

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**HIDROXIL SZABADGYÖKÖK NEUROBLASZTÓMA  
SEJTVONALAK DIFFERENCIÁLÓDÁSÁBAN BETÖLTÖTT  
INDUKÁLÓ SZEREPE**

**ORAVECZ KATALIN**

**DEBRECENI EGYETEM  
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
III. SZ. BELGYÓGYÁSZATI KLINIKA, GERIÁTRIAI TANSZÉK  
(volt Gerontológiai Tanszék)  
DEBRECEN, 2003**

**HIDROXIL SZABADGYÖKÖK NEUROBLASZTÓMA SEJTVONALAK  
DIFFERENCIÁLÓDÁSÁBAN BETÖLTÖTT INDUKÁLÓ SZEREPE**

**Egyetemi Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**Írta:**

**Oravecz Katalin**

**Témavezető:**

**Prof. Dr. Zs.-Nagy Imre**

**Biol. tud. doktora**

**Debreceni Egyetem**

**Orvos- és Egészségtudományi Centrum**

**Általános Orvostudományi Kar**

**III. sz. Belgyógyászati Klinika, Geriátriai Tanszék  
(volt Gerontológiai Tanszék)**

**Debrecen, 2003**

## 1. BEVEZETÉS

Az öregedés membrán hipotézise (membran hypothesis of aging = MHA) megfogalmazza, hogy az élő szervezetekben egy állandó hidroxil szabadgyök ( $\text{OH}^\cdot$ ) termelődés folyik (Zs.-Nagy, 1994), amely szabadgyök áram jelentős biológiai szereppel bír. Az elmélet kitér a differenciálódás és az öregedés jelenségeinek értelmezésére, valamint a  $\text{OH}^\cdot$ -szabadgyökök szerepére ebben a folyamatban. Az MHA szerint az öregedés a differenciálódás "túlfutása", így ezek mozgatórugója is közös. Az MHA felhasználja az öregedés szabadgyökös teóriáját (Harman, 1956) abban a tekintetben, hogy a  $\text{OH}^\cdot$ -szabadgyökök, mint az oxigéneredetű reaktív részecskék egyikének, folyamatos jelenléte a sejtekben a sejtkomponenseket károsítja.

Az MHA szerint ez a polimerizáló, keresztkötő hatás a kompakt struktúrákat, így a sejtmembránt érinti leginkább, valamint ehhez társulnak további paraméterek is, mint például az akciós potenciálok reziduális hője a membránokon. Ezek a hatások a sejtek fiziko-kémiai tulajdonságait változtatják meg lépésről-lépésre oly módon, hogy az végül is az öregedéshez vezet, és amelyből az öregedés összes jelensége levezethető. A membrán csökkenő transzportja miatt létrejövő ionösszetétel változás (magnövekedett ionerősség) a sejt kolloidális rendszerére igen jelentős hatást gyakorol.

Konkrétan a membránok szabadgyökök okozta károsodásának egyik fő következménye a passzív  $\text{K}^+$ -permeabilitás csökkenő tendenciája, amiből következik az intracelluláris  $\text{K}^+$  ion koncentráció növekedése a sejtekben. Ez egyrészt segít fenntartani a membrán polarizált állapotát, azaz ingerelhetőségét. Másrészt viszont a magnövekedett intracelluláris monovalens ionerősség következtében a sejt kolloid rendszer kondenzáltsága (aggregációja) fokozódik, amely mintegy pozitív visszacsatolás révén tovább növeli a keresztkötések kialakulásának lehetőségét is, mivel egy kondenzáltabb rendszerben magnövekszik a gyökreakciók hatékonysága. Az aggregáltabb rendszer kolloid ozmotikus nyomása csökken, a sejt fokozatosan elveszti víztartalmát, azaz az életkor előre haladtával egy dehidráció következik be a sejtekben, párhuzamosan a szárazanyag tartalom növekedésével.

Az MHA szerint viszont ez nem kizárólag öregkori jelenség, a folyamatok beindulása nem köthető egy kitüntetett életkorhoz, hanem már a megtermékenyítéssel elkezdődnek. Az egyedfejlődés elején a szárazanyag felhalmozódás nélkülözhetetlen a növekedési és maturációs folyamatokban, mint például az izomzat és a csontrendszer kialakulásában. A teljes maturációs állapot elérésével pedig ezek a folyamatok nem állnak meg, sőt felgyorsulnak. Az így előálló funkcióvesztés pedig már az öregedési folyamat része.

A fenti elméletekhez kapcsolódva kezdtem vizsgálni a szabadgyökök lehetséges indukáló szerepét a sejt differenciálódási folyamatokban. Munkámhoz két neuroblasztóma sejt vonalat választottam. Tudjuk, hogy az idegrendszer központi jelentőséggel bír az érési és az öregedési folyamatok során. Ha elfogadjuk továbbá azt a tényt is, hogy a nagyobb oxigén fogyasztás több szabadgyök termelődésével jár együtt, akkor fontos figyelembe venni, hogy a központi idegrendszer sokkal több oxigént fogyaszt, mint más szövetek, így sokkal több szabadgyököt is termel, ami szintén indokolja, hogy kísérleteinkben neuroblasztóma modellekre esett a választás.

További érdekes kísérleti tény, hogy az emlősökben az idegrendszer oxigénfogyasztása a születés után jelentős mértékben megemelkedik, amikor is

viszonylag rövid idő alatt az idegsejtek differenciálódása végbemegy (*Jones et al., 1982*) éppen a magasabb oxigén koncentráció mellett. A fiatal egyedek több oxigént fogyasztanak, mint az idősebbek, így bennük ezzel párhuzamosan több szabadgyök termelődik, a fiatal organizmusok mégis képesek nőni és differenciálódni, míg az idősebbek az alacsonyabb oxigénfogyasztás (=alacsonyabb gyöktermelés) ellenére is elvesztik megszerzett funkcióikat. Tudjuk azt is, hogy a megemelt oxigén nyomás *in vitro* számos sejtvonal proliferációs rátáját csökkenti (*Grant et al., 1992; Absher et al., 1994*), így neuroblasztóma sejtvonalakét (PC-12) is, ahol a differenciáltabb fenotípus kialakulását is elindítja (*Kato et al., 1997*). Mindezek alapján felmerül a kérdés, hogy a szabadgyökök részt vesznek-e, és ha igen, akkor hogyan és milyen hatással a differenciálódási folyamatok indukálásában.

A fenti tények, a laboratóriumunkban más sejtvonalakon végzett korábbi hasonló kísérletek eredményei (*Nagy et al., 1993, 1995*), valamint az általánosíthatóság igényéből kiindulva méréseimet két modellen, a PC-12 és az SK-N-MC neuroblasztóma sejtvonalakon végeztem. A vizsgálatok konkrétan arra vonatkoztak, hogy egyszeri és ismételt OH<sup>•</sup>-szabadgyök fluxus indukáló hatással bír-e a fenti sejtvonalak differenciálódására, illetve annak elindítására. A vizsgálatok két kérdéskörben történtek.

Először a PC-12 sejtvonalon azt vizsgáltuk, hogy az oxigéneredetű szabadgyökök metabolizmusában résztvevő enzimek -a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a kataláz és a glutation-peroxidáz aktivitása hogyan változik a szabadgyökös kezelések hatására.

Másodsorban arra voltunk kíváncsiak, hogy a kezelések hatására megjelennek-e differenciálódási markerek a sejtekben. Ebben a kérdéskörben az SK-N-MC sejtvonalon vizsgáltuk az acetilkolin-észteráz (AChE) és a gangliozid-szialidáz (GS) enzimek aktivitásbeli különbségeit a szabadgyökös kezelések előtt és után.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérletes munkám tehát ahhoz a tágabb kutatási koncepcióhoz kapcsolódik, miszerint a szervezetünkben folyamatosan termelődő  $\text{OH}^\cdot$ -szabadgyökök nemcsak káros hatásokkal bírnak az élő szervezetekre nézve, hanem bizonyos koncentrációban való jelenlétük esszenciális az élő állapot fenntartásában, ezenkívül résztvesznek a sejtdifferenciálódási folyamatokban is, mint indukáló tényezők.

### **A konkrét célkitűzéseim a következők voltak:**

1. A  $\text{OH}^\cdot$ -szabadgyökök differenciálódást indukáló hatásának bizonyítása tenyésztett neuroblasztóma sejtvonalakon (PC-12 és SK-N-MC).
2. Az oxigénből származó reaktív gyököket átalakító és elimináló enzimek, a SOD, a kataláz és a glutation-peroxidáz aktivitásbeli változásainak vizsgálata szabadgyökös kezelések hatására a PC-12 sejtvonalon.
3. Differenciálódási markerek, az AchE és a GS enzimek aktivitásbeli változásainak vizsgálata a Fenton reakcióval való kezelések hatására az SK-N-MC sejtvonalon.
4. Az öregedéssel kapcsolatos elméletek, különös tekintettel az MHA-ra, valamint a szabadgyökök biológiai szerepének mélyebb megismerése.

### 3. MÓDSZEREK

#### Sejtvonalak

A kísérletekben alkalmazott modellek a **PC-12** (ATCC CRL 1721) patkány feokromocitóma és az **SK-N-MC** (ATCC HTB 10) humán neuroblasztóma sejtvonalak voltak. A sejtvonalak tenyésztése standard körülmények között történt.

#### A Fenton reakcióval való kezelések

A sejt kultúrák kezelése a Fenton reakcióval történt (*Fenton, 1894*), ADP-Fe<sup>2+</sup> komplex és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a sejt kultúrákhoz történő egyidejű hozzáadásával. Az ADP végkoncentrációja mindig 20-szorosa volt a vasénak, ezzel az aránnyal biztosítottuk, hogy a vas autooxidációja nem következett be.

A PC-12 sejtvonalon kétnaponként, az SK-N-MC sejtvonalon pedig háromnaponként cseréltünk tápfolyadékot az irodalomban leírt adatoknak és saját tapasztalatainknak megfelelően, és ekkor végeztük ill. ismételtük a szabadgyökös kezeléseket. Így a PC-12 sejteket 1x48 és 2x48 órás, az SK-N-MC sejteket pedig 1x72 és 2x72 órás inkubációs időtartamokban kezeltük, melyek végén történt meg az enzimaktivitások mérése.

Mindezekkel párhuzamosan tenyésztettünk, ill. mértünk „kontroll” sejteket is, melyeken nem alkalmaztunk kezeléseket. Az SK-N-MC sejteknél továbbá bróm-dezoxi-uridinnal (BrdU) való kezelés is történt, mely differenciálódást indukáló szer a sejtvonalnál; az így kezelt kultúrákat „pozitív kontrollként” értékeltük.

#### A vizsgált paraméterek (enzimaktivitások) mérése

##### Szuperoxid-dizmutáz

A SOD aktivitás meghatározását *Flohé és Ötting (1984)* módszere szerint végeztük. A kísérleti rendszerben a xantin/xantin-oxidáz reakcióval létrehozott szuperoxid anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) gyökök redukálták a hozzáadott citokróm-c molekulákat, mely folyamat színváltozással járt, így spektrofotometriásan követhettük. A mért mintáink SOD tartalma eliminálta a generált O<sub>2</sub><sup>-</sup> szabadgyökök egy részét, ennek mértékéből számoltuk ki a kontroll és a kezelt sejtek SOD tartalmát.

##### Kataláz

A kataláz aktivitás meghatározását *Gaunt és De Duve (1976)* módszere alapján végeztük. Az enzim a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -ot bontja vízzé és oxigénné. Mintáinkat ismert mennyiségű H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal inkubáltuk, és a visszamaradó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyiségéből következtettünk a sejtekben a kataláz aktivitására. A visszamaradó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot TiOSO<sub>4</sub>-tal reagáltattuk, majd a sárga színű titánium-peroxisulfát mennyiségét kolorimetriásan határoztuk meg.

### **Glutation-peroxidáz**

A glutation-peroxidáz aktivitás meghatározását *Flohé és Günzler (1984)* módszerét követve végeztük. A glutation-peroxidáz enzim a lipid peroxidokat bontja, miközben a redukált glutation (GSH) oxidálódik (GSSG). A képződött GSSG-t a feleslegben alkalmazott glutation-reduktáz (GR) alakítja vissza GSH-vá, s a reakcióhoz NADPH-t használ  $H^+$  forrásként. Ez a NADPH fogyás követhető nyomon spektrofotometriásan, mint abszorbancia csökkenés.

### **Acetilcolin-észteráz**

Az AchE aktivitást *Blume et al. (1970)* szerint mértük meg. Az AchE enzim specifikus az acetilkolinra, azt acetátra és kolinra bontja. Aktivitását úgy határoztuk meg, hogy  $^{14}C$ -izotóppal jelzett acetilkolinnal inkubáltuk a sejthomogenizátumokat, ahol  $^{14}C$ -izotóppal jelzett acetát vált szabaddá az enzim hatására, mely negatív töltésű. A továbbiakban ioncserélő kromatográfias eljárással elválasztottuk a keletkezett acetátot a szubsztráttól, majd annak radioaktivitását „liquid scintillation counter”-ben (LSC) mértük meg.

### **Gangliozid-szialidáz**

Az enzim aktivitását *Lieser et al. (1989)* módszerét követve mértük meg. Az enzim a plazmamembránban lévő komplex gangliozidokat (GM3) bontja úgy, hogy a terminális szialsavakat lehasítja. A mérés során  $^3H$ -GM3-at, izotóppal jelzett szubsztrátot inkubáltunk mintáinkkal, melyből az enzim  $^3H$ -laktozilceramidot tett szabaddá. A továbbiakban ioncserélő kromatográfias eljárással elválasztottuk a keletkezett  $^3H$ -laktozilceramidot a szubsztráttól, és radioaktivitását szintén LSC számlálóban mértük meg.

### **Fehérje és DNS meghatározások**

A mintáink összes fehérje tartalmát spektrofotometriásan határoztuk meg a Lowry-féle módszer (*Lowry et al., 1951.*) alapján, Folin-reagens hozzáadásával.

Mintáink DNS tartalmát kétféleképpen határoztuk meg. Elsőként *West et al. (1985)*; valamint *Teixeira et al. (1995)* módszereit követtük. A Triton-X-100-zal kezelt sejthomogenizátum DNS tartalmát fluoreszcenciás szerrel határoztuk meg (Hoechst 33258). A DNS-t alkohollal kicsaptuk, majd EDTA-ban visszaoldottuk. Ez a módszer rendkívül pontos és nagy érzékenységű. Másodsorban *Bashford és Harris (1987)* módszerét próbáltuk ki. A DNS-t kicsapás nélkül, Hoechst 33258 fluoreszcens festék hozzáadásával, rövid inkubációs idő után mértük meg. Ez a mérés rendkívül gyors és egyszerű technika volt.

## 4. EREDMÉNYEK

### A PC-12 sejtvonalon végzett mérések eredményei

A PC-12 sejtvonalon az oxigénből származó reaktív részecskéket átalakító és elimináló enzimek aktivitásait mértük a kezeletlen, és a Fenton reakcióval (egyszer és ismételt) kezelt sejt kultúrákon. A mért paraméterek a SOD, a kataláz és a glutation-peroxidáz enzimek aktivitásai voltak. Megállapítottuk azokat a  $\text{Fe}^{2+}$  és  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentrációkat, melyeket együttesen alkalmazva, még nem toxikusak a sejtekre az egyszeri és az ismételt hozzáadás során sem, de a sejtproliferációt már meggátolják.  $100 \mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{Fe}^{2+}$ -ADP komplex formájában) és  $25 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  bizonyult a legmegfelelőbb koncentrációnak.

A SOD enzim ( $\mu\text{g}$  SOD/mg fehérje értékben kifejezett) aktivitása a kezeletlen PC-12 sejtekben  $4.29 \pm 0.259$  ( $\pm$  SEM) volt. Az első kezelés hatására ez egy kis mértékű, nem szignifikáns ( $p < 0.19$ ) emelkedést mutatott, értéke  $4.87 \pm 0.308$  lett. A második kezelés hatására viszont  $5.32 \pm 0.373$  értékre emelkedett a SOD aktivitása, ami a kontrollhoz képest szignifikáns különbség ( $p < 0.05$ ). A két kezelt (egyszeri és ismételt) kultúra enzimszintje között sem jelentős a különbség ( $p < 0.36$ ). Tehát a SOD enzim esetében egy lassú, fokozatos emelkedést tapasztaltunk a kezelésekek során, mely összesen egy 24%-os enzimaktivitásbeli emelkedést jelentett.

A kataláz enzim (unit kataláz/mg fehérje értékben kifejezett) aktivitása a kontroll PC-12 sejtekben  $14.89 \pm 0.209$  ( $\pm$  SEM) volt. Az enzim aktivitása már az első kezelés hatására jelentősen megemelkedett,  $21.81 \pm 0.765$  érték lett. Ez 46%-os emelkedésnek felelt meg ( $p < 0.001$ ). Az ismételt szabadgyök fluxus hatására ez az érték nem nőtt tovább, sőt kissé csökkent, ( $21.05 \pm 1.086$ ), bár a két kezelt kultúra kataláz aktivitás értéke egymáshoz képest nem mutatott szignifikáns különbséget ( $p < 0.65$ ).

A glutation-peroxidáz enzim (mmol NADPH fogyasztás/min/mg fehérje egységekben megadott) aktivitása a kezeletlen sejtekben  $0.50 \pm 0.029$  volt. Az első, majd a második kezelés hatására is jelentős emelkedést kaptunk.  $0.84 \pm 0.020$ , illetve  $1.28 \pm 0.058$  volt az aktivitás 1x48h és 2x48h inkubációk után ( $p < 0.001$ ). Az első kezelés 68%-os, a két kezelés együttesen 156%-os emelkedést eredményezett, ami igen magas, kiugró érték.

Mindhárom mért paraméter, a SOD, a kataláz és a glutation-peroxidáz enzim is, jelentős aktivitásbeli emelkedést mutatott az egyszeri és az ismételt szabadgyökös kezelésekek hatására.

### **Az SK-N-MC sejtvonalon végzett mérések eredményei**

Az SK-N-MC sejtvonalon differenciálódási marker enzimek aktivitásának emelkedését vizsgáltuk, szintén egyszeri és ismételt szabadgyökös kezelések, valamint BrdU hatására. A mért paraméterek az AchE és a GS enzimek aktivitásai voltak. A BrdU ismert differenciálószer az SK-N-MC és más neuroblasztóma sejteknek is (Mühl, 1992, 1996; Kopitz et al., 1994), így „pozitív kontrollként” értékelhettük az így kezelt sejt kultúrákat.

Először megállapítottuk azokat a  $\text{Fe}^{2+}$  és  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentrációkat, melyeket együttesen alkalmazva, még nem toxikusak a sejtekre az egyszeri és az ismételt hozzáadás során sem, de a sejtproliferációt már meggátolják.  $100 \mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  (Fe-ADP komplex formájában) és  $10 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  bizonyult a legmegfelelőbb koncentrációnak.

Az AchE enzim ( $\mu\text{U}$  AchE/mg fehérje értékben kifejezett) aktivitása  $50 \mu\text{M}$  BrdU alkalmazása esetén 4.5-szeresére emelkedett  $1 \times 72$  óra, ill. 6.4-szeresére  $2 \times 72$  h alatt, a hasonló ideig kultúrában tartott kontroll sejtek enzimértékeihez viszonyítva. A Fenton kezelés ( $100 \mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ ) 3.2-szeres emelkedést idézett elő az AchE aktivitásában  $1 \times 72$  h alatt, míg az ismételt kezelés már nem emelte tovább ezt az értéket. A vaskoncentráció csökkentésével ( $50$  és  $25 \mu\text{M}$  értékre), az enzim aktivitása is fokozatosan csökkent.

Úgy gondoltuk, hogy mivel a fehérjetartalom a differenciálódással párhuzamosan jelentősen megemelkedik, érdemes megvizsgálni az enzimaktivitásban mutatkozó változásokat  $\mu\text{g}$  DNS tartalomra vonatkoztatva is. Ezekből az eredményekből kitűnik, hogy kifejezettebb a különbség az enzim aktivitásában az  $1 \times 72$  h és  $2 \times 72$  h inkubációs idők között, mind a kontroll, mind pedig a BrdU és a Fenton kezelések esetében is. Igen szembetűnő a kontroll kultúrák esetében, hogy az enzim emelkedést mutat az  $1 \times 72$  h és  $2 \times 72$  h inkubációs idők között is, ami spontán differenciálódásra utal. Ez a különbség 40%-os, ha mg fehérjére és 80%-os, ha  $\mu\text{g}$  DNS-re vonatkoztatjuk az eredményeket. Fontos megjegyezni, hogy a spontán differenciálódás mértéke mindig jóval elmarad a kezelések hatásától.

A másik vizsgált differenciálódási marker a GS enzim volt. Az első kezelések után ( $72$  h) az enzim aktivitása 1.7-szeresére nőtt a szabadgyökökkel, és 1.9-szeresére a BrdU-val kezelt kultúrákban, a kontrollhoz képest ( $\mu\text{U}$  GS/mg fehérje értékekben megadva). A kezeléseket megismételve az enzim aktivitása csökkent a  $72$  órás értékekhez képest mind a  $\text{Fe}^{2+}$ , mind a BrdU-s kezelések esetében, csupán a kontroll kultúrákban tapasztaltunk kismértékű emelkedést.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

1. A kezeléseket illetően kísérleteink során megállapítottuk, hogy a Fenton reakcióval való kezelések egy igen szűk koncentrációtartományban végezhetők el, továbbá, hogy ezen a tartományon belül a gyökök által kiváltott hatások koncentrációfüggése figyelhető meg.

2. Mindezekből a mérésekből az is körvonalazódott, hogy a szabadgyökök differenciálódást indukáló hatását egyszeri megemelt gyökfluxus után érdemes leginkább tanulmányozni.

3. Igen érdekes számunkra annak felismerése, hogy az egyszeri (vagy ismételt), pillanatszerű kezelések hatására is, relatíve hosszú idő (egy hét) után is magasak maradtak a vizsgált enzimszintek.

4. Ugyanakkor azt is ki kell hangsúlyozni, hogy a szabadgyökös kezelések hatása mennyiségileg soha nem érte el a differenciálószeres hatását (kivétel a GS enzim, ahol igen), amit a kezeléseink nem specifikus voltaival is lehet magyarázni.

5. A PC-12 sejtvonalon megmért három enzim (SOD, kataláz és glutation-peroxidáz) együttesen megemelkedett szintjét úgy is értelmezhetjük, hogy a sejt önmagában (válaszként, a rövid, külső gyökhatásra) egy magasabb szintű gyöktermelést állít be, amit a kezeléseink után relatíve hosszú ideig fenntart. Szerintünk tehát a differenciálódás mindenképpen összekapcsolódik a szabadgyök termelés magasabb szintjével. Ezt konkrétan úgy kell érteni, hogy a SOD enzim megemelkedett aktivitásának következtében több  $H_2O_2$  keletkezik, aminek egy részét a kataláz és a glutation-peroxidáz elbontja ugyan, de mindemellett a Fenton reakció (mely a jelenlévő  $Fe^{2+}$  és a  $H_2O_2$  között igen gyorsan játszódik le) is több  $OH^\cdot$ -szabadgyök termelődését eredményezi. Úgy feltételezzük, hogy nagyobb mértékű oxigénfogyasztás is társul mindezekhez, amelyre vonatkozóan jelenleg folynak kísérletek.

6. Úgy gondoljuk tehát, hogy a fent nevezett enzimek megemelkedett aktivitása egy differenciáltabb állapothoz kapcsolódik.

7. Az SK-N-MC sejtekben az AchE enzim, mint differenciálódási marker szintjének jelentős megemelkedése kezeléseink hatására egyértelműen azt jelzi számunkra, hogy a szabadgyökös kezelés hatására a biokémiai paraméterek változási tendenciái a differenciált állapothoz lesznek hasonlóak. Az AchE a végső differenciált állapotban éri el legmagasabb szintjét, a gyökös kezelések esetében természetesen az enzim aktivitása mindig jóval a BrdU-val kezelt kultúra enzim szintje alatt maradt. Nagyon érdekes volt, hogy a második kezelés gyökfluxusa nem emelte tovább az enzim aktivitását, ami szintén azt a feltételezést erősíti meg, hogy a szabadgyökök differenciálódást indukáló hatását egyszeri, rövid ideig tartó kezelés után érdemes leginkább vizsgálni.

8. Az SK-N-MC sejtekben a másik differenciálódási marker, a GS enzim vizsgálata igen meglepő eredményt hozott, hiszen a kezeléseink elérték a teljesen differenciálódott sejtek enzimaktivitás szintjeit, tehát erre a paraméterre vonatkozóan a szabadgyökök ugyanazt a (mennyiségi) hatást váltották ki, mint a jól ismert differenciálószer, a BrdU. Ennél az enzimmél még inkább megmutatkozott, hogy a második kezelés már nem viszi tovább a sejteket a differenciálódás felé, sőt ez a paraméter az ismételt kezelések hatására csökkenést mutatott mindkét kezelés (szabadgyökök és BrdU) esetében.

9. Munkánk során a sejtek morfológiai megjelenését invert mikroszkóppal követtük mind a PC-12, mind az SK-N-MC sejteknél. A PC-12 sejtek esetében a kezelésekre hatására nem tapasztaltunk lényeges változásokat (mint nyúlványképződés például). Az SK-N-MC sejt kultúrák esetében lefényképeztük a tenyésztőedény aljára fixált sejteket. A kezelésekre végén (2x72h) a kontroll és a BrdU-val kezelt sejtek konfluensek voltak. Az inkubációs idő végére a „BrdU-s sejt kultúrák” transzparensabb és nagyobb sejteket tartalmaztak, mint a kontroll. A Fenton kezelés hatására nem alakult ki konfluens kultúra, a sejtek egyrésze a BrdU-s sejtekhez hasonlóan nagyobb méretű, transzparens és a kontrollhoz képest a nyúlványok megjelenése kifejezettebb. Ugyanakkor nukleáris kondenzáció figyelhető meg, ami a vastoxicitás következménye is lehet. A differenciálódás és a Fenton kezelésekre morfológiára történő hatását nem vizsgáltuk ennél részletesebben, vizsgálataink fő vonalát az előzőekben említett biokémiai paraméterek mérése képezte.

10. Összegezve tehát, mindkét vizsgált idegrendszeri eredetű sejt vonalon (PC-12, SK-N-MC) sikerült bizonyítani az oxigén eredetű szabadgyökök differenciálódást indukáló hatását, ezáltal feltett kérdésünket két, egymástól független kísérleti modellen is bizonyítottuk. Munkánk során sikerült mélyebb ismereteket szerezni az öregedési elméletekről, valamint az oxigén eredetű szabadgyökök biológiai, élettani szerepéről.

## 6. KÖZLEMÉNYEK ÉS ELŐADÁSOK

### Az értekezés anyagát leíró közlemények:

1. 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: 0.681)
2. Oravecz, K., Kalka, D., Jeney, F., Cantz, M., Zs.-Nagy, I. (2002): Hydroxyl free radicals induce cell differentiation in SK-N-McC neuroblastoma cells. Tissue and Cell, 34 (1), 33-38. (IF: 0.808)

### További közlemények:

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. Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Jeney, F., Nagy, K., Zs.-Nagy, I. (2000): On the useful role of OH<sup>·</sup> free radicals in differentiation of cultured human fibroblasts. Arch. Gerontol., Geriatr. 31, 233-242. (IF: 0.681)
5. 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: 0.867)

### Az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó előadás:

6. Oravecz, K., Jeney, F., Bazsó-Dombi, E., Zs.-Nagy I. (1998): A Fenton reakció által indukált oxigéneredetű szabadgyökök hatása a PC-12 neuroblasztóma sejtvonal differenciálódási sajátosságaira. Magyar Gerontológiai Társaság 1998. évi kongresszusa, Miskolc-Lillafüred, Palotaszálló, 1998. május 21-23.

### További előadások:

7. Bazsó-Dombi, E., Nagy, K., Jeney, F., Oravecz, K., Zs.-Nagy, I. (1998): A Fenton reakció által indukált hidroxil (OH<sup>·</sup>) szabadgyökök hatása a SOD és a kataláz enzimek génexpressziójára a sejtdifferenciálódás során. Magyar Gerontológiai Társaság 1998. évi kongresszusa, Miskolc-Lillafüred, Palotaszálló, 1998. május 21-23.
8. Jeney, F., Nagy, K., Oravecz, K., Bazsó-Dombi, E., Zs.-Nagy, I. (1998): Az oxigéneredetű szabadgyökök hatása a sejtdifferenciálódásra – in vitro. Magyar Gerontológiai Társaság 1998. évi kongresszusa, Miskolc-Lillafüred, Palotaszálló, 1998. május 21-23.

9. Jeney, F., Szabó, J., Nagy, K., Oravecz, K., Zs.-Nagy, I. (1997): The effect of OH<sup>·</sup> free radicals deriving from Fenton reaction on the growth characteristics of human retrobulbar fibroblast cultures. AESF Meeting, München, 1997. december 4-6.
10. Jeney, F., Szabó, J., Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Zs.-Nagy, I. (1998): The role of free radicals on the growth characteristics of human retrobulbar fibroblasts from EOP patients and normal individuals. 5. Leipziger Allerlei, Lipcse, 1998. október 1-3.
11. Jeney, F., Szabó, J., Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Zs.-Nagy, I. (1998): VI<sup>th</sup> International symposium on Graves' Ophthalmopathy, Amszterdam, 1998. november 27-28.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

### Az említés sorrendjében:

- Zs.-Nagy, I. (1994): *The Membrane Hypothesis of Aging*, CRC Press, Boca Raton.
- Harman, D. (1956): Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.*, 11, 298-300.
- Jones, M.D., Jr., Rosenberg, A.A., Simmons, M.A., Molteni, R.A., Koehler, R.C. and Traystman, R.J. (1982): Oxygen delivery to the brain before and after birth, *Science*, 216, 324-325.
- Grant, M.M., Koo, H.C. and Rosenfeld, W. (1992): Oxygen affects human endothelial cell proliferation by inactivation of fibroblast growth factors. *Am. J. Physiol.* 263, L370-L375.
- Absher, M., Makrides, W., Shapiro, P. and Evans, J.N. (1994): Hyperoxia inhibits proliferation of cultured rat tracheal smooth muscle cells, *Am. J. Physiol.*, 267, L101-105.
- Katoh, S., Mitsui, Y., Kitani, K. and Suzuki, T. (1997): Hyperoxia induces the differentiated neuronal phenotype of PC-12 cells by producing reactive oxygen species, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 241, 347-351.
- Nagy, K., Pásti, G., Bene, L. and Zs.-Nagy, I. (1993): Induction of granulocytic maturation of HL-60 human leukemia cells by free radicals: a hypothesis of cell differentiation involving hydroxyl radicals, *Free Rad. Res. Comm.*, 19, 1-15.
- Nagy, K., Pásti, G., Bene, L. and Zs.-Nagy, I. (1995): Involvement of Fenton reaction products in differentiation induction of K562 human leukemia cells, *Leukemia Res.*, 19, 203-212.
- Fenton, H.J.H. (1894): Oxidation of tartaric acid in presence of iron, *J. Chem. Soc.*, 65, 899-910.
- Flohé, L. and Ötting, F. (1984): Superoxide dismutase assays, *Meth. Enzymol.*, 105, 93-104.
- Gaunt, G. L. and De Duve, C. (1976): Subcellular distribution of D-amino acid oxidase and catalase in rat brain, *J. Neurochem.*, 26, 749-759.
- Flohé, L. and Günzler, W.A. (1984): Assays of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.*, 105, 93-104.
- Blume, A., Gilbert, F., Wilson, S., Farber, J., Rosenberg, R. and Nirenberg, M. (1970): Regulation of acetylcholinesterase in neuroblastoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67, 786-792.

- Lieser, M., Harms, E., Kern, H., Bach, G. and Cantz, M. (1989): Ganglioside GM3 sialidase activity in fibroblasts of normal individuals and of patients with sialidosis and mucopolidosis IV, *Biochem. J.*, 260, 69-74.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- West, D.C., Satar, A. and Kumar, S. (1985): A simplified in situ solubilisation procedure for the determination of DNA and cell number in tissue-cultured mammalian cells, *Anal. Biochem.*, 147, 289-295.
- Teixeira, C.C., Hatori, M, Leboy, P.S., Pacifici, M. and Shapiro, J.M. (1995): A Rapid and Ultrasensitive Method for Measurement of DNA, Calcium and Protein Content, and Alkaline Phosphatase Activity of Conrocyte Cultures, *Calcif. Tissue Int.*, 56, 252-256.
- Bashford, C.L. and Harris, D.A. (1987): *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry – a Practical Approach*, IRL Press Limited, Oxford, Washington DC, pp. 64-65.
- Mühl, C. (1992): Gangliosid GM3-Sialidasen menschlicher Neuroblastomzellen der Zelllinie SK-N-MC: Einfluss spezifischer inhibitoren auf Zellproliferation und Differenzierung. *Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Ruprecht-Karls-Universität*, Heidelberg, 1992.
- Mühl C. (1996): Einfluß der Hemmung der Ganglioside-Sialidase der Zelloberfläche auf Wachstum und Differenzierung kultivierter menschlicher Neuroblastomzellen, *Inaugural-dissertation zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr.sc.hum.) der Medizinischen Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität*, Heidelberg, 1996.
- Nagy, K. and Zs.-Nagy, I. (1984): Alterations in the molecular weight distribution of proteins in rat brain synaptosomes during aging and centrophenoxine treatment, *Mech. Ageing Dev.*, 28, 171-176.
- Kopitz, J., Von Reitzenstein, C., Mühl, C., Cantz, M. (1994): Role of plasma membrane ganglioside sialidase of human neuroblastoma cells in growth control and differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199, 1188-1193.