiet jest tak duży, że tylko znaczne różnice na chromatogramach moczu chorych i zdrowych mogą upoważniać do przyjęcia istotnych odchyień. Oka i Leppänen (11) znajdowali w próbach kontrolnych od 3

do 6 plam. Nie podają oni jednak wieku ani płci osób badanych, co wydaje się mieć znaczny wpływ na wydalanie związków indolowych. Badania licznych autorów wykazały, że wiele czynników wpływa na metabolizm tryptofanu. Uważa się, że duży rozpad białka towarzyszący stanom gorączkowym lub przewlekłym chorobom może być przyczyną zmian w wydalaniu związków indolowych w chorobach nowotworowych, w białaczce, gruźlicy, w zapaleniu płuc (6, 11). Brown i wsp. (2), w oparciu o doświadczalne badania na zwierzętach przypuszczają, że substancje karcinogenne mogą powstawać wewnątrzustrojowo jako następstwo zmienionego metabolizmu tryptofanu.

Wydaje się, że stwierdzone przez nas zaburzenia w wydalaniu związków indolowych w moczu kobiet chorych na raka szyjki macicy można również wiązać z zaburzeniem metabolizmu tryptofanu, towarzyszącemu rozpadowi białka w przebiegu przewlekłej choroby jaką jest proces nowotworowy narządu rodowego. Stwierdzenie nie zidentyfikowanej plamy „f_n” nie upoważnia do łączenia jej obecności tylko z procesem nowotworowym. Przemawiają za tym badania Oka i Leppänen (11), którzy stwierdzili w różnych chorobach wewnętrznych oraz w procesie nowotworowym (rak sutka, gruczołu krokowego, płuc) nie zidentyfikowane plamy o podobnym umiejscowieniu na chromatogramach.

Wnioski

1. Wydalanie związków indolowych w moczu kobiet zdrowych jest niejednakowe w różnych okresach wieku. W moczu kobiet młodych istotnie częściej występował kwas 5-hydroksyindoloctowy i kwas indoloctowy.

2. Kobiety chore w porównaniu z odpowiednią wiekiem grupą kobiet zdrowych wydalają nieznacznie więcej związków indolowych zarówno pod względem liczby, jak i ilości (różnice statystycznie nieistotne).

3. Nie stwierdzono istotnego wpływu leczenia promieniami Roentgena i radu na wydalanie związków indolowych.

4. Wydaje się, że niewielkie zaburzenia w wydalaniu związków indolowych w moczu kobiet chorych na raka szyjki macicy należy łączyć z bardziej ogólnym zaburzeniem metabolizmu tryptofanu jako następstwem przewlekłego procesu chorobowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Armstrong M. D., Robinson K. S.: Arch. Biochem. Biophys., 52, 287—288, 1954.
2. Brown R. R., Price J. M., Wear J. B.: Proc. Amer. Cancer Res., 2, 7, 1955.

3. Curzon G.: *Lancet*, 2, 1361—1362, 1955.
4. Hamlin K. E., Fisher F. F.: *Jour. Amer. Chem. Soc.*, 73, 5007—5008, 1951.
5. Hanson A., Serin F.: *Lancet*, 2, 1359—1360, 1955.
6. Jepson J. B.: *Lancet*, 2, 1009—1011, 1955.
7. Kawiak W.: *Neur. Neurochir. Pol.*, 6, 667—672, 1967.
8. Kokot F., Cekański A.: *P. T. L.*, 14, 1697—1698, 1959.
9. Kolber-Postępska B.: *P. T. L.*, 32, 1221—1224, 1964.
10. Lembeck F.: *Nature*, 172, 910—911, 1953.
11. Oka M., Leppänen V. V. E.: *Acta Med. Scand.*, 166, 297—316, 1960.
12. Oktaba W.: *Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalnictwa*, PWN, Warszawa 1966, 257—283.
13. Page I. H., Corcoran A. C., Udenfriend S., Sjoerdsma A., Weissbach H.: *Lancet*, 1, 198—199, 1955.
14. Pare C. M. B., Sandler M., Stacey R. S.: *Lancet*, 1, 551—553, 1957.
15. Pokora J., Czarnecki J.: *P. T. L.*, 13, 462—463, 1966.
16. Rapport M. M.: *Jour. Biol. Chem.*, 180, 961—969, 1949.
17. Udenfriend S., Titus E., Weissbach H.: *Jour. Biol. Chem.*, 216, 499—505, 1955.
18. Udenfriend S., Weissbach H., Sjoerdsma A.: *Science*, 123, 669, 1956.

Otrzymano 2 V 1968.

РЕЗЮМЕ

При помощи метода хроматографии на бумаге исследовалось выделение индоловых соединений в моче субъективно здоровых женщин и женщин, больных раком шейки матки.

Наблюдались различия в выделении этих соединений у здоровых женщин, зависящие от их возраста. Больные женщины по сравнению с соответствующей по возрасту группой здоровых женщин выделяют индоловых соединений больше.

Исследование мочи в разные периоды лечения не показало влияния лучей X и радия на выделение индоловых соединений.

SUMMARY

Examinations were carried out of the excretion of indole compounds by paper chromatography in the urine of healthy women and of those suffering from cancer of the uterus. In the group of healthy women considerable differences were found in the excretion of indole compounds depending on the age of the examined patients. Statistically higher quantities of 5-HIAA and IAA were found in the urine of young

women in comparison with older ones. Quantitative and qualitative data of indole excretion were higher in women suffering from cancer of the uterus than those of healthy women of the same age group. The differences are not statistically significant. No effect of rays and radium on the indole excretion was found in the urine of the ill women at different times of treatment.