

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS  
Zakład Biochemii

Alicja GRABOWSKA, Jerzy TROJANOWSKI,  
Anna PIKUL

### Oczyszczanie toksohormonu

Очищение токсого르몬а

Toxohormone Purification

W r. 1948 Nakahara i Fukuoaka (5) po raz pierwszy wyizolowali toksohormon z różnych tkanek nowotworów.

W r. 1955 Ono i współprac. (8) stosując metodę ekstrakcji metanolowo-octowej proszku acetonowego otrzymanego z guzów sarcoma i hepatoma uzyskali preparat toksohormonu wolny od kwasów nukleinowych.

Trojanowski i współprac. otrzymali 300-krotne oczyszczenie preparatu toksohormonu uzyskanego z guzów czerniaka według metody Nakahary (6), stosując frakcjonowane wysalanie siarczanem amonu i sączenie przez Sephadex G-25 (10).

Zastosowanie chromatografii jonowymiennej przyczyniło się do dalszego postępu w oczyszczaniu toksohormonu.

Yunoki i Griffin (4) do oczyszczania toksohormonu użyli amberlit XE-64. Otrzymali 3 frakcje o aktywności toksohormonalnej o stopniu oczyszczenia ok. 10 000 razy.

Ohasi i Ono (7) oczyszczali surowy preparat toksohormonu na kolumnie z DEAE-celulozy. Otrzymali 10 frakcji. Najwyższą aktywność miała frakcja F-2, która wywoływała efekt biologiczny w dawce 500 µg na mysz.

Fuji (1) rozdzielał preparat toksohormonu na kolumnie z CM-celulozy. W wyniku rozdziału uzyskał 6 frakcji. Frakcje A i B powodowały tylko spadek zawartości żelaza plazmy, natomiast frakcja F wpływała na obniżenie poziomu żelaza plazmy, aktywności katalazy wątrobowej oraz aktywności pirolazy tryptofanowej wątroby.

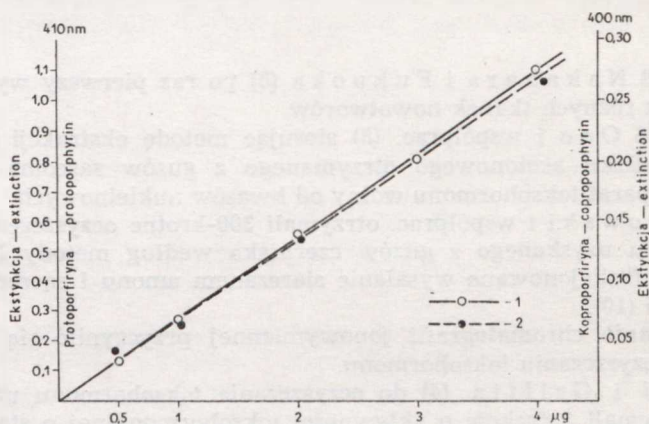
Grabowska i Trojanowski (2) zastosowali kolumnę z sefadeksem G-50 do oczyszczania toksohormonu z guza melanoma. W wyniku rozdziału uzyskali 3 frakcje. Najwyższą aktywność toksohormonalną posiadała frakcja II (TH-2), której stopień oczyszczenia wynosił 1000 razy w porównaniu z frakcją 0. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki dalszego oczyszczania toksohormonu (frakcji TH-2) izolowanego z guzów czerniaka złośliwego.

#### MATERIAŁY I METODY

Materiałem wyjściowym były guzy nowotworowe czerniaka pigmentowego (*Melanoma melanoticum*) pasażowane na chomikach syryjskich. Preparat tok-

sohormonu otrzymano wg zmodyfikowanej przez nas metody Ono (8). Aktywność preparatu sprawdzano badając jego wpływ na poziom wolnych porfiryn wątrobowych (9). W tym celu odważoną ilość preparatu toksohormonu rozpuszczano w 1 ml 0,9% NaCl i wstrzykiwano dootrzewnowo chomikom. Po 24 godzinach zwierzęta usypiano, stosując narkozę eterową, wątroby przemywano 0,9% NaCl, następnie rozdrabniano i homogenizowano w temp. ok. 0°C, używając mieszaniny octanu etylu i kwasu octowego lodowatego w proporcji 1:4. Po odwirowaniu osad odrzucano, a supernatant przemywano 3% octanem sodu. Następnie ekstrahowano porfiryny 3 N HCl. Uzyskany preparat zobojętniano nasyconym octanem sodu i ponownie ekstrahowano octanem etylu. Ekstrakt zawierał protoporfiryny i koproporfiryny, które wyodrębniono stosując 0,1 N HCl.

Protoporfiryny i koproporfiryny oznaczano spektrofotometrycznie na spektrofotometrze VSU-2 Karl Zeiss Jena, odczytując ilości z krzywych kalibracyjnych sporządzonych dla preparatów handlowych (ryc. 1).



Ryc. 1. Krzywe kalibracyjne dla protoporfiryn przy 410 nm i koproporfiryn przy 400 nm z preparatów handlowych: 1 — koproporfiryny, 2 — protoporfiryny  
The calibration curves of protoporphyrin at 410 nm and coproporphyrin at 400 nm drawn up using commercial preparations; 1 — coproporphyrin, 2 — protoporphyrin

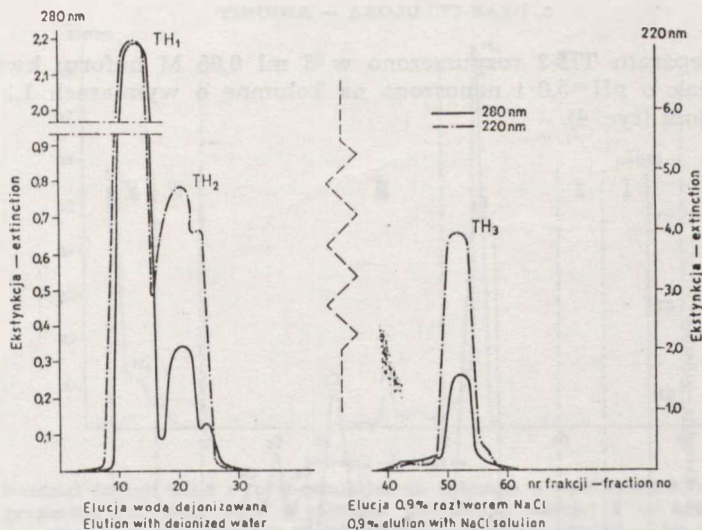
Preparat toksohormonu (TH-2) wyizolowany z guzów czerniaka melanocyticznego oczyszczany na Sephadexie G-50 (11), poddano dalszej preparatyce, stosując: DECALSO-F, DEAE-celulozę, CM-celulozę i Amberlit IRC-50 (ryc. 2).

## WYNIKI

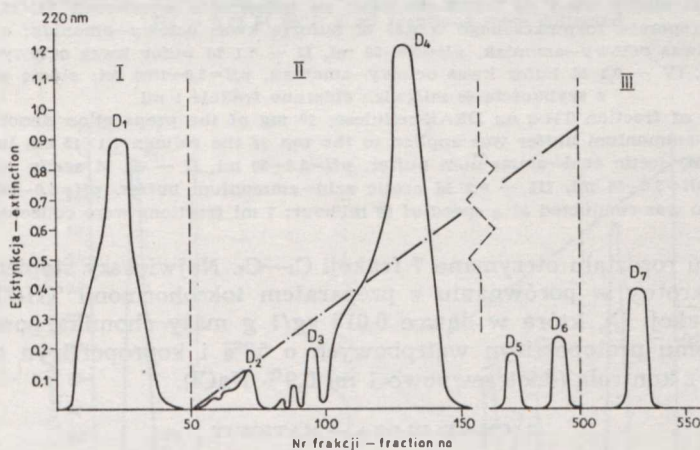
### 1. DECALSO-F — SYNTETYCZNY GLINOKRZEMIAN O SŁABYCH WŁASNOŚCIACH KWASOWYCH.

30 g DECALSO-F zawieszano w wodzie dejonizowanej na 24 godziny, po czym płukano wielokrotnie wodą dejonizowaną, a następnie kolejno: 70 ml 1 N  $\text{NH}_4\text{OH}$ , wodą dejonizowaną, 1 N  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , wodą dejonizowaną i buforem wyjściowym. Na kolumnę o wymiarach 1,5×21 cm nanoszono wymiennicz jonowy. Na tak przygotowanej kolumnie rozdzielano 15 mg preparatu toksohormonu rozpuszczonego w 2 ml 0,1 M buforu cytrynianowego o  $\text{pH}=5,0$ .

W wyniku rozdzielania otrzymano 7 frakcji  $D_1$ — $D_7$ , które zliofilizowano i oznaczono w nich białko metodą L o w r y e g o (3) — ryc. 3.



Ryc. 2. Rozdział frakcji II na sefadesksie G-50  
The separation of fraction II on Sephadex G-50

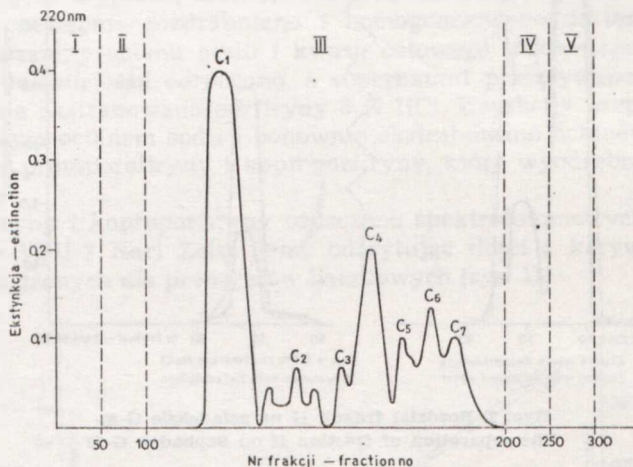


Ryc. 3. Rozdział frakcji TH-2 na DECALSO-F; na kolumnę o wymiarach 1,5×21 cm nanoszono 15 mg preparatu rozpuszczonego w 0,1 M buforze cytrynianowym; elucja: I — bufor cytrynianowy 0,1 M, pH=5,0, II — gradient ciągły: bufor cytrynianowy 0,1 M, do 0,5 M, pH od 5,0 do 8,0, III — 0,1 M HCl; elucję prowadzono z szybkością 60 ml/godz.; zbierano frakcje 1 ml  
The separation of fraction TH-2 on DECALSO-F; 15 mg of the preparation dissolved in a 0.1 M citrate buffer was applied to the top of the column 1.5×21 cm; elution: I — citrate buffer 0.1 M, pH=5.0, II — continuous gradient: citrate buffer from 0.1 M to 0.5 M, pH from 5.0 to 8.0, III — 0.1 M HCl; the elution was 60 ml/hour; 1 ml fractions were collected

Stwierdzono, że frakcja D<sub>4</sub> w dawce 0,015 µg/1 g masy chomika wywołała efekt biologiczny, powodując wzrost wolnych protoporfiryn wątrobowych o 43% i koproporfiryn o 48%. Odpowiada to 130-krotnemu oczyszczeniu w stosunku do frakcji TH-2.

## 2. DEAE-CELULOZA — ANIONIT

10 mg preparatu TH-2 rozpuszczono w 3 ml 0,05 M buforu: kwas octowy — amoniak o  $pH=5,0$  i nanoszono na kolumnę o wymiarach  $1,1 \times 15$  cm z DEAE-celulozą (ryc. 4).



Ryc. 4. Rozdział frakcji TH-2 na DEAE-celulozie; na kolumnę o wymiarach  $1,1 \times 15$  cm nanoszono 10 mg preparatu rozpuszczonego w 0,05 M buforze kwas octowy—amoniak; elucja: I — 0,05 M bufor kwas octowy—amoniak,  $pH=5,0-50$  ml, II — 0,1 M bufor kwas octowy—amoniak,  $pH=5,0-100$  ml, IV — 0,3 M bufor kwas octowy—amoniak,  $pH=5,0-1000$  ml; elucję prowadzono z szybkością 60 ml/godz.; zbierano frakcje 1 ml

The separation of fraction TH-2 on DEAE-cellulose; 10 mg of the preparation dissolved in 0.05 M acetic acid—ammonium buffer was applied to the top of the column  $1.1 \times 15$  cm in size; elution: I — 0.05 M, acetic acid—ammonium buffer,  $pH=5.0-50$  ml, II — 0.1 M acetic acid—ammonium buffer,  $pH=5.0-50$  ml, III — 0.2 M acetic acid—ammonium buffer,  $pH=5.0-1000$  ml; the elution was conducted at a speed of 60 ml/hour; 1 ml fractions were collected

W wyniku rozdziału otrzymano 7 frakcji  $C_1-C_7$ . Największy stopień oczyszczenia (133-krotny w porównaniu z preparatem toksohormonu TH-2) stwierdzono we frakcji  $C_4$ , która w dawce  $0,015 \mu g/1$  g masy chomika powodowała wzrost poziomu protoporfiryn wątrobowych o 53% i koproporfiryn o 49% w porównaniu z kontrolą (dootrzewnowo 1 ml 0,9% NaCl).

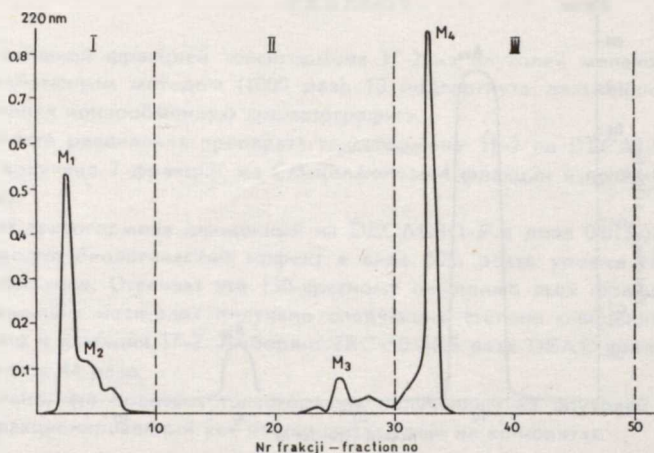
## 3. CM-CELULOZA — KATIONIT

Na kolumnie o wymiarach  $0,9 \times 25$  cm rozdzielano 10 mg preparatu TH-2 rozpuszczonego w 2 ml buforu 0,01 M HCl+0,03 M  $\beta$ -alanina o  $pH=4,5$ .

W wyniku rozdziału otrzymano 4 frakcje  $M_1-M_4$  (ryc. 5). Preparat frakcji  $M_1$  w dawce  $0,045 \mu g/1$  g masy chomika powodował wzrost poziomu protoporfiryn wątrobowych o 51% i koproporfiryn o 48% (zwierzęta kontrolne szczepiono odpowiednią dawką  $\beta$ -alaniny). Preparat ten w porównaniu z preparatem TH-2 został oczyszczony 44 razy.

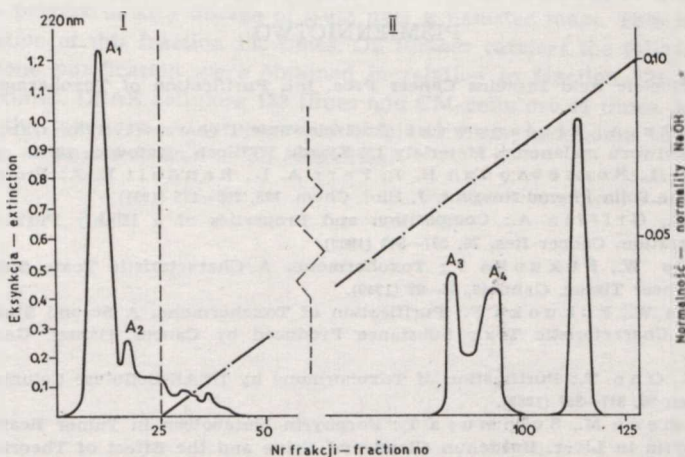
## 4. AMBERLIT IRC-50 — KATIONIT

Na kolumnę o wymiarach  $1,5 \times 19$  cm nanoszono 10 mg preparatu TH-2 rozpuszczonego w 1 ml buforu glicyna—NaCl. W wyniku rozdziału otrzymano 5 frakcji (ryc. 6). Każdą z frakcji poddano sączeniu przez Sephadex G-25 w



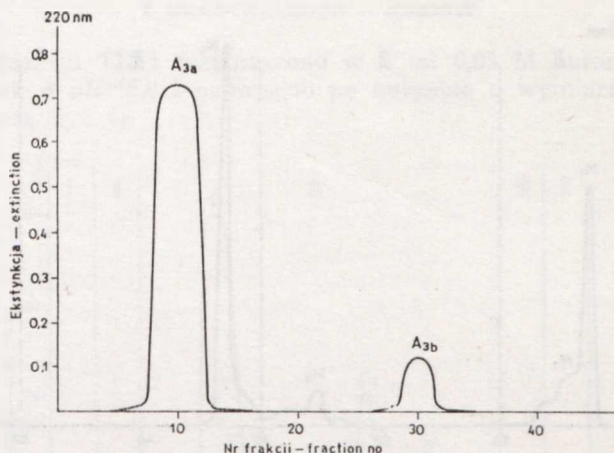
Ryc. 5. Rozdział frakcji TH-2 na CM-celulozie; na kolumnę o wymiarach  $0,9 \times 25$  cm nanoszono 10 mg preparatu rozpuszczonego w buforze startowym; elucja: I — 0,01 M HCl+0,03 M — alanina, pH=4,5—50 ml, II — 0,02 M HCl+0,03 M  $\beta$ -alanina, pH=3,7 — 100 ml, III — M HCl; zbierano frakcje 5 ml

The separation of fraction TH-2 on CM-cellulose; 10 mg of the preparation dissolved in a starting buffer was applied to the top of the column  $0.9 \times 25$  cm in size; elution: I — 0.01 M HCl+0.03 M  $\beta$ -alanine, pH=4.5—50 ml, II — 0.02 M HCl+0.03 M  $\beta$ -alanine, pH=3.7 — 100 ml, III — 0.03 M HCl; 5 ml fractions were collected



Ryc. 6. Rozdział frakcji TH-2 na Amberlicie IRC-50; na kolumnę o wymiarach  $1,5 \times 19$  cm nanoszono 10 mg preparatu rozpuszczonego w 1 ml buforu glicyna—NaCl; elucja: I — bufor glicyna 0,1 M—NaCl, pH=9,4, II — bufor glicyna—NaCl gradient ciągły NaOH; elucję prowadzono z szybkością 60 ml/godz.; zbierano frakcje 1 ml

The separation of fraction TH-2 on Amberlite IRC-50; 10 mg of the preparation was dissolved in 1 ml of a glycine NaCl buffer and applied to the top of the column  $1.5 \times 19$  cm in size; elution: I — glycine buffer 0.1 M — NaCl, pH = 9.4, II — glycine — NaCl buffer continuous gradient NaOH; the elution 60 ml/hour; 1 ml fractions were collected



Ryc. 7. Rozdział frakcji  $A_2$  na sefadesle G-25; elucja — wodą dejonizowaną  
The separation of fraction  $A_2$  on Sephadex G-25; elution — delonized water

celu uwolnienia preparatu toksohormonu od glicyny (ryc. 7). Aktywność preparatu sprawdzano testem biologicznym, oznaczając wzrost wolnych porfiryn wątrobowych. Najwyższy stopień oczyszczenia (66,5-krotny w porównaniu z frakcją TH-2) stwierdzono we frakcji  $A_{2a}$ , która w dawce 0,06  $\mu\text{g}/1\text{ g}$  masy chomika powodowała wzrost poziomu porfiryn wątrobowych o ok. 50%.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Fuji S.: Nucleic Acid Proteins Cancer Proc. Int. Purification of Toxohormone Symp. 4, 93—102 (1968).
2. Grabowska A., Trojanowski J.: Izolowanie i charakterystyka frakcji toksohormonu z nowotworu melanoma. Materiały IX Zjazdu PTBioch., Katowice 1971.
3. Lowry O. H., Rousebrough H. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265—275 (1951).
4. Yonoki K., Griffin A.: Composition and Properties of a Highly Purified Toxohormone Preparation. *Cancer Res.* 20, 537—543 (1960).
5. Nakahara W., Fukuoka F.: Toxohormone: A Characteristic Toxic Substance Produced by Cancer Tissue. *Gann* 40, 45—69 (1949).
6. Nakahara W., Fukuoka F.: Purification of Toxohormone. A Second Study on Toxohormone, a Characteristic Toxic Substance Produced by Cancer Tissues. *Gann* 41, 47—55 (1950).
7. Ohasi M., Ono T.: Purification of Toxohormone by DEAE-Cellulose Column Chromatography. *Gann* 50, 347—357 (1959).
8. Ono T., Umeda M., Sugimura T.: Porphyrin Metabolism in Tumor Bearing Animals Free Porphyrin in Liver, Hordenun Gland and Urine and the Effect of Theorion on Toxohormone. *Gann* 47, 71—180 (1956).
9. Schwartz S., Zieve L., Watson C. J.: An Improved Method for the Determination of Urinary Coproporphyrin and an Evaluation of Factors Influencing the Analysis. *J. Laboratory Clinical Medicine* 37, 845—859 (1951).
10. Trojanowski J.: Toksohormon. *Postępy Biochemii* 16, 191—203 (1970).
11. Trojanowski J., Grabowska A.: Studies on Toxohormone from Melanotic Tumors. *Buletyn Lub. Tow. Nauk.* 15, 35—43 (1973).

## РЕЗЮМЕ

Самой активной фракцией токсогормона ТГ-2 из опухолей меланомы, очищенной ранее обработанным методом (1000 раз), 10 подвергнуто дальнейшему препарированию, применяя ионнообменную хроматографию.

В результате разделения препарата токсогормона ТГ-2 на DECALSO-F и DEAE-целлюлозе получено 7 фракций, на CM-целлюлозе-4 фракции и на Амберлите IRC-50 — 5 фракций.

Препарат токсогормона очищенный на DECALSO-F в дозе 0,015  $\mu\text{g}$ / 1г массы хомья производил биологический эффект в виде 50% роста уровня свободных печеночных порфиринов. Отвечает это 130-кратному очищению этой фракции.

На дальнейших носителях получено следующие степени очищения токсогормона по отношению к фракции ТГ-2. Амберлит IRC-50 66,5 раза DEAE-целлюлозе 133 раза и CM-целлюлозе 44 раза.

Определено, что препарат токсогормона полученный из опухолей меланомы может быть фракционированный как на анионитах так и на катионитах.

## SUMMARY

The most active fractions of the TH-2 toxohormone from melanoma tumors were purified 1000 times (11) and then submitted to further preparation with the application of ion exchange chromatography. In result of the separation of the TH-2 toxohormone on DECALSO-F and DEAE cellulose 7 fractions were obtained, on CM cellulose 4 fractions and on Amberlite IRC-50 5 fractions. The toxohormone purified on DECALSO-F provoked a biological effect in the form of a 50% increase in free liver porphyrin at a dosage of 0.015  $\mu\text{g}$ /1 g hamster mass. This is equivalent to a purification of this fraction 130 times. On further carriers the following degrees of toxohormone purification were obtained in relation to fraction TH-2. Amberlite IRC-50 66.5 times. DEAE-cellulose 133 times and CM-cellulose 44 times. It was ascertained that the toxohormone preparation obtained from melanoma tumors can be fractioned on anionites as well as on cationites.

