

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

ÖSSZEHASONLÍTÓ ENZIMINDUKCIÓS VIZSGÁLATOK A HEPATOMA ÉS MÁJSZÖVETBEN

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

Közlésre érkezett: 1976. II. 6.

A kémiai karcinogénekkal előidézett transzplantálható hepatomák morfológiai, biológiai és biokémiai tanulmányozása során számos szerző mutatott rá, hogy ezek a tumorok a növekedés ütemének fokozódásával párhuzamosan egyre több májra jellemző tulajdonságot veszítenek el (Morris 1965, Miyaji és mtsai 1968, Shonk 1965, Weber és Lea 1967, Weber 1968, Weber 1974). Fény derült arra is, hogy a biztosan malignus, de lassú növekedésű és jól differenciált H 5123-as hepatoma biokémiai sajátosságai tekintetében alig különbözik a májtól és nem rendelkezik a malignitás eddig elismert biokémiai paramétereivel (Pitot 1963). A különböző növekedési sebességű hepatomák tanulmányozásának eredményeképpen alakította ki Weber a molekuláris korrelációs elméletét, mely szerint a daganatos sejttanyagcsere lényegét az anabolikus és katabolikus folyamatok egyensúlyának progresszív felborulása jelenti. A hepatomákban a növekedés ütemével arányosan csökken a szénhidrátok szintézise, valamint a nukleinsavak és fehérjék lebontása. Ugyanekkor a szénhidrátok lebontása és a nukleinsavak szintézisének üteme növekszik (Weber és Lea 1967, Weber 1968). Weber az átoltás gyakoriságával jellemzett növekedési sebesség alapján a patkány hepatomákat gyors, közepes és lassú növekedésű csoportokra osztotta fel. Az MC-29 vírussal indukált hepatoma transzplantálható formája biológiai és morfológiai sajátosságai alapján a leggyorsabban növő májtumorok közé tartozik (Lapis 1974). Vizsgálataink meglepő módon mégis arra utaltak, hogy bár számos szubcelluláris frakció fehérje tartalma csökkent a májhoz viszonyítva, a fehérjeszintézisben döntő szerepet játszó mikroszóma frakció a hepatomában aránylag jól megőrzött volt. Kérdéses azonban, hogy mennyiben tekinthető az említett frakció — megőrzött fehérje tartalma alapján — minőségileg is változatlanak.

Ismeretes, hogy a máj számos olyan enzimmal rendelkezik, mely más szervben nem, vagy csak igen alacsony aktivitással működik. Ilyen enzimek aktivitásának vizsgálata a hepatomában választ adhat arra a kérdésre, hogy

ez az igen gyorsan proliferáló tumor őrzött-e meg és ha igen, milyen mértékben, májra jellemző tulajdonságokat. Lehetővé válik ilyen módon bizonyos sejtfrakciók mélyebb tanulmányozása is, ha olyan enzimeket választunk vizsgálataink tárgyául, melyek aktivitása bizonyos sejtorganelumokhoz kötött. A fenti megfontolások alapján a következő három kérdésre kerestünk választ:

1. Vannak-e a hepatomában májspecifikus enzimek?
2. Amennyiben vannak, aktivitásuk a májéhoz hasonló-e?
3. Stimulusok hatására a tumorban levő enzimek a máj enzimeihez hasonlóan reagálnak-e?

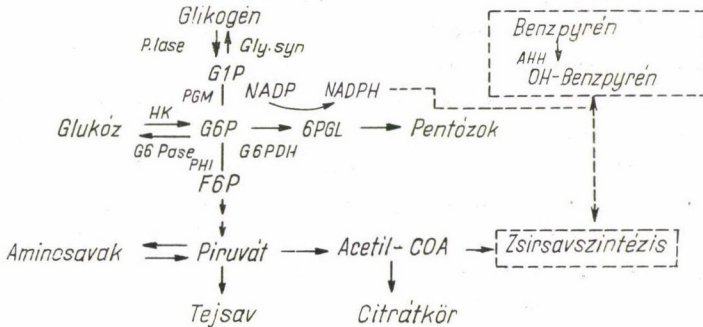
Vizsgálataink tárgyául 2 mikroszomális enzimet, az aril hidrokarbon hidroxilázt (AHH) és a glükóz-6-foszfátázt (G-6-Pase) választottuk. A két enzim a májban található meg legnagyobb mennyiségben, működésük a magas differenciált májszövetre jellemző, aktivitásuk a tumorban, a daganatsejtek élete szempontjából nem szükséges, működésük az egész szervezet szolgálatában áll, mivel a G-6-Pase biztosítja a glükóz kijutását a májsejtekből, az AHH pedig a méregtelenítésben játszik fontos szerepet. Működésüket endogen (hormonok) és exogen (pl. gyógyszerek) anyagok egyaránt befolyásolni képesek. A két mikroszomális enzim mellett figyelmünk a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim vizsgálatára is kiterjedt (G-6-P DH), mivel Weber (1963) és Shonk (1965) kimutatta hogy ezen enzim aktivitása az összes malignus hepatomában magasabb, mint a májban.

Vizsgálati rendszerünk a sejtanyagcsereben centrális szerepet játszó glükóz-6-foszfát köré csoportosult. A G-6-P jelentőségét az a tény emeli ki, hogy az átalakulás során képződő termékek a sejtanyagcsere csaknem minden lépésébe bekapcsolódhatnak. Szerepe van az energia glikogén formájában történő tárolásában, a belőle felszabaduló glükóz a szervezet energia pótlására szolgál, direkt oxidációja során képződő termékek a nukleinsav szintézisbe kapcsolódnak be, ugyanitt képződik a zsírsav szintézishez és a gyógyszerátalakító enzim működéséhez szükséges NADPH, a glikolizisen át kapcsolódik a terminális oxidációhoz, az aminosav és zsírsav szintézishez (1. ábra).

Annak eldöntése érdekében, hogy a tumorban kimutatható májra jellemző anyagcsere folyamatok különböző stimulusok hatására a májhoz hasonlóan változnak-e meg, részben exogen szer, részben pedig a szervezetben fiziológiásan is előforduló, és a szénhidrát anyagcserét befolyásoló két hormon hatását vizsgáltuk. A három alkalmazott stimulálószer kiválasztásához a következő megfontolások vezettek.

Ismeretes, hogy a glükóz-6-Pase kulcsenzim szerepét tölti be a máj glikoneogenetikus tevékenységében (Weber és Lea 1967, Weber 1968). A glikoneogenezis pedig, és ezzel együtt a G-6-Pase aktivitása, szteroiddal fokozható. Ugyanezen enzim diabetesben fokozott aktivitását Langdon és Weakly (1955), valamint Ashmore és Weber (1959) adatai szerint az Insulin normalizálja. Ezen kívül az Insulin hatására a G-6-P direkt oxidációja és így a zsír-

savsintézishez, valamint az AHH működéséhez elengedhetetlenül szükséges NADPH képződés is fokozódik. E folyamat első lépését az általunk is vizsgált G-6-P DH katalizálja. Ismert tény, hogy a policiklikus szénhidrogének csoportjába tartozó metilkolantrén a máj gyógyszerátalakító enzymaktivitását fokozni képes (Gelboin 1967). Másrészt e szer az egyik legismertebb kémiai karcinogén, így a hatására létrejövő változások egy vírussal indukált tumorban, esetleg újabb ismeretek forrását képezhetik.



I. ábra. A kísérleti rendszerben vizsgált enzimek szerepe a glükóz-6-foszfát intermedier anyagcseréjében. Rövidítések: P. lase: foszforiláz, Gly. sin.: glikogén szintetáz, PGM: foszoglukomutáz, HK: hexokináz, G-6-Pase: glükóz-6-foszfátáz, G-6-PDH: glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, PHI: foszfohexoizomeráz, AHH: aril-hidrokarbon hidroxiláz, G-1-P: glükóz-1-foszfát, G-6-P: glükóz-6-foszfát, 6PGL: glükonsav-6-foszfát.

Anyag és módszer

Vizsgálatainkat mindkét nembeli Hunnia hibrid csirkébe subcutan transzplantált a 30—46. átváltásokból származó 10 napos tumoron végeztük. Összehasonlításként 10 napos egészséges csirkék máját használtuk. A szövetmintákat a dekapitálással megölt állatokból azonnal eltávolítottuk, és ha nem kerültek azonnal felhasználásra, —25 °C-on tároltuk. A vizsgálatainkhoz használt vegyszerek közül a benzpirén Sigma, a metilkolantrén Fluka, a NADP, NADPH és G-6-P Serva gyártmányú volt. A kristályos Insulin és a Hydrocortison a Kőbányai Gyógyszerárugyár készítménye volt. Az AHH aktivitását Nebert és Gelboin (1968) módszere szerint végeztük a Diamond (1972) által leírt módon. A reakcióelegyet 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd a reakciót 1 ml acetonnal állítottuk le. Az átalakulási terméket először hexánba, majd 1 N NaOH-ba ráztuk át, a lúgban oldódó 3-OH-Benzpirént Farrand spektrofлуorimeteren 400 mm gerjesztésnél az 520 mm-en mért fluorescentia intenzitásával mértük. Az értéket ismert mennyiségű OH-Benzpirént tartalmazó hígítási sor fluorescentia görbéjével hasonlítottuk össze. A standard görbe készítéséhez szükséges 3-OH-Benzpirént Dr. Gelboin állította elő, és a Lyoni Rák-

kutató Centrum bocsátotta rendelkezésünkre. Az enzimaktivitást egységekben fejeztük ki, 1 E = az az AHH aktivitás, mely az inkubációs idő alatt 1 μ M 3-OH-BP keletkezését katalizálja. A G-6-Pase aktivitást Harper (1962) módszere szerint mértük. A reakcióelegy 0,1 ml 0,1 M-os (pH 6,5) citrát-pufferben homogenizált szövetmintát és 0,1 ml 0,08 M-os glükóz-6-P-t tartalmazott. A mintákat 15 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd a reakciót 2 ml 10%-os trklóecetsavval állítottuk le. A képződött anorganikus foszfor mennyiségét Fiske és Subarrow (1925) módszere szerint határoztuk meg. Az enzimaktivitást 1 mg fehérjét tartalmazó homogenát által 1 óra alatt felszabadított anorganikus foszfor mennyiségében fejeztük ki.

A glükóz-6-P-DH aktivitásának meghatározását Löhr és mtsa (1962) módszere szerint végeztük. A fotométer küvettába 2,4 ml (pH 7,5) 0,05 M-os trietanolamin-HCl puffert, 0,5 ml májhomogenizátumot, 0,05 ml 25 mg/ml töménységű NADP-t, majd 5 perc múlva 0,05 ml 0,04 M-os G-6-P-t teszünk. A képződő NADPH intenzitását 340 nm-en mértük. Az enzimaktivitást az 1 óra alatt képződő NADPH mennyiségében fehérjére, vagy nedvessúlyra vonatkoztatva fejeztük ki. Az enzimstimulációs kísérleteinkben a metilkolantrént egyszeri 25 mg/kg testsúly dózis intraperitonealis befecskendezésével, az állatok leölése előtt 24 órával adtuk. A hidrokortizon dózisa 250 mg/kg i.p. volt, a szert 1, 7, 24 órával az ölés előtt adagoltuk. Az Insulint 200 E/kg testsúly dózisban szubkután befecskendezéssel juttattuk az állatok szervezetébe. Az állatokat a kezelést követő 1,3 és 7. órában öltük meg.

Eredmények

Vizsgálataink során először a 3 enzim alapaktivitását mértük meg. Az I. táblázaton látható, hogy a hepatomában az AHH és glükóz-6-Pase aktivitás megtalálható. Ez az eredmény azért figyelemre méltó, mert az általunk vizsgált tumorral azonos növekedési sebességű Morris hepatomákban a két enzim aktivitása gyakorlatilag már nem mérhető (Sugimura 1966, Weber 1968). A G-6-P DH aktivitás hasonlóan Weber (1963) és Shonk (1965) adataihoz, a tumorban jóval magasabb volt, mint a májban.

Összefoglalva tehát az MC-29 vírussal indukált májtumorból kialakított transzplantálható hepatomában két májra jellemző enzim aktivitását és egy, a malignus hepatomákra jellemző enzim aktivitás emelkedést tudtunk megfigyelni.

Stimuláló szereink a három enzim aktivitását a következő módon befolyásolták:

Metilkolantrén befecskendezése után 24 órával az AHH aktivitás az egészséges májban jelentősen fokozódott (2. táblázat). A hepatomában a kezelést követően az eredetileg is nagyon alacsony aktivitás csaknem nullára csök-

I. táblázat

Az aril-hidrokarbon-hidroxiláz, glükóz-6-foszfátáz és glükóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitása a csirkemájban és az MC-29 vírussal indukált hepatómában

Enzim	Mérések száma	Aktivitás pikomól 3-OH-BP/óra					
		per mg fehérje			per 10 ⁶ sejt		
		Máj	Hepatoma	% ^a	Máj	Hepatoma	% ^a
AHH	10	30,0 ± 4,5 ^b	4,4 ± 2,3	14,6	4,6 ± 0,7	0,42 ± 0,22	9,0
nanomól P _i /óra							
		per mg fehérje			per 10 ⁶ sejt		
		Máj	Hepatoma	% ^a	Máj	Hepatoma	% ^a
		G-6-Pase	10	1400 ± 182	800 ± 96	5 ^c	217 ± 28,2
nanomól NADPH/óra							
		per mg fehérje			per 10 ⁶ sejt		
		Máj	Hepatoma	% ^a	Máj	Hepatoma	% ^a
		G-6-P- DH	6	21,3 ± 3,0	121,8 ± 8,6	576 ^c	3,2 ± 0,46

a: a tumorban mért aktivitás a máj aktivitásának %-ban kifejezve.

b: ± SE

c: a különbség statisztikailag szignifikáns, p < 0,005

AHH: aril hidrokarbon hidroxiláz

3-OH-BP —: 3-OH-Benzipirén

G-6-Pase: glükóz-6-foszfátáz

P_i: anorganikus foszfor

G-6-P DH: glükóz-6-foszfát dehidrogenáz

II. táblázat

A metilkolantrén hatása a máj és a hepatoma aril-hidrokarbon-hidroxiláz és glükóz-6-foszfátáz aktivitására

	Kezelés	AHH	G-6-Pase
Máj	—	100	100
Máj	MC	528 ^a	90 ^b
Hepatoma	—	100	100
Hepatoma	MC	1 ^a	112 ^b

a: statisztikailag szignifikáns: p < 0,05

b: statisztikailag nem szignifikáns

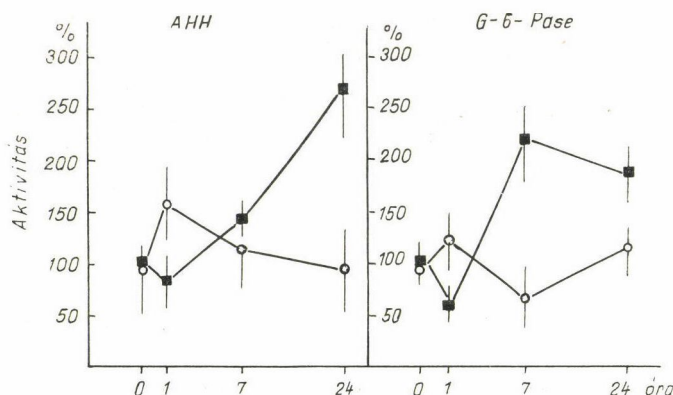
MC = metilkolantrén Dózis: 25 mg/testsúly kg 24 órán át

Eredmények a kezeletlen kontroll %-ában feltüntetve.

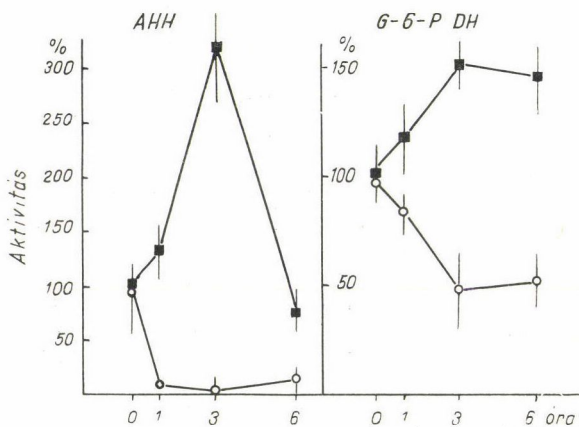
kent. A glükóz-6-foszfataz aktivitását a metilkolantrén érdemlegesen nem befolyásolta.

A szteroid hormonok közül stimuláló szerként kiválasztott hidrokortizon hatását a 2. ábrán tüntettük fel. A májban a kezdeti enyhe aktivitás csökkenést követően az AHH aktivitása nagymértékben fokozódik, hasonló módon emelkedik a G-6-Pase aktivitás is. A szteroid hatására a tumorban sem az AHH, sem a G-6-Pase aktivitása nem változik.

200 E/kg testsúly Insulin subcutan befecskendezése után jellemző változás az AHH és a G-6-P DH aktivitásában volt észlelhető. A májban az AHH és a G-6-P DH aktivitása a szer adását követő 3. órára jelentősen fokozódik,



2. ábra. 250 mg/kg testsúly hidrokortizon hatása a máj és a hepatoma AHH, illetve glükóz-6-foszfataz aktivitására. — máj, o—o hepatoma. Az eredményeket az alapaktivitás %-ában kifejezve tüntettük fel. Az egyes pontok 5—5 párhuzamos vizsgálatnak felelnek meg.



3. ábra. 200 E/kg testsúly Insulin hatása a máj és a hepatoma AHH, illetve glükóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitására. — máj, o—o hepatoma. Az eredményeket az alapaktivitás %-ában kifejezve tüntettük fel. Az egyes pontok 5—5 párhuzamos vizsgálatnak felelnek meg.

majd a továbbiakban az AHH aktivitása rohamosan zuhan, a G-6-P DH lassan, de a 6. órára szintén csökken és közeledik eredeti értékéhez (3. ábra). A tumorban az Insulin hatására az AHH aktivitás csaknem teljesen eltűnik. A kísérlet során gyorsteszt segítségével tájékozódunk az állatok vércukor értékéről, mely szintén a 3. órában bizonyult a legalacsonyabbnak.

Megbeszélés

Vizsgálataink során választ szerettünk volna kapni arra a kérdésre, hogy egy vírus által előidézett májtumorból kialakított transzplantálható hepatoma rendelkezik-e a sejtanyagcsere olyan lépéseivel, melyek a májra jellemzőek, és ha igen, ezek a folyamatok befolyásolhatók-e különböző szabályozó tényezőkkel. A három enzim aktivitását vizsgálva megállapíthattuk, hogy hasonlóan a kémiai karcinogénekkal indukált transzplantálható hepatomákhoz, az MC-28 vírus által indukált hepatoma transzplantálható formájában is jelentősen csökkent a két mikroszomális enzim és nőtt a G-6-P DH aktivitása. Említésre méltónak tartjuk azonban, hogy a vizsgált tumor növekedési ütemét figyelembe véve a mikroszomális enzimek csökkenésének mértéke kisebb, mint a kémiai karcinogénekkal indukált tumorokban, mivel hasonló gyors növekedésű Morris hepatoma a két enzimet már nem tartalmazza (Sugimura 1966, Weber és Lea 1967, Weber 1968). A májspecifikus enzimeken kívül ki tudtuk mutatni a malignus hepatomákra jellemző emelkedett G-6-P DH aktivitást is (Morris 1965, Weber 1963, Shonk 1965). A G-6-Pase és az AHH viszonylag jól megőrzött volta vetette fel a kérdést, vajon stimulusok hatására ezen enzimek működése a májban és a tumorban hasonló módon változik-e meg. A metilkolantrénnel és a két endogén hormonnal, végzett stimulálás hatására vizsgált enzimek aktivitása a májban fokozódott. A hepatomában aktivitás fokozódását egyik szer sem volt képes kiváltani, sőt metilkolantrénnel és hidrokortizon hatására az AHH, Insulin hatására pedig az AHH és a G-6-P DH enzim aktivitása csökkent.

Az AHH és a G-6-Pase aktivitás jelenléte az általunk vizsgált tumorban arra utal, hogy a máj differenciált funkcióiért felelős genetikai információk megtalálhatóak és — legalábbis bizonyos mértékben — képesek a tumorsejtekben is érvényesülni. Klinikai megfigyelések is arra utalnak, hogy számos differenciált tevékenység fokozódhat, vagy akár megjelenthet bizonyos daganatokban (Weber 1974). Ez szintén arra utal, hogy a dedifferenciálódás biokémiai értelemben nem szükséges velejárója a malignitásnak. Vizsgálataink, melyek rámutattak, hogy a tumorsejtek elvesztik érzékenységüket specifikus stimuláló szereik iránt inkább a sejtreguláció károsodásának alapvető szerepére utalnak. Pitot és Cho (1965) számos vizsgálat eredményeképpen szintén azt a következtetést vonták le, hogy a tumorok enzim stimuláló hatásokra sokkal kevésbé reagálnak, mint a normális, egészséges sejtek.

Vizsgálataink bizonyítékot szolgáltatottak arra, hogy a Weber (1974) által kémiai karcinogénekkal előidézett hepatomákban megfigyelt gén-expresszió újra programozódás a vírus karcinogenezis során is kialakul.

Összefoglalás

Szerzők májspecifikus enzimek viselkedését vizsgálták egy vírussal kialakított májtumor transzplantálható formájában.

Megállapították, hogy a tumorban a máj aril hidrokarbon hidroxiláz aktivitásának kb. 10%-a, a glükóz-6-foszfátáz aktivitásának mintegy 1/3-a mérhető. Kimutatták a malignus hepatomákra jellemző emelkedett glükóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitást is. A májspecifikus enzimek aktivitásának relatíve magas volta ellenére a hepatomában stimuláló szerekkel aktivitás fokozódását nem lehetett kiváltani.

Szerzők véleménye szerint ezek az adatok arra utalnak, hogy a malignizáció során a genetikai információk megnyilvánulását szabályozó tényezők károsodása fontos szerepet játszik.

IRODALOM

- Ashmore, J. és Weber, G.: Vitamins and Hormons XVII. 91 (1959).
 Diamond, L., McFall, R., Miller, J. és Gelboin, H. V. Cancer Res. **32**, 731 (1972).
 Fiske, C. H. és Subarrow, I. J. Biol. Chem. **66**, 375 (1925).
 Gelboin, H. V.: Advances in Cancer Res. **10**, 1 (1967).
 Harper, A. E. és Bergmeyer: Methoden der Enzymatischen Analyse. Verlag Chemie. GMBH. Weinheim/Bergstr. (1962).
 Langdon, R. G. és Weakley, D. R.: J. Biol. Chem. **214**, 167 (1955).
 Lapis, K., Beard, D. és Beard, J. W.: Orvostudomány **25**, 151 (1974).
 Löhr, G., W., Waller, H., D. és Bergmeyer: Methoden der Enzymatischen Analyse. Verlag Chemie. GMBH. Weinheim/Bergstr. (1962).
 Morris, H. P.: Advances in Cancer Research **9**, 227 (1965).
 Miyaji, H., Morris, H. P. és Wagner, B. P.: Methods in Cancer Research IV, 153 (1968).
 Nebert, D. W. és Gelboin, H. W., J.: Biol. Chem. **243**, 6242 (1968).
 Pitot, H. C.: Cancer Res. **23**, 1474 (1963).
 Pitot, H. C. és Cho, Y. S.: Progress in Experimental Tumor Res. **7**, 158 (1965).
 Shonk, C. E.: Cancer Res. **25**, 671 (1965).
 Sugimura, T.: Cancer Res. **26**, 1711 (1966).
 Weber, G. és Morris, H. P.: Cancer Res. **23**, 987 (1963).
 Weber, G. és Lea, M. A.: Methods in Cancer Reserarch. **2**, 523 (1967).
 Weber, G.: Naturwissenschaft **55**, 418 (1968.)
 Weber, G.: In: Differentiation and Control of Malignancy of Tumour Cells. Ed: (NAKAHARA) pp. 151. Proc. 4 th international Symposium of the princess Takamatsu Cancer Research Fund, Tokyo: University of Tokyo Press, 1974.