

AZ MC-29 VÍRUS ÁLTAL OKOZOTT MÁJRÁKBÓL KIALAKÍTOTT TRANSZPLANTÁLHATÓ HEPATOMA BIOKÉMIAI VIZSGÁLATA I.

A CSIRKEMÁJ ÉS A HEPATOMA DNS, RNS, FEHÉRJE ÉS FOSZFOLIPID TARTALMÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

KOVALSZKY ILONA, JENEY ANDRÁS, ASBÓT RICHARD és LAPIS KÁROLY az
MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1976. II. 6.

Az elmúlt években a daganatok víruseredetével kapcsolatban egyre több közlemény látott napvilágot és szaporodnak egyes humán tumorok víruseredetét feltételező adatok is (Klein 1972, Lapis és Schaff 1974, Sarkar és Moore 1972). A világszerte kiterjedten vizsgált onkogén vírusok hatására elsősorban mesenchymalis tumorok alakultak ki a kísérleti állatokban, és bár ezek tanulmányozása számos adatot szolgáltatott a vírus karcinogenezis mechanizmusára vonatkozóan, nem adhatott választ arra a kérdésre, mi történik egy magasan differenciált szövet sejtjeivel a malignus transzformáció során. A kémiai karcinogénnel előidézett transzplantálható patkányhepatomák — elsősorban a Morris hepatomák — vizsgálata, és a májszövet malignus transzformációja során végbemenő anyagcsere változások felderítése a daganatok kialakulásának és biokémiájának számos lényeges sajátosságára mutatott rá (Morris 1965, Morris és Wagner 1968, Weber 1961, Weber 1968). Így a Morris 5123-as hepatoma vizsgálata során derült fény arra, hogy több, addig a daganatos sejtanyagcsere lényegi elváltozásaként elismert biokémiai jelenség nem szükségszerű velejárója a malignus transzformációnak.

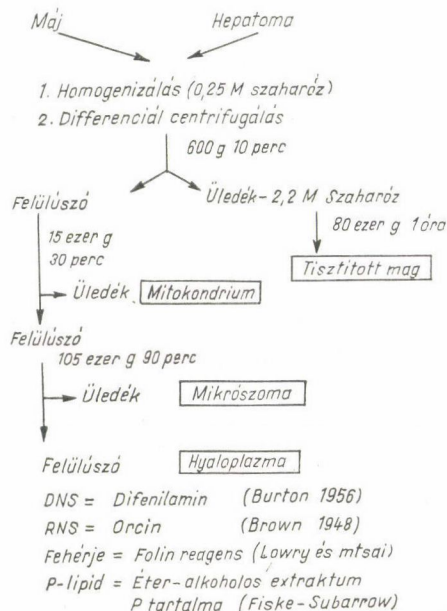
E tumor biokémiai sajátosságok tekintetében nagyon hasonlított a májhoz, glikolitikus aktivitása közel azonos a májéval, májspecifikus enzimeinek aktivitása szintén jól megőrzött volt (Pitot 1962). A különböző növekedési sebességű és malignitású hepatomák tanulmányozása során derült fény arra is, hogy egyes anyagcsere folyamatok intenzitása a malignitás fokával párhuzamosan fokozódik, míg másoké progresszíven csökken (Weber 1968).

Felmerül azonban a kérdés, hogy azok a jelenségek, melyek a kémiai karcinogénnel előidézett transzplantálható hepatomákban törvényszerűnek tűnnek, kialakulnak-e vírussal előidézett malignus transzformáció esetén is? E kérdés megválaszolására nyílt meg az első lehetőség, mikor 1972-ben Lapis a Beard által már korábban megfigyelt (Beard 1970), MC-29 vírus által előidézett hepatomából transzplantálható daganatot alakított ki. A primer,

valamint a transzplantálható tumor biológiai, fény- és elektronmikroszkópos morfológiai sajátosságairól Lapis több cikkben számolt be (Lapis és mtsai 1973, Lapis és mtsai 1974, Lapis és mtsai 1975). Jelen vizsgálatunk célja az újonnan kialakított transzplantálható csirke hepatoma alapvető biokémiai, jellemzése, a tumor lényeges makromolekuláinak meghatározása volt.

Anyag és módszer

A transzplantálható tumor fenntartása, átoltása Lapis és mtsai (1974) által leírt módon történt. Vizsgálatainkat mindkét nembeli naposcsibébe subcután oltott 10 napos tumoron végeztük, a tumorok a 4–15. átoltásokból származtak. Kontrollként 10 napos egészséges csirkék máját vizsgáltuk. Az állatok a leölésig szabadon fogyaszthattak táplálékot és vizet. A csirkéket dekapitálással öltük meg, az eltávolított máj és tumor súlyát megmértük. A szövetszövetmintákat, ha azonnal nem kerültek felhasználásra, -25°C -on hűtöttük és legkésőbb három napon belül feldolgoztuk. A tumor és májszövetet ötszörös térfogat 0,1 M-os (pH 7,5) K-foszfát pufferben homogenizáltuk. A homogenátumból orcein festés segítségével meghatároztuk az 1 g nedves súlyra eső sejtszámot, majd a szövetek makromolekuláinak mennyiségi meghatározásához mintát vettük. A megmaradt homogenátumot 600 xg-vel 10 percig centrifugáltuk — az üledékből izoláltuk a sejtmagokat (Busch és mtsai 1968), a felülúszóból pedig a citoplazma frakciókat (Hogeboom 1955, 1. ábra).



1. ábra. A szövetek frakcionálásának és a makromolekulák meghatározásának vázlatos menete.

A szövethomogenátumból és a differenciál centrifugálással nyert 4 frakcióból az alacsony molekulású komponenseket 4 °C-on 0,5 N perklórsavval mosva távolítottuk el. A zsíroldékony anyagokat éter-alkohol 1 : 3 arányú keverékével 2 × 10 percig szobahőn kezelve a mintáinkat, nyertük ki. A visszamaradt üledékből a nukleinsavakat 0,5 N perklórsavval 2 × 20 percen át hidrolizálva vontuk ki. A fennmaradó csapadékot, mely a fehérjét tartalmazta, 0,1 N NaOH-ban oldottuk fel. A 70 °C-on történt perklórsavas hidrolízis során nyert extraktumból a DNS-t difenilamin (Burton 1956), az RNS-t orcín (Brown 1946) reagenssel határoztuk meg. A fehérje tartalom meghatározásához Folin reagenst (Lowry 1951) használtunk. Az éter-alkoholos extraktumból a foszfolipid tartalmat kénsavas roncsolás után az anorganikus foszfor tartalom alapján Fiske és Subbarow (1925) módszere szerint határoztuk meg. Eredményeinket 1 sejtre számítva pikogrammban tüntetjük fel (10^{-12} g).

Eredmények

Vizsgálataink során a csirke hepatomában 2-szer magasabb DNS tartalmat találtunk, mint a májban. A tumor fehérjetartalma ugyanakkor csak 62%-a az egészséges májszövetének. A foszfolipid tartalom csökkenése még a fehérjénél is kifejezettebb (1. táblázat).

I. táblázat

A csirkemáj és hepatoma DNS, RNS, fehérje és foszfolipid tartalma.

	Csirkemáj	Hepatoma	A tumor értékei a kontroll máj %-ban
DNS	2,57 ± 0,38	5,01 ± 0,19	194
RNS	11,42 ± 2,19	8,44 ± 1,30	73,9
Fehérje	154,9 ± 11,80	95,60 ± 7,60	61,7
Foszfolipid	4,60 ± 0,13	1,90 ± 0,27	41,3

Az eredmények 1 sejtre számítva pikogrammban lettek feltüntetve.
A tumorban mért változások szignifikánsak, $p < 0,001$

A tumor és májmintákból nyert izolált és tisztított sejtmagok makromolekula tartalma szintén eltér egymástól (2. táblázat). A hepatoma sejtek magjában nemcsak a DNS, hanem az RNS és fehérje tartalom is lényegesen magasabb, mint a májban. A makromolekulák mennyiségének változása egymással párhuzamos, így egymáshoz viszonyított arányuk lényegesen nem változik. A magban észlelt változással szemben a tumor mitokondrium ($15\ 000 \times g$ üledék) frakciójának RNS, fehérje és foszfolipid tartalma jelentősen csökkent (3. táblázat). Az RNS tartalom csaknem 3-szor, a fehérje tar-

II. táblázat

A csirkemáj és hepatoma magjának DNS, RNS és fehérje tartalma

	Csirkemáj	Hepatoma	A tumor értékei a kontroll máj %-ban
DNS	2,33 ± 0,28	4,65 ± 0,16	200
RMS	0,57 ± 0,19	1,18 ± 0,09	204
Fehérje	8,16 ± 0,65	13,88 ± 0,83	171

Az eredmények 1 sejtre számítva pikogrammban lettek feltüntetve.
A tumorban mért változások szignifikánsak, $p < 0,001$

III. táblázat

A csirkemáj és hepatoma mitokondrium (15 000xg-vel ülepedő) frakciójának RNS, fehérje és foszfolipid tartalma

	Csirkemáj	Hepatoma	A tumor értékei a kontroll máj %-ban
RNS	0,97 ± 0,12	0,33 ± 0,06	33,8
Fehérje	45,82 ± 4,76	20,97 ± 6,01	45,7
Foszfolipid	1,37 ± 0,12	0,28 ± 0,005	20,4

Az eredmények 1 sejtre számítva pikogrammban lettek feltüntetve.
A tumorban mért változások szignifikánsak, $p < 0,001$

talom pedig hozzávetőlegesen 2-szer több a máj hasonló frakciójában. A hepatomában észlelt csökkenést nem lehet egyszerűen a mitokondriumok számának megfogyatkozásával magyarázni, mivel a makromolekulák egymáshoz viszonyított aránya is megváltozott.

A hepatoma mikroszóma frakciójának (105 000 × g üledék) fehérje tartalma 18%-kal kisebb a májénál, hasonló mérvű az RNS és foszfolipid tartalom csökkenése is. A máj és a tumor mikroszóma frakciójában a számított fehérje-RNS arány hasonló (4. táblázat).

IV. táblázat

A csirkemáj és hepatoma mikroszóma (105 000xg-vel ülepedő) frakciójának RNS, fehérje és foszfolipid tartalma

	Csirkemáj	Hepatoma	A tumor értékei a kontroll máj %-ban
RNS	4,36 ± 0,21	3,57 ± 0,71	81,8 a
Fehérje	17,40 ± 2,30	15,95 ± 3,41	91,6 b
Foszfolipid	1,29 ± 0,07	1,04 ± 0,15	80,6 a

Az eredmények 1 sejtre számítva pikogrammban lettek feltüntetve
a: $p < 0,05$
b: nem szignifikáns

A hepatoma hialoplazma frakciójában (5. táblázat) az RNS és fehérje mennyiségi kifejezetten csökkent. A máj hialoplazmában számított 15,7 fehérje-RNS arány az alacsony fehérjetartalom miatt 12,6-re csökken a hepatoma ezen frakciójában.

V. táblázat

A csirkemáj és hepatoma hialoplazma (105 000xg szupernatáns) frakciójának RNS, fehérje és foszfolipid tartalma

	Csirkemáj	Hepatoma	A tumor értékei a kontroll ámj %-ban
RNS	5,14±0,28	3,34±0,83	64,9 a
Fehérje	81,23±8,92	42,48±3,70	52,3 a
Foszfolipid	1,50±0,76	0,81±0,08	53,8 b

Az eredmények 1 sejtre számítva pikogrammban lettek feltüntetve.

a: $p < 0,05$

b: nem szignifikáns

Az RNS és fehérje megoszlását a sejtmag és a citoplazma között a 6. táblázat mutatja. Látható, hogy míg az egészséges csirke májában 18-szor több RNS és fehérje van a citoplazmában mint a magban, ez az arány a hepatomában 6,2-re csökken. A változásért az RNS esetében elsősorban a mag megnövekedett RNS tartalma, a fehérje esetében a mag fehérjetartalmának növekedése és a citoplazma fehérje tartalmának csökkenése egyaránt felelős.

VI. táblázat

A fehérje és RNS megoszlása a mag és citoplazma között csirkemájában és hepatomában

		Fehérje			RNS		
		pg/sejt	%	arány	pg/sejt	%	arány
Máj	Mag	8,16	5,26	1	0,577	5,22	1
	Citoplazma	144,42	94,74	18	10,470	94,77	18,1
Hepatoma	Mag	13,88	14,50	1	1,18	13,90	1
	Citoplazma	79,40	85,50	5,9	7,24	86,10	6,2

Megbeszélés

Az ismertett vizsgálatok célja egy újonnan kialakított transzplantálható tumor DNS, RNS, fehérje és foszforlipid tartalmának meghatározása volt. A munka jelentőségét az adja meg, hogy ismereteink szerint ez az egyetlen transzplantálható hepatoma, melyet vírussal létrehozott májrákból alakított-

tak ki. Vizsgálataink során a máj és az MC-29 vírus által indukált májtumorból kialakított transzplantálható hepatoma között számos különbséget figyelhetünk meg.

A differenciál centrifugálással nyert frakciók makromolekuláinak mennyiségét vizsgálva megállapíthattuk, hogy a hepatoma megváltozott összetételéért részben a magi RNS, DNS és fehérje tartalom emelkedése, részben pedig a citoplazma fehérjéinek megfogyatkozása a felelős.

A hepatoma körülbelül 2-szeresre növekedett DNS tartalma összhangban áll Weber (1961) adataival, aki Novikoff hepatomában, és Molnár (1965) adataival, aki májrákban hasonló mérvű emelkedésről számolt be. Elektronmikroszkópos vizsgálattal Lapis szintén a mag-plazma arány mag javára történő eltolódását figyelte meg (Lapis, 1976, megjelenés előtt). Kézenfekvő, hogy egy gyorsan növő tumor sejtjeinek nagy része G_2 fázisban van. Így magyarázza Weber is a Novikoff hepatoma DNS tartalmának emelkedését. Elképzelhető azonban az is, hogy a sejtek egy része a kóros oszlások következtében oktaploid, vagy ennél is magasabb számú kromoszóma garnitúrával rendelkezik. A magi RNS és fehérje tartalom emelkedett voltát a fokozott szintézis és a csökkent lebontás mellett a következők magyarázhatják.

Lehetséges, hogy a sejtmagban kóros RNS-ek szintézise folyik, melyek a magból kijutni már nem képesek, valamint vírus eredetű tumorról lévén szó, felmerül a vírus RNS termelésének lehetősége is. A magi fehérje tartalom emelkedését magyarázhatja egyszerűen az a tény is, hogy a megnövekedett nukleinsav tartalom következtében több, a nukleinsavak proteinburkaként szolgáló fehérjére van szükség. A jelenség értékelése szempontjából kétségtelenül figyelemre méltó az az irodalmi adat, mely felhívja a figyelmet, hogy egyes kísérletes tumorokban az anyagcsere szisztematikusan a DNS és RNS szintézis javára tolódik el, míg a lebontásukban szerepet játszó enzimek aktivitása csökken (Weber 1974).

A sejtplazmában észlelt változásért, mely legkifejezettebben a mitokondrium és a hialoplazma fehérjetartalmának megfogyatkozásában nyilvánult meg, szintén a csökkent szintézis, vagy a fokozott lebontás tehető felelőssé. A mitokondriális frakció fehérje tartalmának változása összhangban áll Ohe és mtsai megfigyelésével, akik 1967-ben különböző növekedési rátájú hepatomák mitokondriumának tanulmányozása során rámutattak arra, hogy a tumorok mitokondriális fehérjéinek mennyisége annál jobban csökken, minél gyorsabban növő tumorról van szó. Adataik alapján a patkánymáj mitokondriumának fehérjetartalma 50 mg/g/ nedves súly volt, mely érték a gyorsan növő hepatomák esetén akár 14—9 mg-ra is lecsökkent. Ha saját adatainkat 1 g nedves súlyra számítva tüntetjük fel, azt látjuk, hogy a csirke hepatomában mért mitokondriális fehérje tartalom a májban mért 30 mg/g értékről 17,1 mg/g-ra csökkent. A csökkenés mértéke megfelel a kémiai karcinogénekkal előidézett gyorsan növő hepatomáknál leírtaknak. Lapis elektronmikroszkópos

vizsgálattal a mitokondriumok számának csökkenését és szerkezeti károsodását figyelte meg (Lapis 1975, megjelenés előtt). A fehérje szintetizáló rendszer biokémiai szubsztrátumának megfelelő mikroszóma frakció fehérje, RNS és foszfolipid tartalma a tumorban és a májban hasonló volt, számottevő mennyiségi különbséget nem tudtunk kimutatni.

A mag fokozott és a citoplazma csökkent fehérje tartalma felveti a lehetőséget, hogy a tumor mikroszomális rendszerének működése a magi fehérjék szintézisének irányába tolódik el, a sejt plazma differenciált működéséhez szükséges fehérjék szintézise pedig visszaszorul. Ezt a feltevést támasztják alá azok az adatok, melyek a Morris hepatomák növekedési ütemével párhuzamosan fokozódó aminosav beépülésről számolnak be. Ezzel ellentétben pedig számos, a máj differenciált működéséhez szükséges enzim aktivitása csökken (Lea és mtsai 1966, Morris 1965, Ohe és mtsai 1967, Weber 1968, Weber 1974). Ezek az adatok saját eredményeinkhez hasonlóan a szabályozó rendszer zavarára utalnak és rámutatnak arra a tényre, hogy a differenciált működést végző citoplazma organellumok fehérje tartalmának csökkenése fokozott fehérje szintetizáló aktivitás mellett jön létre. A foszfolipid tartalom csökkenését a tumor citoplazma organellumokban való elszegényedése magyarázhatja (Lapis 1976).

Adataink arra utalnak, hogy a vírus által indukált transzplantálható hepatoma számos, a kémiai karcinogénekkal előidézett hepatomákéhoz hasonló sajátossággal rendelkezik. A mag dominanciája, a csökkent citoplazmatikus fehérje és foszfolipid tartalom tehát a daganatkeltő ágenstől függetlenül megfigyelhető, és a változás mértéke a vizsgált paraméterek vonatkozásában úgy tűnik, valóban a növekedés sebességétől függ, mivel az általunk vizsgált igen gyors növekedésű hepatomában mért változások a gyorsan proliferáló Morris hepatomákban, valamint a Novikoff hepatomában észleltekhöz hasonlíthatók.

Összefoglalás

Szerzőnk egy olyan új transzplantálható hepatoma DNS, RNS, fehérje és foszfolipid tartalmát vizsgálták, melyet vírussal indukált májrákból alakítottak ki, és az első ismertén víruseredetű transzplantálható hepatoma. A tumor és máj homogenizátum, valamint a mag, mitokondrium, mikroszóma és hialoplazma frakciók összehasonlító vizsgálata alapján megállapították, hogy a hepatomasejtek magjának DNS, RNS és fehérjetartalma jelentősen megnőtt, míg a mitokondrium és hialoplazma RNS és fehérje tartalma lecsökkent a máj azonos frakcióihoz viszonyítva. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a hepatomában a makromolekulák megoszlása a mag javára tolódik el.

IRODALOM

- Beard, D., Chabot, J. F., Langlois, A. J., Hillman, E. A. és Beard, J. W.*: Arch. Geschwulstforsch **35**, 315 (1970).
- Brown, A. M.*: Arch. Biochem. **11**, 269 (1946).
- Busch, H., Hodnett, J. L., Morris, H. P. és Unuma, T.*: Methods in Cancer Research IV. 179 (1968).
- Burton, K.*: Biochem J. **62**, 315 (1956).
- Fiske, H. G. és Subbarow, Y.*: J. Biol. Chem. **66**, 375 (1925).
- Hogeboom, G. H.*: Methods in Enzymology I. 16 (1955).
- Klein, G.*: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **69**, 1056 (1972).
- Lapis, K., Beard, D. és Beard, J. W.*: Orvostudomány **24**, 229 (1973).
- Lapis, K., Beard, D. és Beard, J. W.*: Orvostudomány **25**, 151 (1974).
- Lapis, K. és Schaff, Zs.*: Orvosi Hetilap **19**, 1081 (1974).
- Lapis, K., Beard, D. és Beard, J. W.*: Cancer Res. **35**, 132 (1975).
- Lapis, K.*: Orvostudomány (1976) megjelenés alatt.
- Lea, M. A., Morris, H. P. és Weber, G.*: Cancer Res. **26**, 465 (1966).
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. és Randall, R. J.*: J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).
- Molnár, F. és Daoust, R.*: Cancer Res. **25**, 213 (1965).
- Morris, H. P.*: Advances in Cancer Res. **9**, 228 (1965).
- Morris, H. P. és Wagner, B. P.*: Methods in Cancer Res. IV. 125 (1968).
- Ohe, K., Morris, H. P. és Weinhouse, S.*: Cancer Res. **27**, 1360 (1967).
- Pitot, H. C.*: Fed. Proc. **21**, 1124 (1962).
- Sarkar, N. H. és Moore, D. H.*: Nature **236**, 103 (1972).
- Weber, G. és Cantero, A.*: Endocrinology **61**, 701 (1957).
- Weber, G.*: Advances in Cancer Res. **6**, 403 (1961).
- Weber, G.*: Naturwissenschaft **55**, 418 (1968).
- Weber, G.*: Differentiation and Control of Malignancy of Tumour Cells. 151—180 University Tokyo Press, Tokyo 1974.