

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A SEJTDIFFERENCIÁLÓDÁS ÉS ÖREGEDÉS ÖSSZEFÜGGÉSEINEK
KÍSÉRLETES VIZSGÁLATA
IN VITRO SEJTVONALAKON**

DR. JENEY FLORENCE

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSI KAR, GERONTOLÓGIAI TANSZÉK
DEBRECEN, 2002**

1. Bevezetés

A. Az öregedési elméletek rövid áttekintése

Az öregedési folyamatot fenomenológiai szinten Strehler (1959) úgy definiálta, hogy az egy progresszív, destruktív, intrinsic és univerzális biológiai jelenség. Az öregedés okai, illetve a folyamat lassításának lehetősége régóta foglalkoztatja a kutatókat. Az idők folyamán számtalan teória született, melyek közül csak néhánynak a megalapozottságát sikerült később kísérletes úton igazolni. Az öregedés alapvető okaival és mechanizmusaival foglalkozó elméletek annyira szerteágazóak, hogy már alapvető rendszerezésük is nagy nehézségekbe ütközik, s mindent átfogóan, ellentmondásmentesen nem is valósítható meg. Mégis, mivel egy ilyen értekezés megalapozásához szükség van valamiféle áttekintésre, az alábbiakban bemutatunk kétféle rendszerezési próbálkozást. Az egyik szerint: léteznek

- (1) elméletek, amelyek az öregedést az úgynevezett véletlenszerű, passzív hibafelhalmozódással magyarázzák, és
- (2) elméletek, amelyek öregedési genetikai program létét tételezik fel, vagyis a folyamatot aktív módon irányítottnak vélik.

A. 1. Passzív folyamatokat feltételező öregedési elméletek:

Az alábbiakban felsoroljuk az ide tartozó elképzelések főbb típusait annak kihangsúlyozása mellett, hogy ezek egymással összefüggésben fejlődtek az elmúlt 50-60 év alatt, s gyakran ugyanazon jelenségeket közelítették meg más-más hangsúlyok mellett.

1.1. Keresztkötődések elmélete

Lényege, hogy két vagy több makromolekula (nukleinsavak, fehérjék) között fokozatosan olyan keresztkötések (cross-links) keletkeznek, amelyeknek funkciórontó hatásuk van az érintett molekulákra. Ezt a hatvan éves koncepciót ma már a kísérletes adatok tömege igazolja. Keresztkötő ágensként szerepelhetnek: acetaldehid, alfa-ketoglutarásv, citromsav, malonsav, fumársav, borostyánkősav, szervesetlen kationok (Pb, Al, Cu, Fe, Mn és Zn különböző formái),

telítetlen lipidek, illetve mindazok a metabolitok amelyekben telítetlen kötések vannak (Björkstén, 1968), valamint az oxigén-eredetű szabadgyökök (Zs.-Nagy és Floyd, 1984)

1.2. Szabadgyök elmélet

A gerontológia ma is élő „nagy öregje” Denham Harman (1956) úgy képzelte el, hogy a molekuláris oxigénből káros melléktermékként keletkező aktív gyökök sejtkárosító szerepet játszanak, s lényegében ezek eliminációja elvezethet az életkor meghosszabbításához. Ez a koncepció, még ha módosításokra szorult is, mindmáig a legelterjedtebb és leghasznosabb öregedési elméletnek bizonyult.

1.3. Diffúzió elmélet

Az elmélet kidolgozója, Carpenter (1965) feltételezte, hogy a kereszt-kötésekkel egybefűzött makromolekulák "szétterjedő" részecskékként szerepelnek az öregedés kiváltásában. Ez az elképzelés lényegében a keresztkötődési elmélet egy változatának tekinthető.

1.4. "Kollagén elmélet"

Az ötvenes években Verzár (1955, 1956) alapvető kísérleteket végzett a kollagén hődenaturációjára vonatkozóan. Eredményeiből arra következtetett, hogy a fiatal kollagén molekulát stabilizáló H-hidak egy része, molekulánként kb 10 darab, az élet előrehaladtával kovalens keresztkötéssé alakul át, s ez okozza az öreg kollagén nagyobb mechanikai szilárdságát, nagyobb hőstabilitását, és a nagyobb erejű hőkontrakcióját is. Megállapította, hogy a kromatin fehérjéinek is nő az életkor-függő hőstabilitása, míg magának a tiszta DNS-nek ez a tulajdonsága lényegében nem változik a korrallal.

1.5. Hiba-katasztrófa elmélet

Orgel (1963) szerint, az öregedés alapja a fehérjeszintézis pontosságának, megbízhatóságának a csökkenése, vagyis szerinte a fehérjeszintézis folyamatai pontatlanul mennek végbe, tökéletlen molekulák szaporodnak fel, a transzkripciót, translációt végző fehérjék módosulása révén az újonnan szintetizálódott fehérjemolekulák hibagyakorisága emelkedik (katasztrófa). Bár maga Orgel (1970, 1973) visszavonta saját elméletét, mind a mai napig vannak követői.

1.6. Redundancia elmélet

Medvedev (1972) szerint azok az ismétlődő identikus DNS-molekula részek, melyek tartósan represszált állapotban vannak, tartalék információ hordozóként vannak jelen a DNS-molekulában, s az egyes fajok élettartama, az ismétlődő információk képletek számától függ. Ez a logika lényegében a hibakatasztrófa elméletbe torkollik, s ahhoz hasonlóan nem is vezetett lényeges eredményekre.

1.7. Mutációs elmélet

Ezen elmélet szerint, az öregedés oka, a sejtekben felgyülemelő genetikai hibák gyakorisága lehet, ami lényegében egy alternatív megfogalmazása a hibakatasztrófa elméletnek.

1.8. Immunológiai elmélet

Walford (1969) szerint, az öregedés olyan folyamat lenne, amelyben a retikuloendothelialis rendszer (RES) a szervezet saját fehérjével szemben egyre fokozódó intoleranciát mutat. Az utóbbi években a kérdés úgy vetődött fel, hogy az immunológiai státusz mennyiben lehet indikátora a biológiai életkornak, illetve immunológiai paraméterek alapján megjósolható-e a várható túlélés időkben? A válasz: egyetlen mutató alapján semmiképpen sem, de több eltérés egyidejű fennállása jelezheti a prognózist.

1.9. Anyagcsere-sebesség elmélet

Pearl (1928), Mc Cay et al. (1935) és Berg (1976) arra megállapításra jutottak, hogy minél nagyobb a szervezet energiaforgalma annál gyorsabb az öregedése. Levezethető elméletileg, hogy mivel az energiaforgalom szoros kapcsolatban áll az oxigénfogyasztással, ez az elképzelés lényegében össze-függ az öregedés szabadgyök elméletével.

1.10. Stressz-elmélet

Selye János munkássága révén vált ismertté (Selye, 1956). Lényege, hogy az élet során elszenvedett stresszek a szervezetben maradandó nyomot hagynak, és ezek növekvő halmaza okozza az öregedést. Ennek, valamint az anyagcsere-

sebesség elméletnek közös mondanivalója, hogy minél idősebb egy szervezet, annál kevésbé tudja a környezet károsító hatásait kivédeni.

A. 2. Aktív szabályozást feltételező öregedési elméletek

Ezeknek a teóriáknak a közös feltételezése, hogy az öregedés szabályozása a DNS-makromolekulán keresztül történik, vagyis a génaktivitás idő szerint van programozva.

2.1. Genetikai program elmélet

Hayflick (1965, 1970, 1973, 1975) öregedési program elméletét arra a "megfigyelésére" alapozta, hogy az embrióból vett fibroblasztok sejtenyészetekben 50 osztódásra képesek, majd megöregszenek és bizonyos idő után elpusztulnak, ugyanakkor, ha a fibroblasztokat felnőttből, vagy öregebb egyedekből vesszük, a "doubling number" lecsökken 20 körüli értékre. A részletek tisztázása arra az eredményre vezetett, hogy a Hayflick limit léte nem fogadható el hiteles öregedési elmélet alapjaként.

Mindezek ellenére létezik az öregedés replikatív szeneszenciának nevezett elmélete (Smith és Periera-Smith, 1996) amely szerint a normális sejtek korlátozott proliferatív kapacitással rendelkeznek, meghatározott számú sejtosztódás után kilépnek a sejtciklusból, terminálisan nem osztódó állapotba kerülnek. Ez a replikatív szeneszencia irreverzibilis, bár a sejtek nem feltétlenül veszítik el életképességüket, nem lehet őket újra osztódásra bírni. Mindezeket úgy összegzik, hogy a sejtöregedés normális, tumor-suppresszor hatású jelenség, amelynek elvesztése daganatképződéshez vezet.

2.2. Neuroendokrin rendszerrel kapcsolatos elméletek

Reiter (1994) szerint az öregedés korában mutatkozó csökkent adaptációs készség, a bioritmusok szabályozásának zavara feltehetően összefügg a melatonin-szint napi ritmusában mutatkozó zavarokkal. A melatonin jelenléte központi idegrendszeri hatáshelyeken, receptorokon képes késleltetni az öregedéssel járó bioritmus szabályozási zavarok kialakulását. Meg kell említeni, hogy más szerzők szerint itt inkább az öregedés következményeiről, mint okairól van szó.

2.3. Telomer-óra elmélet

A DNS molekulák két vége speciális szerkezetű, kiterjedt régió: nagyszámú, fajra jellemző bázisszekvenciájú, tandem módon ismétlődő rövid szakaszokból épül fel, melynek szerepe a kromoszómavégek védelme. Egyesek szerint minden sejtciklusban néhány bázispárral rövidül, míg mások ezt cáfolják (Rubin, 2002). A telomer-óra elmélet feltételezi, hogy a sejt telomerjének rövidülésével méri életkorát, pontosabban azt, hogy élete során hány osztódáson esett keresztül. Számos kutató lényegében a Hayflick model szerint gondolkodik, s feltételezi a limitált osztódási képességet. E terület jelenleg intenzív kutatások tárgyát képezi, s az elképzeléseket jelentős viták kísérik.

A. 3. A teoretikus gerontológia megalapozása

Esposito (1983) tollából jelent meg ilyen típusú elméleti gerontológiai alapvetés. Ez mindenképp előtte rendszerezni próbálta az öregedési elméleteket, azokat három csoportba osztotta: (1) kauzális elméletek, (2) szisztematikus elméletek és (3) evolúciós elméletek. Nemcsak rendszerezi a jelenségeket és elméleteket, hanem megfogalmazta a teoretikus gerontológia alapvető kérdéseit is, amelyeket a kísérleti gerontológiának meg kell válaszolnia. Ennek a modellnek az alkalmazását fejlesztette tovább, s a teoretikus gerontológia kérdéseire is megadta a lehetséges válaszokat az öregedés membrán-hipo-tézise (angolul: membrane hypothesis of aging = MHA) (Zs.-Nagy, 1978, 1994, 1997).

A. 4. Az MHA rövid összefoglalása

Az MHA abból indul ki, hogy az élő szervezetek valamennyi alkotórészének folyamatos újratermelődését azok folyamatos károsodása teszi szükségessé. Léteznie kell tehát olyan tényezőknek, amelyek (1) a molekuláris komponensek integritását folyamatosan károsítják; (2) a károsodott komponenseket folyamatosan eltávolítják; (3) a sérült és eltávolított komponenseket de novo szintézis révén létrejött újakkal helyettesítik.

Az MHA elfogadja, hogy a legfontosabb károsító tényezők az oxigénradikális szabadgyökök között keresendők, s ebben a vonatkozásban felhasználja az öregedés szabadgyök teóriáját (Harman, 1956, 1981, 2001). Mivel ezen szabadgyökök polimerizáló, keresztkötő hatásait döntően befolyásolja a struktúra denzitása, az MHA szerint a szabadgyökök okozta ártalom nagyobb való-

színűséggel lép fel a tömötteb szerkezetű sejtalkatrészekben, például a membránokon, mint a szabad citoszólban. Ehhez járul még a plazmamembrán esetében a nyugalmi potenciál állandóan ismétlődő kisülésekor keletkező ún. „reziduális hőokozta károsodás”.

A plazmamembrán gyors károsodásának legfontosabb következménye a membrán passzív K^+ -permeabilitásának állandóan csökkenő tendenciája. Ennek egyenes következménye az intracelluláris K^+ -tartalom emelkedése, ami egyrészt előnyt jelent, mivel segít fenntartani a membrán ingerelhetőségét. Másrészt azonban a megnövekedett intracelluláris ionerősség növeli a sejt-kolloidok kondenzációját (aggregációját), s ezzel az intermolekuláris keresztkötések képződésének valószínűségét is. Ennek következtében a sejt-kolloidok egyre nagyobb, aggregált partikulákat képeznek, aminek egyenes következménye az intracelluláris kolloid ozmótikus nyomás csökkenése, ami a legfontosabb víz-megtartó erő a sejtekben, tehát a sejten belüli állomány vizet veszít. A dehidráció következménye az, hogy a relatív szárazanyag tartalom növekszik a sejtekben az élet folyamán.

Ez a folyamat nem egy különleges öregedési történés, hanem már az embrionális korban elkezdődik, s az ontogenezis első felében nélkülözhetetlen a növekedési és maturációs folyamatokban (pl.: az izomzat kialakulásában, a csontképződésben, stb). Mivel ez egy implicit, automatikus folyamata minden élő sejtnek, ez a dehidrációs trend nem áll meg az optimális maturáció elérése után sem, sőt fokozatosan felgyorsul, s végül funkcióvesztéshez vezet, ami már az öregedési folyamat része. A funkcióvesztési jelenségekhez a kulcsot a molekuláris enzimkinetikai modellek adják meg, amelyek szerint a környezet denzitás-növekedésével minden enzimaktivitás fordítottan arányos (Damjanovich és Somogyi, 1973; Somogyi és Damjanovich, 1975; Damjanovich et al. 1989). Ez természetesen vonatkozik nemcsak a működő metabolikus, katabolikus és egyéb enzimekre, hanem a transzkripciót és a translációt végző minden enzimre is.

Az MHA alapkoncepciójából következik, hogy az oxigéneredetű szabadgyökök funkciója nemcsak az öregedő szervezetben fontos tényező, hanem az ontogenezis kezdetétől számítva az kell, hogy legyen az egész élet folyamán. Ezen elméleti megközelítés egy része, nevezetesen az a feltételezés, hogy ezek a gyökök oki tényezőként tekintendők a sejt-differenciálódási folyamatok beindításában, képezi jelen értekezés tárgyát.

B. Az oxigéneredetű szabadgyökök tulajdonságai

A szabadgyök definíciója és reakciói

A szabadgyökök olyan kémiai entitások (molekulák vagy molekula fragmentumok), amelyek páratlan számú (=párosítatlan spinű) elektront tartalmaznak (Pryor, 1976). Míg egy kémiai anyag ion voltát elektronjainak protonjaihoz viszonyított száma határozza meg, szabadgyök a protonok számától függetlenül minden olyan kémiai anyag amelynek külső elektronhéján párosítatlan elektron van. Egy ilyen párosítatlan spinű elektron jelenléte a szabadgyöknek paramágneses tulajdonságokat kölcsönöz, s mivel ez az elektron erősen hajlamos a megfelelő ellentett spinű "partner" felvételére, a szabadgyökök kémiaiailag erősen reaktívak és ennek megfelelően, rövid az élettartamuk (Pryor, 1976).

Biológiai rendszerekben előforduló szabadgyökök között kitüntetett helyet foglalnak el az oxigéneredetű szabadgyökök, amelyeket angolul "reactive oxygen species" névvel is illetnek (rövidítve ROS). A szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) szabadgyökök csak igen rövid ideig képesek létezni, mivel a felesleges elektronjukat spontán módon képesek egymásnak átadni, vagyis kölcsönösen tovább redukálják egymást, aminek végterméke egy két vegyértékű oxigén molekula, ami azonnal protonokat köt meg és H_2O_2 jön létre. A keletkezett H_2O_2 sorsát a Fenton reakció sémáján jól nyomon követhetjük. Ennek lényege, hogy tranziens fémionokkal találkozáskor a fémtől egy elektront kap, aminek következtében a H_2O_2 molekula heterolízist szenved, vagyis szétesik egy hidroxil-ionra (OH^-) és egy hidroxil-szabadgyökre ($OH\cdot$)

Ezt a reakciót Fenton (1894) után nevezték el, aki felfedezte, hogy ferro-vas és H_2O_2 keveréke az akkor ismert legerősebb oxidálószerként viselkedik organikus molekulákkal szemben. Ez a tulajdonság annak köszönhető, hogy $OH\cdot$ szabadgyök bármely szomszédos molekulától két molekuláris ütközésnyi idő alatt képes elektront rabolni.

A nyolcvanas évek elejétől kezdődött annak a felismerése, hogy a Fenton reakció révén keletkező $OH\cdot$ gyökök igen jelentős hatásokat fejtenek ki mind a fehérjékre, mind az aminosavakra, mind a nukleinsavakra, stb. Mindez elvezetett

egy új felfogás kialakításához, amelyben Tanszékünk jelentős szerepet játszott, s ennek része jelen értekezés kísérleti anyaga is.

A szabadgyökök szerepének és funkciójának nem-orthodox felfogása

Denham Harman nevéhez fűződik, hogy az oxigéneredetű szabadgyökök az oxidatív anyagcsere káros melléktermékei, s ezek lehetőleg komplett eliminációja lényegesen meg fogja hosszabbítani a fajok élettartamát. Ezt a koncepciót nevezzük a rövidség kedvéért orthodox felfogásnak.

Ezzel szemben a nem-orthodox felfogás szerint, a ROS-ra szükség van az élő állapot fenntartásához, s ugyanezen gyököknek a káros mellékhatásai idézik elő a makromolekulák károsítását, amelyek ezért időről-időre cserére szorulnak.

A szabadgyökök nem-orthodox felfogása implicite diktálta azt is, hogy a sejtdifferenciálódás és öregedés lényegében azonos jelenségekre vezethető vissza, amelyek nélkül a differenciálódás (vagy maturáció) nem mehet végbe, ugyanakkor egy bizonyos határon túl, a "túldifferenciálódás" olyan károsító tényezővé válik, ami az öregedéshez vezet.

Tanszékünkön először a kémiai úton, Fenton reakcióval generált OH· szabadgyökök hatását csirkeembrió végtagtelepéből származó sejteken, majd HL-60 és K562 sejtvonalakon vizsgálták, munkám az ilyen irányú kísérletek folytatása volt.

2. Célkitűzések

1. Vizsgálataink során további bizonyítékokat kerestünk a OH· szabad-gyökök sejtdifferenciálódást indukáló hatására.
2. K562 erythroleukemia sejteken a hemoglobin szintézis kimutatására jól reprodukálható, nagyérzékenységű, és a karcinogén benzidint helyettesítő módszer kidolgozását terveztük.

3. Szintén a K562 sejteken egzakt flow-cytometriás méréssel bizonyítani kívántuk a sejtek szabadgyök indukált méretbeli és granuláltságbeli (kompaktság) változásait.
4. Humán primér fibroblasztok tenyésztését terveztük retrobulbáris izom és zsírszövetből, valamint bőrből.
5. Meg kívántuk mérni az EOP-os és a kontrol fibroblasztok SOD és kataláz aktivitásának változását Fenton reaktánsok hatására.
6. Ugyanezen fibroblasztokban gyökkezelés hatására bekövetkező GAG-szintetizáló képesség változását szeretnénk volna hisztokémiaileg kimutatni és fotometriásan mérni.
7. EOP-os és kontrol sejteken a proliferációs aktivitás változását terveztük prezentálni immunhisztokémiával.
8. Végül a fibroblaszt-preadipocytá-adipocytá átmenet lehetőségét, és a szabadgyököknek erre a differenciálódási folyamatra kifejtett hatását akartuk tisztázni a primér sejt kultúrákon, 3T3 valamint L929 sejteken, a zsírákkumuláció kimutatásával.

3. MÓDSZEREK

Sejtvonalak

K562 sejtvonal

A K562 egy humán erythroleukémia sejtvonal, melynek sejtjei blasztok, multipotenciális, hematopoetikus, malignus sejtek, differenciálódhatnak az erythrocyta, granulocyta és monocyta szériák azonosítható őssejtjeivé (Lozzio et al., 1981). Szuszpenziós kultúrában tenyésznek, RPMI tápfo-lyadékban, 10% FCS mellett.

L-929 sejtvonal

Ezt a sejtvonalat egér kötőszövetből hozták létre (Earle, 1940). A sejttenyésztés történetében az L vonal volt az első sejt, mely folyamatos kultúrában tenyésztett és a 929 klón volt az első azonosított sejtvonal. Sejtjei fibroblaszt típusúak, letapadó kultúrában, RPMI tápfolyadékban, 10% FCS mellett tenyésztették.

NIH/3T3 sejtvonal

A NIH/3T3 sejtvonalat NIH Swiss egér embrióból hozták létre. Sejtjei igen magas kontakt gátló képességgel rendelkeznek, fibroblaszt típusúak, letapadó kultúrában, DMEM tápfolyadékban, 10% FCS mellett tenyésztették.

Primér sejtvonal szeparálása és tenyésztése

Primér sejtvonalakhoz endocrin ophtalmopathiás (EOP-os) betegektől korrekciós műtét során nyert szemizom darabot, illetve dekompresziós mű-tét kapcsán eltávolított zsírszövetet dolgoztunk fel. Kontrollként, strabismus műtétek során kivett szemizom darabot, és EOP által nem érintett betegek szemműtétjei során kivett zsírszövetet használtunk, valamint humán bőrszö-veget melyet az alkar belső felszínéről vagy a hasról nyertünk.

A szövetdarabokat PBS-s mosás után kb. 2x2mm-es darabokra vágjuk, majd NH_4Cl oldatban a maradék vért hemolizáltatjuk, újra mostuk PBS-sel, majd egy tápfolyadékkal. Ezután a szövetdarabkákat Petri csészébe helyeztük. A bőrszövetből készített darabkákra fedőlemezeket is tettünk. Végül 20% FBS tartalmú MEDIUM 199 tápfolyadékot pipettáztunk a szövetekre. 37°C -on, 5% CO_2 és 80% páratartalom mellett tenyésztettük. Hetente kétszer cseréltünk tápfolyadékot. Általában 6 hét alatt konfluens tenyészetet kaptunk. Ekkor trypsin-EDTA segítségével felszedtük a letapadt, monolayerben növekvő sejteket és tenyésztő flakóban szaporítottuk őket tovább 10% FCS tartalmú MEDIUM 199-ben a kívánt sejtszám eléréséig.

A sejt kultúrákon alkalmazott kezelések

A OH^\bullet szabadgyökök hatásának tanulmányozását Fenton reakció segítségével végeztük, a sejtenyészetekben Fe^{2+} -ADP komplex és H_2O_2 hozzáadásával OH^\bullet szabadgyököket generáltunk. A vas végkoncentrációja a tenyésztő médiumban $100 \mu\text{M}$ volt. A hidrogén-peroxidot $55 \mu\text{M}$ végkoncentrációban adtuk a primér szövetből kinőtt sejtekhez és a 3T3, valamint az L929-hez, K-562-nél pedig $100 \mu\text{M}$ -t.

2×10^5 sejt/ml kezdeti sejtszuszpenzió koncentrációval dolgoztunk, egy Fenton reaktánsokkal kezelt, és egy kontrol csoporttal, 96 óráig. Az első 48 óra után tápfolyadék cserét végeztünk, és ismételt kezelést. Ara-C-vel is kezeltünk egy sejtcsoportot ($1.8 \mu\text{M}$ végkoncentrációban).

A sejt kultúrák vizsgálatára az alábbi módszereket alkalmaztuk:

Életképesség teszt Trypán-kék festéssel

Hemoglobin kimutatás benzidinnel

Hemoglobin hisztokémiai kimutatása DAF (2,7- diaminofluorénnel)

A K562 sejtek differenciálódásának nyomon követése flow-cytométerrel

70%-os etanollal fixált sejteket hígítottuk a méréshez ideális sejtsűrűséghez.

A 10,000 sejtről szereztünk információt FSC és SSC üzemmódokban és a vizsgálni kívánt sejtpopulációt digitalizált "kapuk" felhelyezésével jelöltük ki.

Tenyésztő médiumok vastartalmának meghatározása atomabszorpciós spektrometria (AAS) segítségével

A vasat lángtechnikával, a tápfolyadék 10%-os triklórecetsavas fehérjementesítése és centrifugálása után, a felülúszóból közvetlenül mértük.

GAG mérés spektrofotometriával, dimetilmetilénkék (DMB) reakcióval

GAG hisztokémiai festés dimetilmetilénkék (DMB) reakcióval

Ki-67 proliferációs antigén kimutatás immunhisztokémiával

Zsírfestés Oil red-O-val

Zsírok kimutatása Szudán IV. festéssel

A sejtek szolubilizálása enzimmérésekhez (SOD, kataláz)

Szuperoxid-diszmutáz (SOD) aktivitás mérése sejt-szolubilizátumból

Kataláz mérés sejt-szolubilizátumból

DNS mérés

Fehérje mérés

4. Eredmények

K562 sejtvonalon végzett vizsgálataink és azok eredményei

A K562 humán erythroleukemia sejtvonal normál tenyésztés során korlátlanul szaporodik és csupán kb. 3 %-ban differenciálódik spontán módon. A differenciálódáskor a sejtek szaporodása leáll és a normál vörösvérsejtekkel azonos módon hemoglobint kezdenek szintetizálni. K562 sejtek tenyésztésében szabadgyököket generáltunk Fenton reaktánsok ($\text{Fe}^{2+}\text{ADP} + \text{hidrogén-peroxid}$) hozzáadásával. Megmértük a tenyésztő médiumok (RPMI és M199) vastartalmát atomabszorpcióval, mely 2.25 mg/l-nek vagyis 4.5 μmol -nak adódott. Ehhez képest a tápfolyadékhoz adott Fenton reaktáns 22-szeresére emelte a médium vas szintjét.

A kezeletlen sejtek vizsgálata mellett úgynevezett pozitív kontrol kezelést is végeztünk 1.8 μM 1- β -D-arabinofuranosylcytosine-nal (Ara-C), mely bizonyítottan elindítja ezen sejtek erythroid differenciálódását. Az elvégzett sejt számolás adatai egyértelműen igazolják, hogy mind az Ara-C, mind a Fenton reaktánsokkal való kezelés statisztikailag erősen szignifikánsan lelassítja a sejtek szaporodási ütemét, vagyis gátolja a sejtproliferációt. Az erythroleukémia sejtekben a hemoglobin szintézis detektálását benzidin festéssel és Bürker kamrában történő számolással végeztük, ennek eredménye igazolta a szabadgyökök differenciálódást indukáló hatását, hisz jelentősen emelkedett a hemoglobint tartalmazó sejtek száma. A módszer mikroszkópos kiértékelését azonban bizonytalannak találtuk. Hemoglobin kimutatására a 2,7-diaminofluorene (DAF) festést vezettük be. Az új módszer előnyei a következők: míg a benzidin reakció interferál a tápfolyadékkal elsősorban annak savó komponensével, addig a DAF festést nem zavarja a savó jelenléte, ezzel lehetőséget teremtve több minta gyors, szimultán mérésére multiwell platekben, ezen kívül a DAF-hemoglobin fotometriás meghatározás mintegy 80-szor érzékenyebb mint a benzidin-hemoglobin reakció. Az új vegyület bevezetésének szükségességét az is indokolta, hogy a benzidin bizonyítottan erős mutagén és karcinogén vegyület, és ennek ellenére a laboratóriumokban mindmáig általánosan használatos a hemoglobin kimutatására.

A K562 sejteken Ara-C-vel és Fenton reaktánsal történő kezeléseket után hemoglobin kimutatást végeztünk DAF festéssel. A kezeletlen, kontrol sejteknél

szembetűnő, milyen csekély a hemoglobint tartalmazó sejtek száma, míg Ara-C kezelés hatására jól kimutatható módon elindult a hemoglobin szintézis a sejtekben. Fenton kezelés úgyszintén nagyszámú hemoglobin pozitív sejtet eredményezett, vagyis diaminofluorénnel sok kék színreakciót adó sejtet láthatunk, ami bizonyítja, hogy az erythroleukemia sejtek tenyésztésében a generált OH[•] szabadgyökök elindítják a sejtek differenciálódását,

A K562 sejtek flow-cytometriás vizsgálatakor, a méretbeli eloszlásról informáló FSC regisztrátum, két párhuzamos kísérletnél, egybevégezően a sejt méret növekedését mutatta, Fenton kezelés illetve az ehhez kontrollként alkalmazott Ara-C kezelés hatására, mintánként 10,000 sejtet vizsgálva.

A sejtek belső állományának kompaktabbá válását, vagyis a granularitás növekedését, a kezeletlen populációhoz képest meggyőzően igazolják az SSC regisztrátumok, mind a Fenton-kezelt, mind az Ara-C-vel kezelt sejteknél. Egyértelműen megállapítható, hogy a cytoplazmában olyan szerkezetbeli változások mentek végbe, melyek a differenciálódás velejárói, jelen esetben a hemoglobin termelés. Ezek az eredmények is további kísérleti bizonyítékokat képviselnek a OH[•] szabadgyökök blaszt-sejt differenciálódást indukáló hatásáról.

Humán fibroblasztokkal és fibroblaszt típusú, daganatos jellegű sejtvonalakkal végzett kísérleteink és azok eredményei

Primér humán sejtenyészetekre is ki kívántuk terjeszteni vizsgálatainkat, hogy a korábban immortalizált sejtvonalakon, a szabadgyökök hatásáról szerzett eddigi megfigyeléseinket általánosíthassuk. Ehhez fibroblasztokat növesztettünk a következő szövetekből: nem EOP-os retrobulbáris izom, EOP-os retrobulbáris izom, nem EOP-os retrobulbáris zsírszövet, EOP-os retrobulbáris zsírszövet, alhasi bőrszövet.

Elvégeztük a gyökfolyamatokban kulcsszerepet játszó két enzim, a kataláz és a SOD (szuperoxid dizmutáz) mennyiségének meghatározását.

A két enzim méréséből származó eredmények, a SOD és kataláz génexpressziójának növekedését mutatják gyökkezelések hatására. Ezek az eredmények egyeznek a korábban malignus sejtvonalakon HL-60, K562, PC-12, SK-N-MC, stb kapott eredményekkel.

Azon megfigyelésünk bizonyítására, hogy a szabadgyök fluxus hatására a sejtek szaporodási üteme lelassul, elvégeztük a Ki-67 proliferációs mag-antigén immunhisztokémiai kimutatását. EOP-os és kontrol sejteken vizsgáltuk a szabadgyök fluxus eredményét a sejtproliferációra. Mindkét csoportban a kezeletlen sejtek kb 40-50%-a mutatott Ki-67 pozitivitást, míg ugyanezek gyökhatásra csak néhány %-ban mutattak proliferációs aktivitást, ezzel újabb bizonyítékot szolgáltatva, hogy a szabadgyökök differenciálódást indukáló hatásának első lépése a szaporodási ütem lassulása.

A retrobulbáris fibroblasztok EOP-ban nagy mennyiségű GAG produkcióra képesek, s ezeknek a GAG-oknak a rendkívüli vízkötőképessége igen fontos szerepet játszik az exophthalmus kialakulásában. Megvizsgáltuk, hogy in vitro körülmények között, szabadgyök kezelés hatására a retrobulbáris fibroblasztokban fokozódik-e a GAG-ok produkciója. E célból a sejteken GAG-kimutatást végeztünk 1,9-dimetilmetilénkék (DMB) festékkel, amely a GAG-okkal kékeslila metakromáziás színreakciót ad. A 3 hónapos kezelések miatt a hisztokémiai reakciót in situ vagyis a tenyésztő flaskában kellett elvégeznünk. A kísérleti periódus lejártakor a sejteket a tenyésztő flaskában fixáltuk, és utána a flaska oldallemezét körbevágtuk, majd lebontottuk az egész felső részt a nyakkal együtt. Így egy nagy „tárgylemezt” kaptunk melyen a festés könnyedén kivitelezhető volt és utána a lefedést is meg lehetett oldani. A kezeletlen kontrol fibroblaszt tenyészetekben a DMB festődés csak igen kismértékű metakromáziát mutatott, míg egy hetes időtartamú OH· szabadgyök fluxus hatására a fibroblasztokban szintetizálódott GAG-ok „mennyisége” vagyis a metakromáziás festődés intenzitása lényegesen kifejezettebb volt. Egy hónapos kezelés hatására, ez a tendencia tovább erősödik, s ugyanakkor a sejtek már morfológiai eltéréseket is mutatnak aminek fő jellemzője a sejtek orsóalakjának megváltozása, és a többszörös nyúlvánnyal rendelkező sejtek megjelenése. Ezen morfológiai elváltozás a három hónapig kezelt tenyészetekben egészen kifejezetté válik, melyhez ugyanakkor erős GAG-pozitivitás is társul. Ez a megfigyelés fontos adalék lehet a retrobulbáris térfogatnövekedés pathomechanizmusának megértésében, mivel a GAG-ok egy része az extra-celluláris térben is képes jelentős duzzadásra.

A sejtek GAG produkciójának számszerűsítésére kvantitatív spektrofotometriás GAG meghatározást végeztünk. A mérésből jól kitűnik, hogy már egy hetes Fenton kezelés is, fotometriásan mérhető GAG produkcióra készítette mindkét sejtpopulációt. A párhuzamos kezelések tendenciájukban megegyeznek, minimális mennyiségi különbséggel. Összegezve, mind a hisztokémiai mind a fotometriás eredmények igazolják, hogy a retrobulbáris fibroblasztok szabadgyök kezelés esetén in vitro körülmények között megnövekedett intenzitással képesek GAG-okat szintetizálni, és a megtermelt GAG mennyisége a kezelési idővel tovább növekszik.

A fibroblaszt-preadipocita átmenet problémájának vizsgálata

Az EOP-os betegek orbitájában zajló autoimmun folyamat az ott található szöveti komponensek térfogatnövekedését eredményezi. Az exophthalmus fenntartásában rendkívüli jelentősége van a retrobulbáris zsírszövet hyperpláziájának, ami jelen ismereteink szerint megfordíthatatlannak látszik, eredete és oka mindmáig nem tisztázott. Humán orbitális fibroblasztok preadipocitává alakulását ezidáig csak zsírsejt differenciáltató protokollok alkalmazásával, pl: IBMX, dexamethason, inzulin, biotin, prosztaglandin, TSH jelenlétében tartották lehetségesnek, a bőreredetű fibroblasztokat pedig negatív kontrollként használták, mint amelyek így sem képesek a preadipocita átmenetre.

Normál körülmények között tenyésztett retrobulbáris és bőreredetű fibroblasztjainkon Oil red O zsírfestéssel az első megfigyelésünk az volt, hogy differenciáltató ágensek használata nélkül is jelentős intenzitású zsírfestődést láttunk, és hogy a sejtek zsírfestődése a felülettől függően különbözött. Ennek tisztázására öt különböző minőségű felületen növesztettük a sejteket, és a későbbiekben itt történtek a festések is.

A kezeletlen primér orbitális és bőreredetű fibroblasztokon kívül NIH/3T3 és L929 sejtvonalakat is vizsgáltunk, melyekről eddig spontán preadipocita differenciálódást nem írtak le. Az Oil red O festés kontrollálására Szudán IV. festékkel is elvégeztük a zsírfestéseket. Azt tapasztaltuk, hogy az üveg felületen, és kollagénezett üvegen intenzív zsírfestődést mutattak a sejtek, míg műanyag felületen ez a festődés szinte elhanyagolható volt.

Megfigyeléseinkből arra a következtetésre jutottunk, hogy a fibroblaszt-preadipocytá vizsgálatok szempontjából, döntő kérdés, hogy hogyan befolyásolja a tenyésztő felület a zsírfestést. Lehet, hogy a felület minősége (pl. elektrosztatikus tulajdonsága) hat a sejtekre és mint lipid akkumuláció inhibitor, gátol speciális folyamatokon keresztül. Mindezekből arra következtethetünk, hogy mind a lipid akkumulációra mind a lipid festődésre befolyással van a felület anyaga melyen a sejtek nőnek illetve festődnek. Bár a jelenségek magyarázatát nem ismerjük, feltétlenül fontos figyelembe venni létezését. A jelenség ismeretében újra kell értékelni számos kísérlet eredményét melyet a fibroblaszt-preadipocytá differenciálódás folyamatáról közöltek. A fenti eredményeinkből talán nem tűnik túlzásnak kimondani, hogy szerintünk minden fibroblaszt képes spontán zsírákkumulációra és ez azt jelenti, hogy gyakorlatilag a fibroblasztok preadipocytának tekinthetők, melyek megfelelő szignál(ok) hatására adipocytává képesek differenciálódni. Ezt a koncepciót szem előtt tartva új értelmezési lehetőségek nyílnak meg számos klinikai probléma, többek között az endocrin ophtalmopathiát kísérő exophtalmus, vagy akár korunk népbetegsége, az elhízás okainak megismerésére.

Mivel a zsírákkumuláció is egy differenciálódási marker jelenség, megvizsgáltuk a OH· szabadgyökök hatását orbitális és bőr eredetű fibroblasztokra. Szabadgyök fluxus hatására igen intenzív zsírákkumulációt tapasztaltunk, mind az EOP-os mind a kontrol fibroblasztoknál. Ez a megfigyelés egybevág azzal, hogy ezek a szabadgyökök az eddig vizsgált valamennyi sejttypusban differenciálódási folyamatokat indítottak be. Ez azt jelenti, hogy a szabadgyök fluxus a normális blaszt-sejtekben is az immortalizált sejtvonalakhoz hasonlóan, differenciálódási folyamatokat indít el. Ezek lehetnek igen különböző természetűek, pl. a hemoglobin, a GAG, a trigliceridek, stb szintézisének beindulása, ami a differenciálatlan blasztokban csak csekély mértékben van jelen. Ezek az eredmények arra is rámutattak, hogy a zsírdifferenciálódási tematika még számos helyen szorulhat revízióra, hiszen olyan egyszerű faktorok, mint a tenyésztőfelület minősége is, jelentős befolyással lehetnek a módszerek kimenetelére, s ezzel az interpretációra is.

5. Összefoglalás

A $\text{OH}\cdot$ szabadgyökök differenciálódást indukáló hatását különböző modelleken és technikákkal vizsgáltuk. K562 erythroleukemia sejteken Fenton reakcióval, vagyis $\text{OH}\cdot$ szabadgyökök generálásával differenciálódást indukáltunk. A hemoglobin detektálására benzidin helyett bevezettük a diaminofluorént. Az erythroleukemia sejtek, szabadgyök kezelés hatására DAF festéssel intenzív hemoglobin szintézist mutattak, és emellett, flow-cytometriával a sejtek méretbeli és kompaktságbeli növekedését tapasztaltuk. Az EOP-os retrobulbáris szemizomból és zsírszövetből származó fibroblasztokban, 1 hetes, 1 és 3 hónapos $\text{OH}\cdot$ szabadgyök kezelés hatására fokozott GAG termelést mutattunk ki. Ez igen fontos megfigyelés, mivel az EOP-ban a fokozott GAG produkció, s azok rendkívüli vízkötőképessége az exophthalmus egyik oka. Meghatároztuk ezen primér fibroblasztok SOD és kataláz aktivitásának változását szabadgyökfluxus hatására. Mindkét enzim génexpressziója fokozódott gyökkezelések hatására, mely egyet jelent a gyökök turnover-ének a megnövekedésével, s ez a jelenség alapvető szerepet játszhat a sejtdifferenciálódás mechanizmusában. Ki-67 proliferációs antigén kimutatással az EOP-os és a kontrol fibroblasztok Fenton kezelés után jelentős proliferációs aktivitás csökkenést mutattak, ami a sejtdifferenciálódás megindulásának első lépése. A retrobulbáris zsírok felszaporodásának okáról az EOP-ban, a fibroblaszt-preadipocytá átmenet vizsgálatával szereztünk információkat, mivel ebben a folyamatban az adipocytá differenciálódásnak alapvető szerepe lehet. Oil red O és Szudán IV festéssel primér humán retrobulbáris és bőr eredetű fibroblasztokat, s két fibroblaszt típusú immortalizált sejtvonalat az L929-et és a 3T3-at vizsgáltunk. Azt tapasztaltuk, hogy a sejtek zsírfestődése a felülettől függően, műanyag és üveg felületen különbözött. Emellett spontán módon, differenciáltató ágensek nélkül is jelentős intenzitású zsírfestődést láttunk. Megfigyeléseink szerint minden fibroblaszt képes spontán zsírákkumulációra, s megfelelő szignál hatására adipocytává differenciálódhat. A gyökfluxus növelése az eddig vizsgált összes blaszt-állapotú sejtben beindítja a differenciálódási jelenségeket, arra utal, hogy aligha lehet fenntartani az öregedés szabadgyök elméletét abban a formában, amely szerint az oxigéneredetű szabadgyökök csakis káros melléktermékeknek tekintendők.

Az értekezés elkészítésében felhasznált publikációk:

1. Zsupán, I., Hadházy, Cs., Zs.-Nagy, V., Jeney, F., Zs.-Nagy, I. (1987): The effect of OH· radicals generated by Fenton reaction on the growth and cartilage differentiation. J. Submicrosc. Cytol. 445-454. (IF: 0.717)
2. Zs.-Nagy, I., Steiber, J., Jeney, F. (1995): Induction of age pigment accumulation in the brain cells of young male rats through iron injection into cerebrospinal fluid. Gerontology 41, (Suppl.2.) 145-158. (IF: 1.424)
3. Szabó, J., Jeney, F., Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Nagy, K., Zs.-Nagy, I. (1999): Szabadgyökök lehetséges szerepe az endocrin ophthalmopathia kialakulásában. Magyar Belorvosi Archivum, 52, 277-280.
4. Jeney, F., Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Szabó, J., Zs.-Nagy, I. (2000): Cytochemical studies on the fibroblast-preadipocyte relationship in cultured fibroblast cell lines. Acta Histochem. 102. 381-389. (IF:0.943)

Továbbá olyan közlemények, amelyekben a jelölt társszerzőként közreműködött, de az azokban közölt eredményekre az értekezésben csak citáció szintjén történik hivatkozás:

1. Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Jeney, F., Nagy, K., Zs.-Nagy, I. (2000): On the useful role of OH· free radicals in differentiation of cultured human fibroblasts. Arch. Gerontol. Geriatr. 31. 233-242. (IF:0.269)
2. Oravecz, K., Bazsó-Dombi, E., Jeney, F., Nagy, K., Gecse, M., Zs.-Nagy, I. (2001): The involvement of hydroxyl free radicals in differentiation of the PC-12 rat pheochromocytoma cell line. Arch.Gerontol.Geriatr. 33. 61-69. (IF:0.269)
3. Oravecz, K., Kalka, D., Jeney, F., Cantz, M., Zs.-Nagy, I. (2002): Hydroxyl free radicals induce cell differentiation in SK-N-MC neuroblastoma cells. Tissue and Cell, 34, 33-38. (IF: 0.864)

Előadások:

1. Zs.-Nagy, V., Zsupán, I., Hadházy, Cs., Jeney, F., Zs.-Nagy, I. (1989): The possible role of OH· radicals in aging: A cell culture model. XIV. International Congress of Gerontology, Acapulco, Mexico.
2. Jeney, F., Nagy, K., Steiber, J., Zs.-Nagy, I. (1995): Further studies on the differentiation induction of K562 leukemia cells by the products of Fenton reaction. Congress of the European Society for Free Radical Research, Budapest.
3. Zs.-Nagy, I., Steiber, J., Jeney, F. (1995): Induction of age pigment accumulation in the brain cells of young male rats through iron injection into the cerebrospinal fluid. 5th International Symposium on Lipofuscin and Ceroid Pigments, Tokyo.
4. Nagy, K., Horváth, F., Jeney, F., Zs.-Nagy, I.: (1997) EPR detection of intracellular oxygen concentration changes during differentiation of K562 leukemic cells. 2nd International Conference on Bioradicals and 5th International Workshop on ESR (EPR) imaging and ESR Spectroscopy, Yamagata.
5. Jeney, F., Szabó, J., Nagy, K., Oravecz, K., Zs.-Nagy, I.: (1997) The effect of OH radicals deriving from Fenton reaction on growth characteristics of human retrobulbar fibroblast cultures. 12. Arbeitstagung Experimenteller Schilddrüsenforschung (AESF), München.
6. Jeney, F., Nagy, K., Oravecz, K., Bazsó-Dombi, E., Zs.-Nagy, I. (1998): Oxigén eredetű szabadgyökök hatása a sejtdifferenciálódásra – in vitro. Magyar Gerontológiai Társaság Kongresszusa, Miskolc-Lillafüred,
7. Bazsó-Dombi, E., Nagy, K., Jeney, F., Oravecz, K., Zs.-Nagy, I. (1998): Fenton reakció által indukált OH· szabadgyökök hatása a SOD és kataláz enzimek

génexpressziójára a sejtdifferenciálódás során, I.rész. Magyar Gerontológiai Társaság Kongresszusa, Miskolc-Lillafüred.

8. Oravecz, K., Jeney, F., Bazsó-Dombi, E., Nagy, K., Zs.-Nagy, I. (1998): A Fenton reakció által indukált OH· szabadgyökök hatása a SOD és kataláz enzimek génexpressziójára a sejtdifferenciálódás során, II. rész. Magyar Gerontológiai Társaság Kongresszusa, Miskolc-Lillafüred.
9. Jeney, F., Szabó, J., Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Zs.-Nagy. (1988): The role of free radicals on the growth characteristics of human retrobulbar fibroblasts from EOP patients and normal individuals. 5. Leipziger Allerlei, Leipzig.
10. Jeney, F., Szabó, J., Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Zs.-Nagy. (1988): Further studies on the effect of OH· radicals on the differentiation of human retroocular fibroblasts. 6th International Symposium on Graves' Ophthalmopathy. Amsterdam.
11. Jeney, F., Szabó, J., Oravecz, K., Bazsó-Dombi, E., Zs.-Nagy. (1998): Studies on the spontaneous and free radical-induced differentiation of the orbital fibroblasts in Graves' ophthalmopathy. 13. Arbeitstagung Experimenteller Schilddrüsenforschung (AESF), Ratzeburg, Lübeck.
12. Szabó, J., Jeney, F., Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Nagy, K., Zs.-Nagy. (1998): Possible clinical relevance of the free radicals in the pathogenesis (treatment ?) of thyroid associated ophthalmopathy. 13. Arbeitstagung Experimenteller Schilddrüsenforschung (AESF), Ratzeburg, Lübeck.
13. Jeney, F., Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Szabó, J., Zs.-Nagy. I. (1999): Reconsideration of the fibroblast preadipocyte relationships on cultured human retroocular and other fibroblasts lines. 14. Arbeitstagung Experimenteller Schilddrüsenforschung (AESF), Berlin.

14. Jeney, F., Bazsó-Dombi, E., Oravec, K., Szabó, J., Zs.-Nagy. (2000): An experimental approach to the role hypoxia in the formation of retrobulbar fat tissue in Graves' ophthalmopathy. 15. Arbeitstagung Experimenteller Schilddrüsenforschung (AESF), München.
15. Jeney, F.: (2001): OH· szabadgyökök lehetséges szerepe az endocrin ophthalmopathia tanulmányozásában. A Magyar Allergológiai és Klinikai Immunológiai Társaság XXIX. Kongresszusa, Balatonfüred.
16. Szabó, J., Nagy, E., Loevey, A., Boda, J., Jeney, F., Sz.-Farkas, Zs., Tóth, K., Gomba, Sz., Balázs, E. (2001): A retrobulbaris zsírszövet eltávolítás elméleti és gyakorlati vonatkozásai endocrin ophthalmopathiában. Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet Magyarországi Szakcsoportjának Tudományos Úlése, Kisvárd.