

CONTRIBUTO
ALLA CHIARIFICAZIONE DEI RAPPORTI
FRA ORMONI E TESSUTI NEOPLASTICI(*)(**)

(Con 3 figure)

T. CERVIGNI - A. MASSARELLI - V. RUSSO - R. CARBONE

SUMMARY — In tribus mamillae tumoribus eiusdem speciei histologicae cum Auctores quid ostendat reductasis, si mulier bilateralem surrenalectomiam subeat, investigaverint, invenerunt varios fuisse clinicos, et biochimicos surrenalectomiae effectus, hos autem semper una cum illis mutari et interdum magis quam illos.

Il meccanismo con il quale l'asportazione delle ghiandole endocrine (gonadi, surreni, ipofisi) o la somministrazione di ormoni sessuali e corticoidi agisce sui tumori maligni della mammella non è ancora chiaro, nonostante la grande mole di studi eseguiti.

Per cercare di chiarire questo meccanismo, nel precedente lavoro [1] si è sostenuta la opportunità di studiare direttamente sul tumore le eventuali modificazioni biochimiche indotte da una terapia ormonale. Infatti se potessimo conoscere meglio quali funzioni biochimiche risultano alterate nel tumore che regredisce o si accresce sotto il trattamento ormonale, saremmo in grado di valutare meno empiricamente la natura e il « quantum » della azione svolta dai vari ormoni al livello del tessuto neoplastico.

Inoltre potremmo forse fare un ulteriore passo avanti nella utilizzazione degli attuali mezzi terapeutici e potremmo trovarne altri più efficaci.

(*) Nota presentata dall'Accademico Pontificio Pietro Rondoni il 3 ottobre 1956.

(**) Uso del trifeniltetrasolo cloruro (TTC) per lo studio del metabolismo dei carcinomi della mammella dopo surrenalectomia.

Dal momento che gli ormoni attraverso la loro azione regolano vari processi metabolici dell'organismo, abbiamo scelto una reazione biochimica passibile di essere influenzata sia dagli ormoni sessuali naturali e sintetici sia dai corticoidi ed anche dalle sottrazioni ghiandolari e ciò allo scopo di cercare di spiegare da un punto di vista unitario l'azione dei diversi stimoli ormonali.

Risulta che moltissime sono le reazioni biochimiche che possono essere influenzate da stimoli ormonali e, fra queste, la respirazione, la glicolisi, la decarbossilazione ossidativa degli α -chetoacidi, le varie deidrogenasi, la catalasi, la transaminasi [2-27].

Tale regolazione si può esplicare sia in senso attivata sia in senso inibente; ciò avviene sia in vivo che in vitro, su enzimi puri come su tessuti. Organi diversi rispondono in maniera differente. Organi e tessuti possono inoltre reagire diversamente all'azione ormonale se differente è la specie o il sesso o lo stato fisiologico dell'animale al momento dell'indagine. A variazione di dose dell'ormone può infine rispondere una reazione metabolica diversa.

Poichè la reazione agli stimoli ormonali dei vari organi e tessuti è sotto un profilo biochimico oltremodo variabile, ci siamo domandati come reagiscono metabolicamente i tumori della mammella alla surrenalectomia e se tale reazione è univoca oppure varia da tumore a tumore e a seconda del tipo istologico.

PARTE SPERIMENTALE

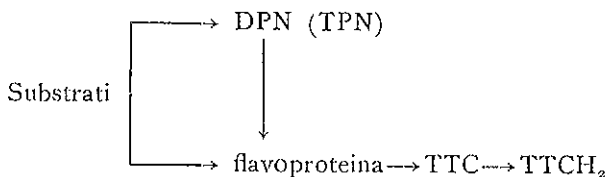
Fra le numerose reazioni biochimiche che potevano essere studiate, abbiamo scelto la reazione della reduttasi.

È noto che tale reazione enzimatica si esegue ponendo a contatto con il tessuto da esaminare un adatto trasportatore di H^+ passibile di essere dosato. Come trasportatore di H^+ abbiamo usato il cloruro del 2, 3, 5 trifeniltetrazolio (TTC). Questo sale per riduzione si trasforma in $TTCH_2$ (formazano) insolubile, colorato in rosso che si deposita nelle cellule; da queste poi si può estrarre con opportuni solventi e dosare colorimetricamente.

Nelle condizioni sperimentali da noi usate, la quantità di formazano formatasi è un indice della attività reduttasica endogena del tessuto. Il meccanismo con il quale il TTC viene ridotto dai sistemi reduttasici a pH fisiologici non è del tutto noto; sembra che l'immediato donatore di elettroni al TTC

sia una flavoproteina ridotta [30]. La flavoproteina a sua volta era stata ridotta dal DPNH_2 o dal TPNH_2 oppure direttamente dal substrato.

Dato il potenziale di ossido-riduzione del TTC/TTCH_2 ($E_0 = -0,08$ volt) gli elettroni potrebbero seguire le due strade indicate dallo schema.



In un sistema in cui il TTC sia in eccesso, i substrati, i coenzimi DPN , TPN , le flavoproteine e gli enzimi deidrogenasici sono i fattori limitanti la formazione del TTCH_2 .

Studi sulla possibilità di applicazione di questo metodo di indagine biochimica nel campo fisiologico e patologico hanno dato interessanti risultati.

Secondo ZWEIFACH e coll. [31] si ha un netto parallelismo fra intensità di deposizione del formazano (TTCH_2) nei tessuti in condizioni anaerobiche e la respirazione calcolata come consumo di O_2 con il metodo classico di WARBURG.

ROSENFELD [32] ha trovato che nei surreni perfusi con vari substrati capaci di aumentare il consumo di O_2 , anche la formazione di formazano era aumentata mentre gli inibitori che agiscono sopprimendo le attività metaboliche delle cellule, fanno diminuire anche la riduzione dei sali di tetrazolio. Inoltre solo le cellule vitali sono capaci di ridurre il TTC ; ciò è in accordo anche con le esperienze condotte dalla scuola di ANTROPOL [33].

Recentemente HOSKINS e coll. [34], lavorando col tumore-ascite, hanno trovato che la capacità di ridurre il TTC è un buon indice della vitalità delle sospensioni tumorali.

SMITH [29] ha usato il TTC per determinare la germinabilità dei semi.

Metodo di determinazione delle reduttasi endogene

Si preleva un frammento di tumore; nel tempo massimo di 15 minuti si separano le zone apparentemente necrotiche ed il grasso; si fanno delle sezioni a mano libera dello spessore di 1-2 mm. Si pongono le sezioni in tubicini da

saggio nei quali è stata preventivamente posta la miscela di reazione così composta:

tampone fosfato M/15 pH 7,2: 1 cc;

cloruro di 2,3,5 trifeniltetrazolio 1% in tampone fosfato M/15 pH 7,2: 1 cc;

H₂O distillata: 1 cc.

Si pone in termostato a 37° per un'ora esatta dopo di che si lavano le sezioni con acqua distillata più volte e per estrarre il formazano rosso depositato nelle cellule si aggiungono 2,5 cc di alcool etilico a 95°. Si ripara dalla luce per impedire che avvenga una cis-trans-isomerizzazione del formazano con passaggio dal colore rosso al giallo [5]. Di solito dopo sei ore il formazano è completamente estratto. Si esegue la lettura allo spettrofotometro di BECKMAN a 485 m μ riportando i valori ad una curva di taratura.

Dividendo per il peso secco delle fettine i valori in γ del formazano estratto, si hanno i γ /mg di peso secco di tumore. Poichè si possono avere delle oscillazioni nelle determinazioni piuttosto forti (fino al 20-25%) le prove vanno eseguite almeno in triplo e per i tumori istologicamente poco omogenei anche in sestuplo.

Nei grafici 1-2-3 per ogni punto delle curve vengono riportati gli scarti quadratici medi.

Sono stati studiati tre tumori della mammella dello stesso tipo istologico (carcinomi a cordoni solidi) in donne sottoposte a surrenalectomia bilaterale eseguita in due tempi successivi e in un caso associata a ovariectomia totale.

CASO N. I

V. E., anni 52. Tumore della mammella Sn. ulcerato con metastasi linfoghiandolari regionali.

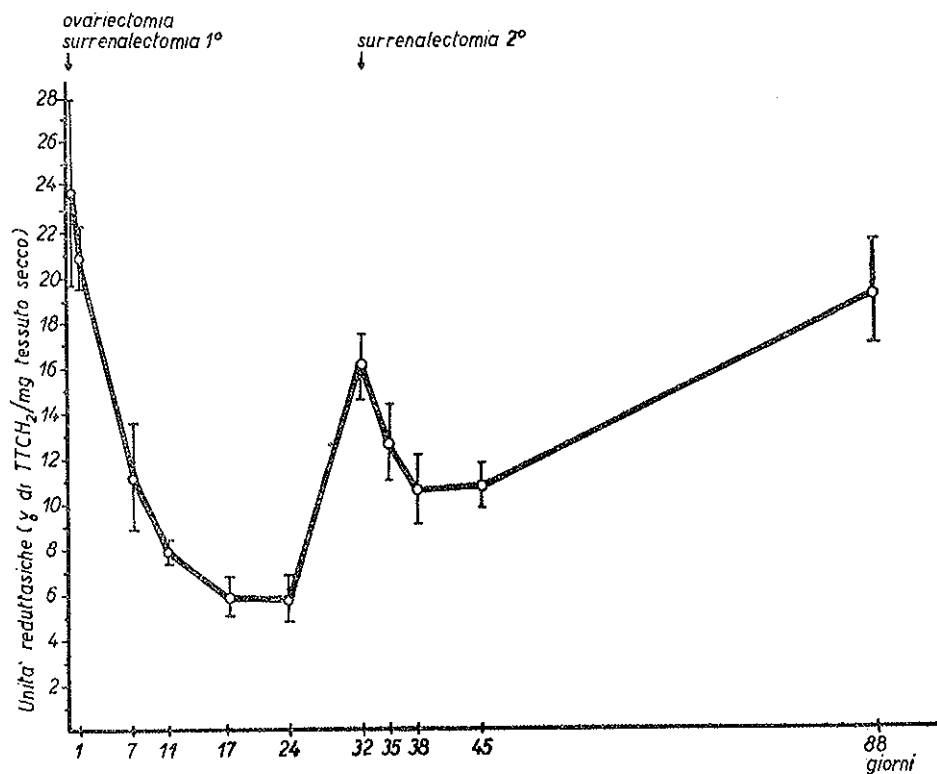


GRAFICO N. I.

Variazioni cliniche locali ed istologiche

Prima della ovariectomia e surrenalectomia I:

Condizioni locali: voluminosa vegetazione neoplastica in sede mammaria Sn.

Reperto istologico: numerosissimi ammassi di cellule neoplastiche in abbondante tessuto connettivo fibroblastico ricco in cellule piccole con nucleo tondeggiante; varie cellule neoplastiche isolate. Elementi neoplastici molto ben conservati.

Dopo 17 gg. dall'intervento:

Condizioni locali: notevole riduzione in volume (circa 50%) della vegetazione neoplastica.

Reperto istologico: invariato.

Dopo 24 gg. dall'intervento:

Condizioni locali invariate.

Reperto istologico invariato.

Dopo 32 gg. dal I intervento e prima della surrenalectomia II:

Condizioni locali invariate.

Reperto istologico invariato.

Dopo 6 gg. dal II intervento e 38 gg. dal I intervento:

Condizioni locali: notevole ulteriore riduzione della vegetazione neoplastica.

Reperto istologico invariato.

Dopo 13 giorni dal II intervento e 45 gg. dal I intervento:

Condizioni locali: lieve ulteriore riduzione.

Reperto istologico invariato.

Dopo 86 gg.:

Condizioni locali: la massa neoplastica che precedentemente si era notevolmente ridotta, dopo un periodo di stasi di circa 15 gg., si mostra nuovamente aumentata di volume. Si osserva inoltre la comparsa di noduli neoplastici cutanei al livello della regione mammaria sede del tumore primitivo.

CASO N. 2

C. M., anni 57. Recidiva locale da pregresso tumore della mammella Sn. con metastasi alla mammella controlaterale e ai linfonodi sopraclaveari di Dx. e Sn.

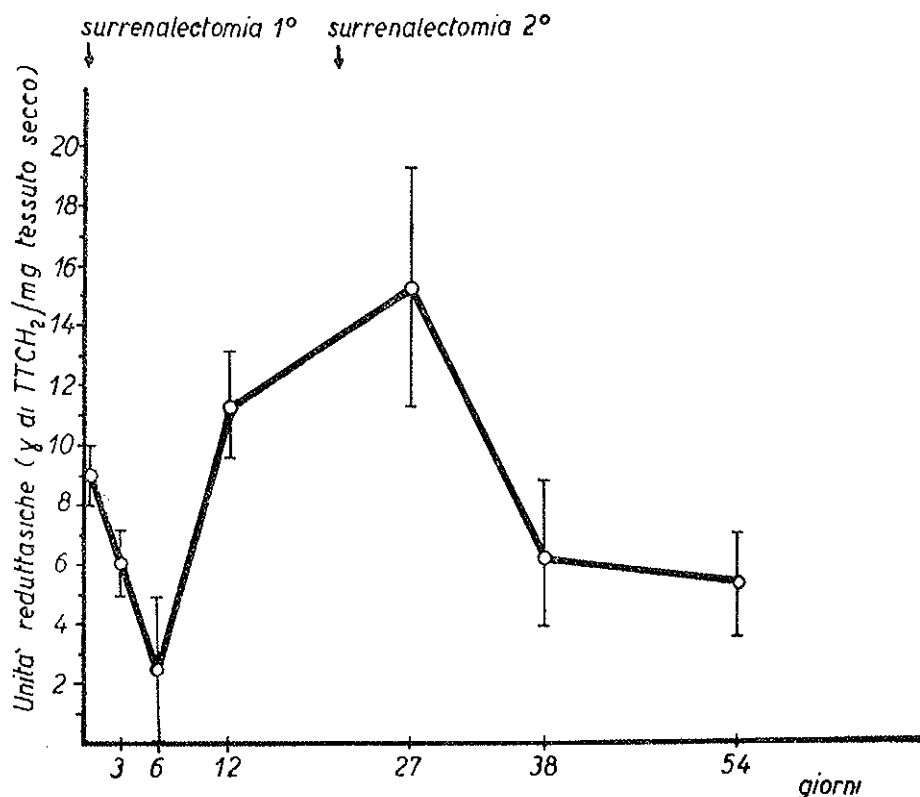


GRAFICO N. 2.

Variazioni cliniche locali ed istologiche:

Prima della surrenalectomia I:

Condizioni locali: ulcerazione neoplastica cm. 5×5 in sede parasternale Sn. Tumefazione ulcerata della mammella Dx.

Reperto istologico: vari zaffi e nidi di cellule neoplastiche e cellule neoplastiche sparse in tessuto connettivo fibroblastico con infiltrati flogistici. Cellule neoplastiche per lo più alterate.

Dopo 6 gg. dal I intervento:

Condizioni locali invariate.

Reperto istologico: rari nidi di cellule neoplastiche in tessuto di granulazione povero di vasi e con zone di necrosi amorfa. Cellule neoplastiche ben riconoscibili.

Dopo 12 gg. dal I intervento:

Condizioni locali: la ulcerazione parasternale mostra zone di necrosi.

Reperto istologico: rari nidi di cellule neoplastiche in abbondante tessuto di granulazione. Cellule neoplastiche ben riconoscibili.

Dopo 6 gg. dalla Surrenalectomia II e 27 gg. dal I intervento:

Condizioni locali: la ulcerazione parasternale si presenta detersa allo stesso modo che la ulcerazione della mammella Dx.

Esame istologico non eseguito.

Dopo 33 gg. dalla surrenalectomia II e 54 gg. dal I intervento:

Condizioni locali: lievemente migliorate.

Reperto istologico: vari nidi ed ampi ammassi di cellule neoplastiche, nonchè cellule neoplastiche sparse in tessuto di granulazione in alcuni punti ricco di plasmacellule. Rare formazioni tubolari neoplastiche. Cellule neoplastiche ben conservate.

CASO N. 3

D. M., anni 63. Recidiva locale da pregresso tumore della mammella Sn. con metastasi linfoghiandolari ascellari e sopraclaveari Sn. Tumore contro-laterale della mammella Dx.

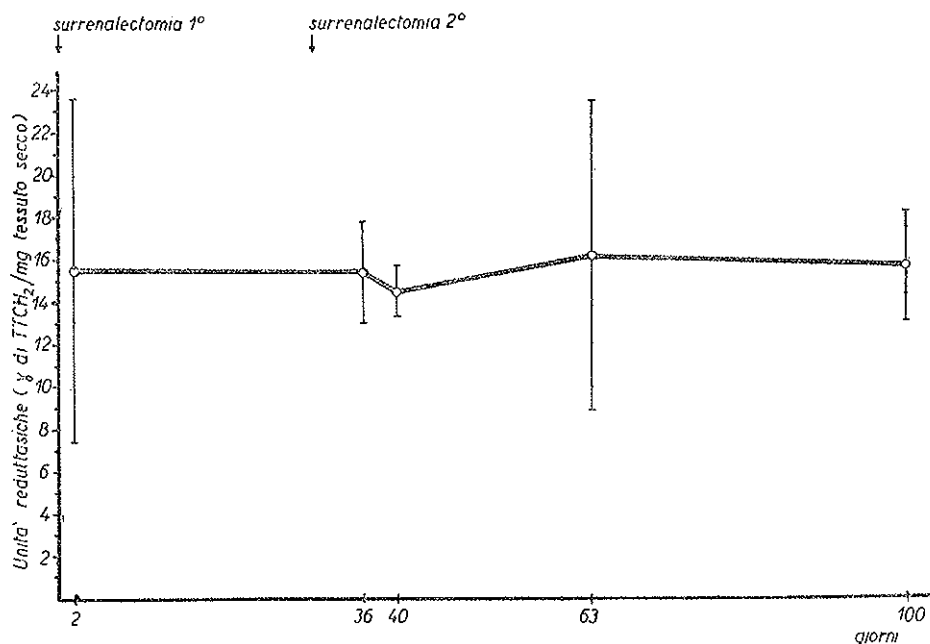


GRAFICO N. 3.

Variazioni cliniche locali ed istologiche:

Dopo 2 gg dalla surrenalectomia I:

Condizioni locali: vegetazione neoplastica disseminata lungo tutti i margini della cicatrice della mastectomia Sn. Alla mammella Dx. tumefazione neoplastica ulcerata.

Reperto istologico: vari nidi di cellule neoplastiche in abbondante tessuto connettivo tendente alla ialinizzazione e con infiltrati parvicellulari linfocitari. Cellule neoplastiche ben conservate.

Dopo 6 gg. dalla surrenalectomia II e 36 gg. dalla surrenalectomia I:

Condizioni locali: lieve aumento in numero e volume delle vegetazioni neoplastiche di Sn. Mammella Dx.: condizioni invariate.

Reperto istologico: esame non eseguito.

Dopo 60 gg. dalla surrenalectomia II e 100 gg. dalla surrenalectomia I:

Condizioni locali: a Dx. e a Sn. invariate.

Reperto istologico: numerosi nidi di cellule neoplastiche ben conservate in abbondante tessuto di granulazione relativamente ricco di vasi.

DISCUSSIONE

Dall'esame dei risultati appare chiaro innanzitutto come ogni tumore, anche se dello stesso tipo istologico, possa venire influenzato in modo diverso dalla surrenalectomia, così come si verifica per la terapia ormonale di apporto (1). Tale diverso comportamento riguarda sia le modificazioni cliniche, cosa del resto già più che nota, sia le modificazioni delle reduttasi del tessuto neoplastico. Nei nostri tre casi infatti è stato osservato, pur trattandosi di tre carcinomi a cordoni solidi, una differente risposta sia clinica che biochimica.

I casi nn. 1 e 2 hanno risposto clinicamente alla surrenalectomia con una notevole riduzione delle vegetazioni neoplastiche, mentre il caso n. 3 non è stato affatto influenzato.

Anche per quanto riguarda l'andamento delle reduttasi si è notato un comportamento analogo nei casi n. 1 e n. 2 e un comportamento diverso nel caso n. 3.

Per quanto riguarda poi le modificazioni del quadro istologico ogni caso è diverso dall'altro.

Analizzando ulteriormente i nostri casi, si è notato in tutti un buon parallelismo fra le modificazioni cliniche e quelle biochimiche soprattutto dopo la II surrenalectomia.

Infatti, nel primo e nel secondo caso, alla riduzione della massa neoplastica è corrisposta una riduzione del contenuto in reduttasi, così come nel terzo caso alla nessuna modificazione del quadro clinico locale è corrisposta una costanza del dato biochimico.

Inoltre, nei periodi durante i quali il tumore non subiva modificazione alcuna dal punto di vista clinico, periodi che sono stati da noi osservati nel primo caso dopo la prima e la seconda surrenalectomia, anche le reduttasi restavano costanti.

Va sottolineato il fatto che nei due casi che hanno beneficato della surrenalectomia, dopo il primo intervento, a distanza di tempo variabile, si ha

una netta risalita del valore reduttasico: il che farebbe supporre una tendenza del tumore a riprendere la sua attività proliferativa.

A confermare questa supposizione sta il fatto che il caso n. 1, seguito più a lungo nel tempo, presenta anche dopo la II surrenalectomia una risalita della funzione reduttasica con un andamento della curva analogo a quello osservato dopo il primo intervento e in parallelo con una ripresa proliferativa della lesione neoplastica.

Dato il parallelismo trovato fra i dati clinico-locali e quelli biochimici, crediamo che le variazioni biochimiche possano assumere una maggiore importanza sia per aiutarci a capire il meccanismo d'azione della surrenalectomia, sia forse per consigliare in quali casi è opportuno eseguire il secondo tempo della surrenalectomia e in quali no.

Certamente queste nostre osservazioni necessitano di ulteriore più ampio controllo per essere o meno confermate.

Soprattutto crediamo che si debbano studiare anche altre funzioni nel corso del trattamento ormonale in modo da avere un quadro il più possibile completo di come si modifica il metabolismo del tumore. Ciò allo scopo di poter seguire e meglio orientare la cura.

BIBLIOGRAFIA

- [1] CERVIGNI T., MASSARELLI A.: « Boll. di Oncologia » XXX, 2, 1956.
- [2] KOCHAKIAN CHARLES D.: « Annals New York Acad. Sciences », 54, 531, 1951.
- [3] UMBREIT W.W.: « Annals New York Acad. Sciences », 54, 569, 1951.
- [4] GORDON GILBERT S., BENTINCK R.C., EISENBERG E.: « Annals New York Acad. Sciences », 54, 575, 1951.
- [5] HAYANO MIKA, DOREFMAN R.I.: « Annals New York Acad. Sciences », 54, 608, 1951.
- [6] JENSEN H., GRAY J.: Ibid., 54, 619, 1951.
- [7] HOCHSTER R.M., QUASTEL J.H.: Ibid., 54, 626, 1951.
- [8] KALMAN SUMMER M.: « Endocrinology », 52, 73, 1953.
- [9] COCHRAN K.W., DU BOIS K.P.: « Endocrinology », 55, 10, 1954.
- [10] A.G. WILLIAM ASHMAN: III Congres International de biochimie, 1955, pag. 64.
- [11] CHELI R., LAMPERI S.: Archivio « Maragliano », 10, 11, 1955.
- [12] CAMURRI M., MAGLIULO S.: « Monitore Ost. Ginec. », XXVI, 279, 1955.
- [13] RINDI G.: « Boll. Soc. Medico-Chirurgica Univ. Pavia », 6, 995, 1953.
- [14] HANSCHILDT J.D. e GROSSMAN C.M.: « Endocrinology », 53, 306, 1953.
- [15] PEARSON O.H., ELIEL L.P.: « Proc. II Nat. Cancer Conf. », 1952, 150, 1954.
- [16] McDONALD D.F., LATTI M.J.: « Endocrinology », 59, 159, 1956.
- [17] BEVER A.T., VALARDO J.T. e HISAW F.L.: « Endocrinology », 58, 522, 1956.
- [18] DIRSCHERL W.: Riassunto su « Chemical Abstract », pag. 4498, 1953.
- [19] ALBANO: « Tumori », 40, 546, 1954.
- [20] VILLEE C.A.: « J. Biol. Chem. », 215, 171, 1955.
- [21] MARSHALL G., BRANZI G.: « Lo Sperimentale », 103, 15, 1953.
- [22] PINCUS GREGORY: « II Congr. Internat. Bioch. », 1952.
- [23] SEVAG M.G., GOTS J.S., STEERS E.: *The Enzymes*. Acad. Press. I, 145, 1950.
- [24] MEYER R.K., MCSKAN W.H.: *Recent Progress in Hormone Research*. Acad. Press. V, 465, 1950.
- [25] KIT SAUL, GUZMAN BARON E.S.: « Endocrinology », 52, 1, 1953.
- [26] LONGWELL B.B., REIF A.E.: « Arch. Biochem. Bioph. », 58, 92, 1955.
- [27] RINGLER I., LEONARD S.L.: « Endocrinology », 55, 363, 1954.
- [28] BLACK M.M., SPEER F.: « Am. J. Clin. Path. », 23, 218, 1953.
- [29] SMITH S.E.: « Science », 113, 751, 1951.
- [30] BRODIE A.F., GOTS G.S.: « Science », 114, 40, 1951.
- [31] ZWEIFACH B.W., BLACK M.M., SHORR E.: « Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. », 76, 446, 1951.
- [32] ROSENFELD G.: « Arch. Biochem. Bioph. », 62, 125, 1956.
- [33] ANTROPOL W., FRIED G.H., KODZA H.: « Trans New York Acad. Sciences », ser. II, 17, 385, 1955.
- [34] HOSKINS J.M., MEYNELL G.G., SANDERS F.K.: « Exper. Cell Research », 11, 293, 1956.
- [35] HAUSSER I., JERCHER D., KUHN R.: « Chem. Ber », 82, 515, 1949.