

Instytut Nauk Biomedycznych AWF w Warszawie
Filia w Białej Podlaskiej
Pracownia Biologii i Antropologii

Alicja Maria GRABOWSKA

**Naturalne inhibitory aktywności ferrochelatazy w przypadku
czerniaka złośliwego u chomików**

Естественные ингибиторы активности феррохелатаза в случае пигментной
меланомы у хомяков

Natural Inhibitors of Ferrochelataze Activity in Melanocarcinoma in Hamsters

WSTĘP

Nowotwory mają zdolność wytwarzania specyficznych substancji powodujących zaburzenia w metabolizmie gospodarza. W r. 1948 Nakahara i Fukuoka (6, 7) wyizolowali z tkanek różnych nowotworów ludzkich toksyczną substancję, którą nazwali toksohormonem. Biologiczne efekty oddziaływania toksohormonu były przedmiotem wielu badań. Obecnie przyjmuje się, że toksohormon powoduje obniżenie aktywności katalazy w wątrobie i poziomu żelaza w surowicy krwi, wzrost poziomu porfiryn wątrobowych oraz zwiększenie ciężaru wątroby, śledziony i nadnerczy (1, 7, 10).

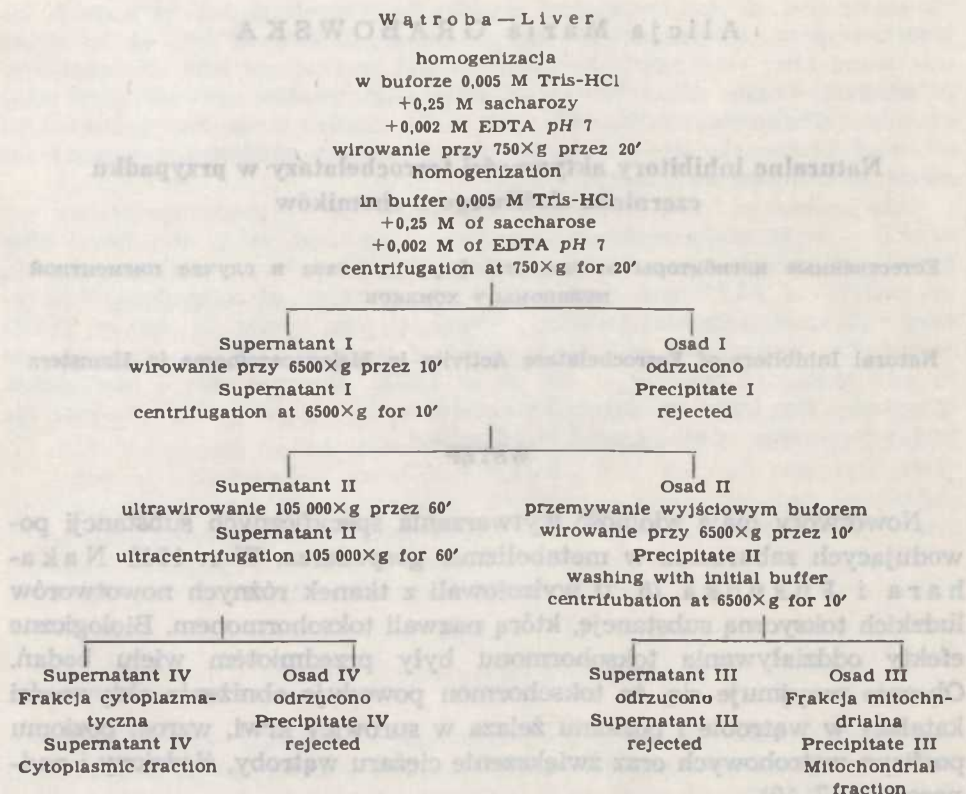
W naszych badaniach (3) nad czerniakiem melanocytycznym pasażowanym na chomiku syryjskim, zaobserwowaliśmy w wątrobie zwierząt z tym guzem zmiany aktywności ferrochelatazy (E.C.4.99.1.1). W pracy niniejszej przedstawiono doświadczenia nad zmianami aktywności ferrochelatazy wątrobowej *in vivo* i *in vitro* pod wpływem naturalnych inhibitorów w przypadku *melanoma melanoticum*.

MATERIAŁ I METODY

Preparat frakcji mitochondrialnej, zawierający enzym ferrochelatazę, izolowano z wątrób chomiczków zdrowych oraz z wątrób zwierząt z przeszczepialnym guzem czerniaka pigmentowego według schematu 1.

Schemat 1. Izolacja frakcji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej z komórek wątroby chomiczej

The isolation of cytoplasmic and mitochondrial fractions from the hamster liver cells



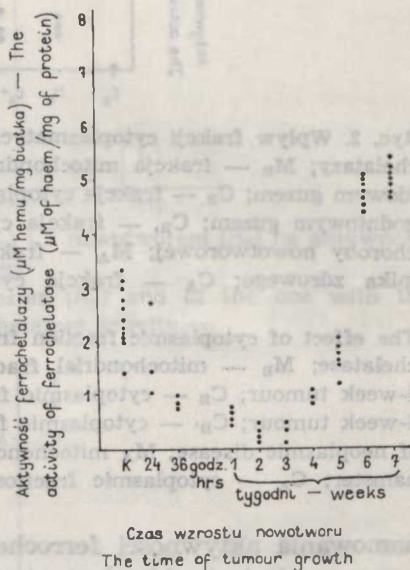
Aktywność enzymu oznaczano wykorzystując powstawanie hemochromogenu pirydyny według metody Porra i Jonesa (8). W doświadczeniu *in vitro* w głównym ramieniu aparatu Thunberga umieszczano 5 mg białka frakcji mitochondrialnej wątroby, 200 mM protoporfiryn, 200 nM buforu fosforanowego, 1 mg białka surowicy bądź 1 mg białka frakcji cytoplazmatycznej. Frakcję cytoplazmatyczną otrzymywano przez ultrawirowanie przy 105 000×g w ciągu 60 min. homogenatu z wątroby, przygotowanego według schematu 1. Boczne ramię aparatu Thunberga zawierało 400 nM FeSO₄ i 20 nM dwutiotreitolu. Przed rozpoczęciem inkubacji próbki doprowadzano pH do 8–8,1. Preparat toksohormonu izolowano z guzów czerniaka złośliwego pasażowanych na chomiku syryjskim (10). Przy oznaczaniu wpływu preparatu toksohormonu na aktywność ferrochelatazy *in vitro* w głównym ramieniu

aparatu Thunberga umieszczano określoną ilość frakcji toksohormonu TH_2 rozpuszczoną w 0,2 ml wody destylowanej. Uwzględniono próbę kontrolną bez toksohormonu i drugą — z zagotowanym enzymem. Białko oznaczano metodą Lowry i współprac. (4).

WYNIKI

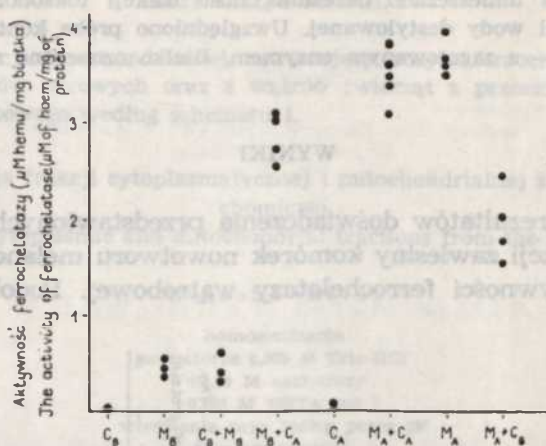
Jak widać z rezultatów doświadczenia przedstawionych na ryc. 1 po 24 godz. od iniekcji zawiesiny komórek nowotworu melanoma występuje 50% spadek aktywności ferrochelatazy wątrobowej. Podobny efekt ha-

Ryc. 1. Wpływ homogenatu z nowotworu melanoma na aktywność ferrochelatazy wątrobowej *in vivo*
The effect of the homogenate from melanoma neoplasm on the activity of ferrochelataze *in vivo*



mowania aktywności ferrochelatazy uzyskano w doświadczeniu *in vitro* przez frakcję cytoplazmatyczną izolowaną z komórek wątroby chomika we wczesnym okresie choroby nowotworowej (guz niewykształcony) — ryc. 2. Sama frakcja cytoplazmatyczna izolowana z komórek wątroby chomika zdrowego (C_A) bądź chomika z nowotworem (C_B) nie wykazuje aktywności ferrochelatazowej. Dodanie frakcji C_A do enzymu izolowanego z wątroby chomika zdrowego nie ma wpływu na aktywność ferrochelatazy.

Działanie surowicy zwierzęcia zdrowego oraz chomika z 4-tygodniowym nowotworem na aktywność ferrochelatazy w wątrobie chomika zdrowego przedstawia ryc. 3. Stwierdzono, że surowica chomika z guzem czerniaka złośliwego powoduje ok. 70% spadek aktywności ferrochelatazy wątrobowej. Natomiast surowica zwierzęcia zdrowego wywołuje tylko nieznaczne (4%) obniżenie aktywności badanego enzymu. Jedną z przyczyn



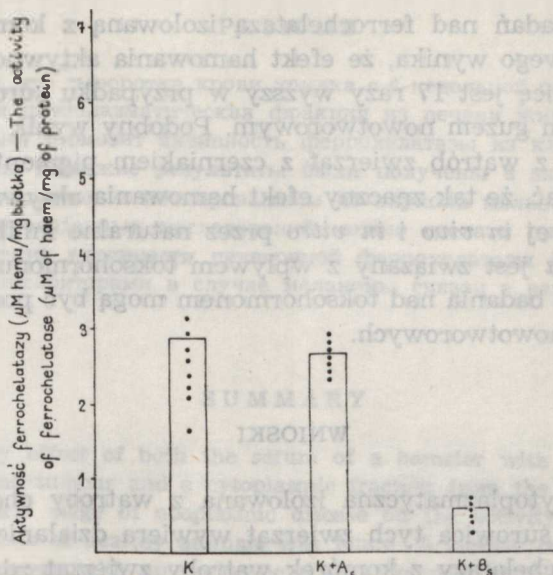
Ryc. 2. Wpływ frakcji cytoplazmatycznej z wątroby chomiczej na aktywność ferrochelatazy; M_B — frakcja mitochondrialna z komórek wątroby chomika z 4-tygodniowym guzem; C_B — frakcja cytoplazmatyczna z komórek wątroby chomika z 4-tygodniowym guzem; C_B, — frakcja cytoplazmatyczna z wątroby chomika w 7 dniu choroby nowotworowej; M_A — frakcja mitochondrialna z komórek wątroby chomika zdrowego; C_A — frakcja cytoplazmatyczna z komórek wątroby chomika zdrowego

The effect of cytoplasmic fraction from the hamster liver on the activity of ferrochelatase; M_B — mitochondrial fraction from the liver cells of a hamster with 4-week tumour; C_B — cytoplasmic fraction from the liver cells of a hamster with 4-week tumour; C_B, — cytoplasmic fraction from the hamster liver on the 7th day of neoplastic disease; M_A mitochondrial fraction from the liver cells of a healthy hamster; C_A — cytoplasmic fraction from the liver cells of a healthy hamster

hamowania aktywności ferrochelatazy wątrobowej w przypadku melanomoma mogło być oddziaływanie toksohormonu. Doświadczenia nad wpływem toksohormonu na aktywność ferrochelatazy wątrobowej ilustruje ryc. 4. Okazało się, że preparat toksohormonu TH₂ w układzie *in vitro* powoduje obniżenie aktywności ferrochelatazy wątrobowej, przy czym w zakresie stosowanych dawek występuje zależność prostoliniowa w skali logarytmicznej.

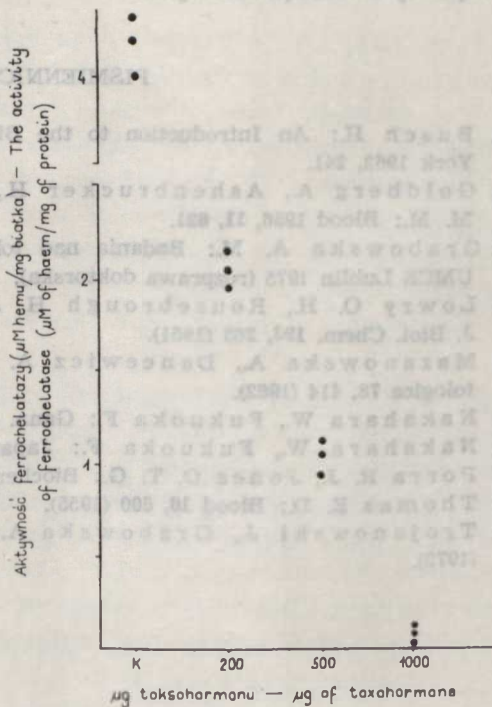
DYSKUSJA

Plazma i surowica różnych gatunków zwierząt wykazuje działanie hamujące na inkorporację Fe przez ferrochelatazę izolowaną z erytrocytów (2, 9). Jak wykazały badania przeprowadzone przez Mazanowską i współprac. (5), ten inhibitorowy efekt jest związany z frakcją białkową albumin.



Ryc. 3. Wpływ surowicy chomika zdrowego (A₅) i z nowotworem (B₅) na aktywność ferrochelatazy

The effect of the serum of a healthy hamster (A₅) and of the one with the neoplasm (B₅) on ferrochelataze activity



Ryc. 4. Wpływ toksohormonu TH₂ na aktywność ferrochelatazy wątrobowej w układzie *in vitro*

The effect of TH₂ toxohormone on the activity of hepatic ferrochelataze *in vitro*

Z naszych badań nad ferrochelatazą izolowaną z komórek wątroby zwierzęcia zdrowego wynika, że efekt hamowania aktywności tego enzymu przez surowicę jest 17 razy wyższy w przypadku surowicy zwierząt z 4-tygodniowym guzem nowotworowym. Podobny wynik uzyskano przy użyciu cytosolu z wątrób zwierząt z czerniakiem pigmentowym. Można więc przypuszczać, że tak znaczny efekt hamowania aktywności ferrochelatazy wątrobowej *in vivo* i *in vitro* przez naturalne inhibitory w przypadku *melanoma* jest związany z wpływem toksohormonu (ryc. 4). Wydaje się więc, że badania nad toksohormonem mogą być pomocne w diagnostyce chorób nowotworowych.

WNIOSKI

1. Frakcja cytoplazmatyczna izolowana z wątroby chomików z nowotworem oraz surowica tych zwierząt wywiera działanie hamujące na aktywność ferrochelatazy z komórek wątroby zwierząt zdrowych w doświadczeniu *in vitro*.
2. Preparat toksohormonu z melanoma w doświadczeniu *in vitro* powoduje spadek aktywności ferrochelatazy wątrobowej, wyodrębnionej z wątroby zwierząt zdrowych.

PISMIENNICTWO

1. Busch H.: An Introduction to the Biochemistry of the Cancer Cell. New York 1962, 241.
2. Goldberg A., Ashenbrucker H., Cartwright G.E., Wintrobe M. M.: Blood 1956, 11, 821.
3. Grabowska A. M.: Badania nad toksohormonem z czerniaka złośliwego. UMCS Lublin 1975 (rozprawa doktorska).
4. Lowry O. H., Rousebrough H. J., Farr A. L., Randall R. J.: J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
5. Mazanowska A., Danczewicz A. M., Kowalski E.: Folia Haematologica 78, 414 (1962).
6. Nakahara W., Fukuoka F.: Gann 40, 45 (1949).
7. Nakahara W., Fukuoka F.: Japan Med. J. 1, 271 (1948).
8. Porra R. J., Jones O. T. G.: Biochem. J. 87, 186 (1963).
9. Thomas E. D.: Blood 10, 600 (1955).
10. Trojanowski J., Grabowska A. M.: Biull. Lub. Tow. Nauk. 15, 35 (1973).

РЕЗЮМЕ

Установлено, что сыворотка крови хомяка с 4-недельной опухолью пигментной меланомы и цитоплазматическая фракция из печени животных в неопластической болезни тормозит активность феррохелатазы из клеток печени здоровых животных. Похожие результаты были получены в эксперименте с эндогенным токсого гормоном и изолированным из опухоли меланомы *melanoticicum*.

На основе проведенных исследований можно сделать предположение, что эффект торможения активности печеночной феррохелатазы *in vivo* и *in vitro* естественными ингибиторами в случае меланомы связан с воздействием токсого гормона.

SUMMARY

An inhibitory effect of both the serum of a hamster with a four-month-old pigment melanoma tumour and a cytoplasmic fraction from the livers of the animals in their early stage of neoplastic disease on the activity of ferrochelatase from the liver cells of healthy animals was found. A similar result was obtained during an experiment with an endogenous toxohormone isolated from *melanoma melanoticicum* tumours.

On the basis of the experiments it can be assumed that the effect of inhibiting the activity of liver ferrochelatase *in vivo* and *in vitro* by natural inhibitors in melanoma is connected with toxohormone action.

