



PONTIFICIA
ACADEMIA
SCIENTIARUM

GRUPPI SULFIDRILICI NELLA FUNZIONE DEGLI IDROCARBURI CANCEROGENI(*)

PIETRO RONDONI

Accademico Pontificio

SUMMARIVM. — Hydrocarbura cancerogena quamdam vim inhihentem habent in papainam. Benzopyrenes, iniectus in murium venas, deminuit numerum complexuum -SH in iecinoris proteinis. Inhibens vis in papainam permanet etiam si benzopyrenes per caffeinam solvatur, vel si papaina per cisteinam (BAL) vivescat.

Probabile Auctori videtur mutuan actionem fieri inter complexus -SH et cancerogenum hydrocarburum.

Ricerche eseguite nel nostro laboratorio hanno dimostrato che il ben noto idrocarburo cancerogeno 3,4-benzopirene ha una azione parzialmente inibitrice sulle catepsine (POZZI, RONDONI e BELTRAMI); e che esso e l'altro idrocarburo potentemente cancerogeno, il metilcolantrene, inibiscono pure parzialmente la digestione della gelatina ad opera della papaina, mentre altri idrocarburi *non* cancerogeni non presentano questa propriet  (GAETANI). Siccome si tratta nelle catepsine di organi animali come nella papaina di proteasi attivate da gruppi sulfidrilici (-SH), cos  si   supposto che la inibizione da idrocarburi cancerogeni fosse riconducibile ad una qualche interferenza con questi gruppi degli enzimi. Che la funzione cancerogena possa in qualche modo estrinsecarsi mediante un qualche influenzamento delle proteine cellulari attraverso ad una interferenza coi loro gruppi -SH o comunque una modificazione del metabolismo del S   ammesso anche da CRABTREE in base ai due seguenti fatti: il bromobenzolo, che nell'organismo si combina con gruppi sulfidrilici ed   eliminato

(*) Nota presentata nella Tornata Ordinaria dell'8 febbraio 1948.

appunto come mercapturato inibisce, applicato sulla pelle, l'azione cancerogena del benzopirene (1944); anche l'aldeide maleica e citriconica hanno azione inibente o ritardante sulla funzione cancerogena di idrocarburi, probabilmente in quanto si combinano (acidi bibasici insaturi) con costituenti cellulari contenenti gruppi —SH e così bloccano l'accesso all'idrocarburo che agirebbe appunto su enzimi cellulari attraverso a gruppi sulfidrilati.

Si è voluto vedere come si comportassero i gruppi —SH di proteine di organi in animali previamente iniettati endovena col benzopirene. A tale scopo dei ratti sono stati da noi (RONDONI e BORETTI) iniettati endovena con sospensioni acquose dell'idrocarburo ed uccisi poi a varia distanza di tempo (fino a 21 giorni dopo). Furono determinati i gruppi in parola in estratti acquosi di fegato, rene, polmoni, muscoli, con un metodo corrispondente a quello di MIRSKY e ANSON, modificato (le proteine precipitate con acido tricloroacetico; al precipitato aggiunta cistina per ossidare i gruppi —SH, con riduzione a cisteina, la quale è determinata mediante riduzione di ferricianuro, il cui eccesso è titolato iodometricamente. Una determinazione parallela senza addizione di cistina permette di calcolare per differenza la sola cisteina derivata dalla riduzione della cistina ad opera di —SH).

Si riportano in una tabella i risultati per ratti trattati con benzopirene e ratti controllo.

TABELLA I.

Gruppi -SH espressi in mgr cisteina per mgr N precipitabile con ac. tricloroacetico.

	Fegato	Rene	Muscoli	Polmone
Valori medi per 5 ratti non trattati	0,045 (0,052-0,035)	0,038 (0,045-0,029)	0,043 (0,052-0,035)	0,025 (0,029-0,021)
Valori medi per 6 ratti iniettati endovena con bzp. 1-21 giorni prima	0,035 (0,042-0,032)	0,030 (0,039-0,023)	0,041 (0,049-0,036)	0,021 (0,029-0,019)

(Le cifre fra parentesi esprimono l'ampiezza delle variazioni).

Si vede come le cifre nella serie trattata col bzp. siano generalmente più basse in confronto alla serie controllo, pur con molte sovrapposizioni. Non sapremmo dare importanza alle piccole differenze inerenti al muscolo ed al polmone: anche per il rene le differenze sono piccole e di incerto significato. Per il fegato l'abbassamento dei valori riportati merita considerazione, trattandosi di una diminuzione media di 22-23% circa dei gruppi tiolici chimicamente dimostrabili nelle proteine idrosolubili dell'organo. La diminuzione in parola corrisponde alle osservazioni di BOYLAND e WEIGERT secondo cui il bzp. iniettato endovena va a localizzarsi più largamente nel fegato, poi nel rene e meno ancora negli altri organi.

È stato determinato anche il contenuto in gruppi —SH di proteine (estratti c. s.) in tumori: tumori da bzp. di ratti, cancro Ehrlich di topo, carcinoma Walker di ratto: si sono trovati sempre valori molto bassi, inferiori a quelli del fegato e del rene normali, più bassi ancora nei tumori largamente necrosati. Così nei sarconi da bzp. del ratto si hanno valori come 0,031-0,020 (in mgr cisteina per mgr N precip. c. s.), mentre zone necrotiche dello stesso tumore danno 0,015; il canoro di Ehrlich presenta valori circa 0,030, lo stesso largamente necrotico 0,019. Probabilmente la necrosi implica demolizione di proteine ed asportazione di prodotti sulfidrilati di disintegrazione.

Infine abbiamo ripreso a studiare il fenomeno della inibizione della papaina da bzp. Lo abbiamo potuto confermare anche usando invece che sospensioni acquose dell'idrocarburo come nelle più vecchie ricerche anche soluzioni ottenute mediante caffeina. È noto infatti che il bzp. può essere tenuto in soluzione acquosa mediante caffeina: secondo BROCK, DRUCKREY e HAMPERL 10 ml di una soluzione 3% di caffeina tengono in soluzione 2 mgr di bzp. Un largo e più preciso studio sull'azione stabilizzante di purine rispetto ad idrocarburi policiclici si deve a WEIL-MALHERBE. Ora un certo grado di inibizione rispetto alla digestione papainica (gelatina come substrato) è dimostrato anche dall'idrocarburo in soluzione caffeinica, come mostra ad esempio l'esperimento seguente, tolto da uno dei nostri protocolli (RONDONI e BASSI).

TABELLA II.

Si apprestano 4 miscele con 5 ml soluzione papaina (pap. Merck sospens. 2%) e 2 ml puffer acetici pH 4,7, più le seguenti aggiunte:

miscela a) ml 7 acqua dist.

» b) ml 7 soluz. 3% caffeina

» c) ml 2 soluz. 3% caffeina + ml 5 soluz. bzp. 0,02% in soluz. caffeina 3%

» d) ml 7 soluz. bzp 0,02% in soluz. caffeina 3%

Dopo 1 h a 37° addizione di 10 ml gelatina 8% ovunque.

Titolazione al formolo con sol. NaOH $\frac{n}{20}$ dopo 2 e 4 ore

Risultati (incrementi acidità-formolo in ml):

	a	b	c	d
2 h	0,80	0,70	0,65	0,55
4 h	0,95	0,90	0,80	0,65

Qui ed in tutti gli esperimenti si è notata una leggera inibizione da caffeina sola. Ma l'inibizione ad opera della soluzione con la dose più alta di benzopirene è di gran lunga superiore: resta pur sempre un 25-28% di inibizione dovuta all'idrocarburo. Pare che essa sia più netta, se, come nell'esperimento surriportato, si lascia agire per un po' la soluzione bzp. sul sistema enzimatico prima di aggiungere il substrato. La dose di bzp. che opera il suddetto grado di inibizione è di mgr 1,4; ma anche la dose minore di bzp. (1 mgr) ha dato una inibizione di quasi 10%. Si può concludere che l'idrocarburo agisce non solo in sospensione e con meccanismo che potrebbe ritenersi piuttosto un meccanismo fisico (adsorbimento), ma anche in soluzione, allo stato di dispersione molecolare, in quella specie di combinazione molecolare (WEIL MALHERBE) che si ha colla caffeina.

Abbiamo voluto anche vedere se la inibizione è più o meno abolita dalla potente attivazione ottenibile mediante corpi sulfidrilati; ed anzitutto abbiamo usato cisteina (cloridato); e quindi, in esperimenti ancora in corso il BAL (British antilewisite), ossia dimercaptopropilolo (preparato dall'Istituto Sieroterapico Milanese, che deve essere ringraziato).

Sia riportato un esperimento con cisteina:

TABELLA III.

Miscela enzimatiche:

- a) sol. papaina ml 5; puffer acet. pH. 4,7 ml 2; acqua ml 7,2; sol. 8% gelatina ml 10
- b) papaina c. s.; puffer c. s.; soluz. bzp. 0,02% in sol. caffeina 3% ml 7; acqua ml 0,2; gelatina c. s.
- c) papaina c. s.; puffer c. s.; acqua ml 7; sol. cloridr. cisteina $\frac{m}{10}$ ml 0,2; gelatina c. s.
- d) papaina c. s.; puffer c. s.; sol. caffeina 3% ml 7; cloridr. cisteina $\frac{m}{10}$ ml 0,2; gelatina c. s.
- e) papaina c. s.; puffer c. s.; sol. bzp. 0,02% in sol. caffeina 3% ml 7; cloridr. cisteina $\frac{m}{10}$ ml 0,2; gelatina c. s.

(Incrementi acidità-formolo in ml NaOH $\frac{n}{20}$ dopo 3 e 6 h)

	a	b	c	d	e
3h	0,45	0,30	1,60	1,35	1,80
6h	0,85	0,65	1,85	1,55	1,40

Si ricava da questi e simili esperimenti che la potente attivazione della proteolisi ad opera della cisteina sovrappone la inibizione da benzopirene, ma non del tutto. Il bzp. (in soluzione caffeinica) attua una sia pure modesta inibizione del sistema enzimatico attivato, la quale va oltre quella dovuta alla sola caffeina (inibizione da caffeina + bzp. 24,4%; da caffeina sola 16,3%; onde circa 9% di inibizione è riferita al solo benzopirene).

Si riporta anche un esperimento col BAL.

TABELLA IV.

Miscela enzimatiche:

- a) Sol. papaina 2% ml 5; puffer acetici pH 4,7 ml. 2; acqua ml. 7; BAL ml 0,1; sol. gelatina 8% ml 10
 b) papaina c. s.; puffer c. s.; sol. caffeina 3% ml 7; BAL c. s.; gelatina c. s.
 c) papaina c. s.; puffer c. s.; sol. bzp. 0,02% in sol. caffeina 3% ml 7; BAL c. s.; gelatina c. s.
 d) papaina c. s.; puffer c. s.; acqua ml. 7,1; gelatina c. s.

Incremento acidità-formolo in ml. NaOH $\frac{n}{10}$:

	a	b	c	d
3 h	1,60	1,20	1,10	0,50
6 h	2,75	2,20	2,05	0,90

N. B. La concentrazione del BAL nella miscela totale (volume 24,1 ml) è circa $\frac{m}{30}$.

Si osserva una forte attivazione, la quale tuttavia, tenendo conto delle molarità, è piuttosto inferiore a quella da cisteina (nell'esperimento della tab. III la cisteina, messa in quantità di 0,2 di sol. $\frac{m}{10}$ nel volume totale viene ad essere in concentrazione $\frac{m}{1000}$ circa). È questo un punto su cui occorrerebbe tornare per meglio appurare i rapporti fra gruppi —SH ed attivazione enzimatica. L'azione attivante del BAL sulla papaina è pure registrata da WEBB e HEYNINGEN. Qui vogliamo fare soltanto rilevare che una azione inibente si verifica pure ad opera della caffeina sola, ma è più spiccata colla presenza anche dell'idrocarburo in soluzione.

Si può concludere che il benzopirene in parte inibisce il sistema enzimatico proteolitico attivato da certi corpi sulfidrilati come la cisteina ed il BAL, se anche la inibizione è di grado modesto. Per confronto si può ricordare che secondo CALCUTT e NEWHOUSE l'azione fotodina-

mica del bzp. (su parameci) è parzialmente inibita dalla cisteina; che quindi intanto due azioni dell'idrocarburo, quella modificante un enzima proteolitico e quella tossica in presenza di radiazioni luminose su protozoi, sono dalla cisteina più o meno, ma non del tutto ostacolate. Per stare all'azione del benzopirene sulla funzione proteolitica della papaina, si può supporre, come già fu detto altrove, che l'idrocarburo interferisca con gruppi sulfidrilici della proteina-enzima; che l'aggiunta di gruppi sulfidrilici in eccesso sopraffaccia largamente tale parziale interferenza, onde non manca una buona attivazione da SH-gruppi; ma che tuttavia la interferenza si mantenga parzialmente, riportandosi anche sul complesso enzimatico attivato più o meno fortemente.

Queste osservazioni *in vitro* possono raccordarsi colle riportate ricerche *in vivo*, concordando nel farci ammettere come probabile un ingranaggio del benzopirene nel metabolismo dell'S e in particolare un'azione su costituenti cellulari sulfidrilati. Non è tuttavia detto che tutto il meccanismo d'azione del cancerogeno si riduca ad una reazione con gruppi sulfidrilici; ma questa può essere un primo e parziale attacco, che si integra con ben più estese modificazioni di costituenti cellulari, modificazioni forse più di natura chimico-fisica e interessanti la ultrastruttura del protoplasma.

BIBLIOGRAFIA

- BOYLAND E. a. WEIGERT F., (1947), « Brit. med. Bull. », 4, n. 5-6.
- BROCK N., H. DRUCKREY u. H. HAMPERL (1938), « Arch. f. exper. Path. u. Pharm », 189, 709.
- CALCUTT G. a. NEWHOUSE I. P., (1948), « Nature », 161, 53.
- CRABTREE H. G., (1944), « Cancer research », 4, 688;
— (1945) ibid. 5, 346.
- GARTANI E., (1946), « Tumori », 32, 165.
- MIRSKY A. E. a. ANSON M. L., (1935), « Journ. gen. Physiol. » 18, 307.
- POZZI L., (1935), « Memorie R. Accad. d'Italia », Cl. Sci. fis. 6, 193.
- RONDONI P. e BELTRAMI W., (1937), « Enzymologia », 3, 251.
- WEBB E. C. a. v. HEYNINGEN R., (1947), « Biochem. Journ. », 41, 74.
- WEIL-MALHERBE H., (1946), « Biochem. Journ. », 40, 351.