

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

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Írta:

Dr. Jeney Florence

Témavezető:

Prof. Dr. Zs.-Nagy Imre

Biol. tud. doktora

Debreceni Egyetem

Orvos- Egészségtudományi Centrum

Általános Orvosi Kar, Gerontológiai Tanszék

Debrecen, 2002

Tartalomjegyzék

Bevezetés	4.
Az öregedési elméletek rövid áttekintése	4.
1. Passzív folyamatokat feltételező öregedési elméletek	4.
2. Aktív szabályozást feltételező öregedési elméletek	11.
3. A teoretikus gerontológia megalapozása	14.
4. Az MHA rövid összefoglalása	15.
Az oxigéneredetű szabadgyökök tulajdonságai	19.
A szabadgyökök szerepének és funkciójának nem-ortodox felfogása	23.
Anyagok és módszerek	27.
Eredmények	43.
K562 sejtvonalon végzett vizsgálataink és azok eredményei	43.
Humán fibroblasztokkal és fibroblaszt típusú daganatos jel- legű sejtvonalakkal végzett kísérletek és azok eredményei.	53.
Sejt proliferációs vizsgálat Ki-67 proliferációs magantigén immunhisztokémiai kimutatásával.	59.
Fibroblasztok GAG produkciójának nyomonkövetése DMB hisztokémiával és spektrofotometriával	65.
Fibroblaszt-preadipocita átmenet vizsgálata	70.
Megbeszélés	82.
Összefoglalás	86.
Összefoglalás, angol nyelven	87.
Irodalomjegyzék	88.
Köszönetnyilvánítás	100.

Célkitűzések

1. Vizsgálataink során további bizonyítékokat kerestünk a $\text{OH}\cdot$ szabad-gyökök sejt differenciálódást 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 (kompaktságbeli) változásait.
4. Humán primér fibroblasztok tenyésztését terveztük retrobulbáris izom és zsír-szövetből, 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 képességének változását kívántuk hisztokémiaileg kimutatni és fotometriásan mérni.
7. EOP-os és kontrol sejteken a proliferációs aktivitás változását terveztük prezentálni immunhisztokémiával.
8. Végül a fibroblaszt-preadipocita-adipocita átmenet lehetőségét, és a szabad-gyököknek erre a differenciálódási folyamatra kifejtett hatását akartuk tisztázni primér sejt kultúrákon, 3T3 valamint L929 sejteken, a zsírákkumuláció kimutatásával.

Bevezetés

A. Az öregedési elméletek rövid áttekintése

Jóllehet az öregedés okai illetve a folyamat lassításának lehetősége régóta foglalkoztatja a kutatókat, a gerontológia mint szaktudomány viszonylag újkeletű. Ezt jelzi az a tény, hogy az első gerontológiai tudományos folyóiratot 1938-ban indította el Bürger és Abderhalden Németországban (Zeitschrift für Alternsforschung). Mint minden új területen, kezdetben számtalan teória született, melyek közül csak néhánynak a megalapozottságát sikerült később kísérletes úton igazolni. Még a ma általánosan ismert egyes koncepciók sem tekinthetők lezártak, mivel a tudomány fejlődése újabb és újabb lehetőséget teremt a részletek tisztázására. Példa erre Björkstén (1941, 1942, 1951, 1968) munkássága is, aki keresztkötdési elméletét többször is átdolgozta az újabb ismeretek birtokában.

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 rendszer lényegében csak felsorolást jelent (Pénzes et al., 1984), amelyben az öregedési elméleteket két nagy csoportra osztják:

(1) Elméletek, amelyek az öregedést az úgynevezett véletlenszerű, passzív hibafelhalmozódással magyarázzák.

(2) Elméletek, amelyek öregedési genetikai program létét tételezik fel, vagyis a folyamatot aktív módon irányítottak vélik.

Terjedelmi okokból nincs mód e helyen a vonatkozó irodalom részletes taglalására, ezért az alábbiakban csak röviden ismertetjük a főbb irányzatokat, s csak azokkal foglalkozunk részletesebben, amelyek jelen munka tartalmával kapcsolatban a legnagyobb relevanciával bírnak.

A.1. Passzív folyamatokat feltételező öregedési elméletek

Ezek lényegi feltevése, hogy szporadikus és sztochasztikus kémiai folyamatok eredményeként véletlenszerű károsodások lépnek fel, s ezek

összegződése révén alakulnak ki azok a funkciócsökkenések, amelyeknek halmozódása és fokozatosan egymásra épülő, önrontó hatása a felelős a szervezet öregedéséért illetve haláláért. Itt kell megjegyezni, hogy az öregedési folyamatot fenomenológiai szinten Strehler (1959) úgy definiálta, hogy az egy progresszív, destruktív, intrinsic és univerzális biológiai folyamat, s ezzel a definícióval (amelyet mind a mai napig általánosan elfogadnak a szakemberek) jól egyeztethető az öregedési elméletek ezen csoportja.

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. Az elmélet Björkstén (1941, 1942, 1951, 1968, 1969, 1977) nevéhez fűződik. Ezt a hatvan éves koncepciót ma már a kísérletes adatok tömege igazolja. Így megállapították, hogy olyan mutagének, amelyek keresztkötést létrehozó ágensek is egyben, sokkal inkább rövidítik az élettartamot, mint az olyanok amelyek nem vezetnek keresztkötések kialakulásához. Azt is megfigyelték (Chvapil és Hruza, 1959; Giles és Everitt, 1967) hogy a korlátozott kalóriabevitel a patkányfarok-inak kollagén rostjaiban a keresztkötések számát csökkenti, ugyanakkor az élettartam meghosszabbodását eredményezi. Akkori általános felfogás szerint az élettartam jelentősen függ a makromolekulák repair mechanizmusainak hatékonyságától, hiszen a kezdeti keresztkapcsolatok kialakulása és a helyreállító enzimekkel szemben létrejött szerikus akadályok elsősorban a celluláris repair rendszer hatásosságát veszélyeztetik. Keresztkötő ágensként szerepelhetnek: acetaldehid, alfa-ketoglutársav, citromsav, malonsav, fumársav, borostyánkősav, szervetlen 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 (lásd a részleteket: Zs.-Nagy és Floyd, 1984; Zs.-Nagy, 1989, 1994).

1.2. Szabadgyök elmélet

Denham Harman, akit a gerontológia ma is élő "nagy öregjei" közé sorolnak, kettős diplomával rendelkezik: az orvostudomány mellett szerves kémiát is tanult. Valószínűleg ennek köszönhető, hogy már egészen korán (Harman, 1956) felvette annak a lehetőségét, hogy az öregedés az oxigéneredetű szabadgyökök reakcióinak eredménye lehet. Pontosabban ezt úgy képzelte el, hogy a molekuláris oxigénből káros melléktermékként keletkező aktív gyökök sejtkárosító szerepet játszanak, s lényegében ezek eliminációja elvezethet az életkor meghosszabbításához (Harman, 1957). Mivel ez a koncepció, még ha módosításokra szorult is, mindmáig a legelterjedtebb és leghasznosabb öregedési elméletnek bizonyult (Harman, 1961a,b, 1968, 1981, 1988, 2001), továbbá jelen értekezés tárgya is szorosan kapcsolódik e felfogáshoz, a szabadgyökök keletkezését, kémiai természetét, szerepét az élő szervezetekben a későbbiekben részletesen fogjuk tárgyalni.

1.3. Diffúzió elmélet

Ezen elmélet kidolgozója, Carpenter (1965) feltételezte, hogy a keresztkötésekkel egybefűzött makromolekulák "szétterjedő" részecskékként szerepelnek az öregedés kiváltásában. Abból indult ki, hogy az öregedés alapvető oka a harántkapcsolatok létrejötte, és különböző matematikai modellek kidolgozásával a harántkötésekkel összekötött óriásmolekulák időtől függő felhalmozódását írta le. Arra a következtetésre jutott, hogy ezek a makromolekulák potenciálisan olyan szintig terjedhetnek, hogy az már a sejt normális funkcióit károsítja. Azt állította, hogy minél idősebb a szervezet, annál nagyobb a sejtekben az ilyen úton keletkezett makromolekulák száma, és hogy elhízott szervezetben a harántkapcsolatokkal egybefűzött molekulák sokkal gyorsabb ütemben halmozódnak fel. Könnyen belátható, hogy ez az elképzelés lényegében a keresztkötődési elmélet egy változatának tekinthető.

1.4. "Kollagén elmélet"

Ez a teória az ötvenes években alakult ki. Akkoriban a kollagén molekula szerkezetét, s annak kémiai vagy fizikai úton előidézett változásait sokan vizsgálták. Verzár (1955, 1956) végezte el az alapvető kísérleteket a kollagén hődenaturációjára vonatkozóan: A patkány farkából kihúzható inak csaknem tiszta

kollagénből állnak, s rajtuk igen pontosan vizsgálható az ún. termo-denaturáció jelensége. A kollagén rostok 64°C hőmérsékleten denaturálódnak, s ezt a folyamatot egy kifejezett kontrakció kíséri, amelynek során az inak eredeti hosszuknak mintegy 15-20 %-ára rövidülnek meg. A kontrakció során fellépő erő az állat életkorával növekszik, amit jól lehet mérni (Verzár, 1955). E jelenség magyarázatát Verzár (1955, 1956, 1958) adta meg. Kimutatta, hogy a fiatal állatból származó inakban a kollagén molekula kétharmada oldatba megy a hődenaturáció hatására, míg az öreg állatokból vett rostokból csak egyharmad rész oldódik. A kollagén molekula tripla helikális szerkezete már akkor ismert volt, továbbá azt is tudták, hogy a 64°C hőmérsékleten csakis hidrogén kötések bomol-hatnak fel. Ezen ismeretekből Verzár arra következtetett, hogy a fiatal kollagén molekulát stabilizáló H-hidak egy része, molekulánként kb 10 darab, az élet előre-haladtával kovalens keresztkötéssé alakul át, s ez okozza az öreg kollagén nagyobb mechanikai szilárdságát, nagyobb hőstabilitását, és a nagyobb erejű hőkontrakcióját is (Verzár, 1960; Piez, 1968).

A kollagén nemcsak hőhatásra, hanem erőteljes só-hatásokra is (pl. 40 %-os KJ oldatban) is elasztikus tulajdonságokat vesz fel, mivel a tömény sók hatására is elszakadnak a molekulát stabilizáló H-kötések (Banga et al., 1956a,b).

Meg kell itt jegyezni, hogy Verzár maga a kollagént egyszerűen egy molekuláris modellnek tekintette, s a fenti eredményekből csak arra következtetett, hogy az öregedés egy olyan folyamat, amely a makromolekulák szerkezetét változtatja meg. Ebből kiindulva már a hatvanas évek elején vizsgálatokat kezdett a kromatin állományának hőstabilitására vonatkozóan is, s 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 (Von Hahn és Verzár, 1963; Von Hahn, 1963, 1964, 1970). Mindennek ellenére, Verzár eredményei úgy kerültek be a köztudatba, mint az öregedés "kollagén elmélete", jóllehet maga Verzár élete végéig erősen tiltakozott ezen, szerinte túlszimplifikált definíció ellen (Zs.-Nagy, 1994).

1.5. Hiba-katasztrófa elmélet

Orgel (1963) szerint, az öregedés alapja a fehérjeszintézis pontosságának, megbízhatóságának a csökkenése. Mivel szerinte a fehérjeszintézis folyamatai pontatlanul mennek végbe, tökéletlen molekulák szaporodnak fel. A transzkripciót és translációt végző fehérjék megváltozása tartósabb, jelentősebb változásokat eredményez, mert az ilyen módosult fehérjemolekulák további hibákkal terhelt fehérjék képződéséhez vezetnek, s ily módon az újonnan szintetizálódott fehérjék hibagyakorisága már exponenciálisan emelkedik. Ez a „katasztrófa”. A hiba-katasztrófa elkerülhető, ha a hibás fehérjemolekulák gyorsabban bomlanak le mint a többiek (Goldschmidt, 1970). Holliday és Tarrant (1970) megállapította, hogy hibás molekulák olyan sejtekben is képződhetnek, melyek már kifejezetten pusztulófélben vannak. Ebből arra következtettek, hogy az ilyen hibás fehérjemolekulák felszaporodása nemcsak az öregedő sejtekben történik (Baird et al. 1975). Szépséghibája a hibakatasztrófa elméletnek, hogy elméleti megfontolások alapján maga Orgel (1970, 1973) visszavonta azt, de ez már senkit sem érdekelt, s mind a mai napig vannak követői ezen elméletnek. Mindemellett le kell szögezni azt a tényt, hogy szinte minden hitelt érdemlő kísérletből az derült ki, hogy nem „rossz” fehérjék szintetizálódnak, hanem a fehérjék poszt-transzlációs változásokon esnek át, ami működésüket kompromittálja, s ezért cserére szorulnak (lásd részletesen: Zs.-Nagy, 1994).

1.7. 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. Ezek a nélkülözhető DNS szakaszok csak akkor expresszáálódnak, ha a genom megfelelő működő része meghibásodik. A szerző szerint az egyes fajok élettartama az ismétlődő információs képletek számától függ. Ahogy a hibák a funkcionáló génekben felszaporodnak, az ismétlődő gén-tartalékok addig működnek, míg a készletekből erre lehetőség van. Ennek hiányában elindul az öregedés. Ez a logika lényegében a hibakatasztrófa elméletbe torkollik, s ahhoz hasonlóan nem is vezetett lényeges eredményekre.

1.8. Mutációs elmélet

Több szerző egymástól függetlenül arra a következtetésre jutott, hogy az öregedés a sejtek DNS-molekuláiban véletlenszerűen bekövetkező mutációk eredménye lehet vagy a szomatikus sejtekben, vagy az őssejtekben (Szilárd, 1959a,b; Curtis, 1963, 1964). A mutációk felhalmozódása hibákat indukál a kódolt információkban. Curtis et al. (1966) vizsgálataikkal azt találták, hogy a patkánymáj atipikus kromoszómáinak gyakorisága a korral növekszik. Arra a megállapításra jutottak, hogy azok a fajok melyeknek nagy a mutációs rátája rövid ideig élnek. Little (1976) szerint összefüggés van a DNS repair kapacitás és a celluláris öregedés között. Burnet (1976) rámutatott, hogy az öregedés egy intrinsic genotipusos folyamat eredménye, melyért a DNS-replikációt és a repairt elégtelenül végző enzimek a felelősek. A DNS-t kijavító enzimek meghibásodásra való hajlama azok genetikai hátterétől függ, ezért a DNS-repair evolúciós ellenőrzés alatt áll. Ugyanakkor ennek mértékét nagyban befolyásolják a szervezetet ért külső hatások, valamint a DNS kijavítás és a replikációs és transzkripciós enzimek hibahajlama. Mindezek alapján az öregedés oka a sejtekben felgyülemelő genetikai hibák gyakorisága lehet, ami lényegében egy alternatív megfogalmazása a hibakatasztrófa elméletnek.

1.9. Immunológiai elmélet

Walford (1969) szerint az öregedés nem más, mint a szervezet sejtjei között mindjobban kialakuló inkompatibilitás, melynek során a szervezetben a korral párhuzamosan egyre fokozódó ütemben auto-antitestek keletkeznek, s ennek következtében mindazok a szövetek károsodnak, amelyekkel szemben az említett fehérjék képződnek. Az öregedés tehát olyan folyamat lenne, amelyben a retikulo-endothelialis rendszer (RES) a szervezet saját fehérjéivel szemben egyre fokozódó intoleranciát mutat. Russell et al. (1966) majd Walford (1969) immunszuppresszorral kezeltek hosszú illetve rövid élettartamú egereket. Az állatok maximális élettartama ugyan nem változott, azonban számottevően nőtt azon egyedek száma, amelyek megérték a magasabb kort. Bellamy (1968) a prednisolon immunszuppresszív hatását vizsgálta rövid életű beltenyésztett egereken. Az állatok lassabban növekedtek, de az élettartam 50 %-kal

nőtt, melyet a szerző azzal magyaráz, hogy a rövid élettartam autoimmun hatás következménye és ezt a hatást függeszti fel a prednisolon. A szerző szerint az étvágycsökkenés is hozzájárult az élettartam növekedéshez. Forbes (1975) kísérletei is Bellamy (1968) elméleti megfontolásait támasztották alá. 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. Számos megfigyelés arra utal, hogy megnő az időkben a mortalitás kockázata, ha alacsony a lymphocyta és a CD4-sejtszám, csökkent a T-sejt proliferáció, magas a CD8/CD4-sejtarány, magas a CD8+ memória-sejtszám, alacsony a B-sejtszám, anergiás a kutánpróba, alacsony az NK-sejtszám, az IL-2 produkció és alacsony az indukált antitest titer (Miller, 1996; Pawelec és Solana, 1997).

1.11. Anyagcsere-sebesség elmélet

Pearl (1928) Drosophilakon folytatott kísérleteiből arra következtetett, hogy az élettartam fordítottan arányos az energia veszteséggel, illetve az anyagcsere sebességével. Alátámasztják ezt a felfogást azok a kísérletek, amelyeket táplálék megvonással kiváltott csökkent vagy az alacsony hőmérséklet hatásával előidézett nagy energiaforgalom nyomán figyeltek meg. Mc Cay et al. (1935), valamint később Berg (1976) rámutattak, hogy kalória-szegényen táplált patkányok hosszabb ideig élnek, mint a táplálékfelvételben nem korlátozott társaik. Johnson et al. (1963) azt tapasztalta, hogy ha az állatok energia produkcióját azzal fokozta, hogy sokáig alacsony hőmérsékleten tartotta őket, élettartamuk jelentősen csökkent. Arra megállapításra jutottak, hogy minél nagyobb a szervezet energiaforgalma annál gyorsabb az örege-dése. Levezethető elméletileg, hogy mivel az energia-forgalom szoros kapcsolatban áll az oxigénfogyasztással, ez az elképzelés lényegében összefügg az öregedés szabadgyök elméletével.

1.12. Stressz-elmélet

Ez a felfogás az egyik leggyakrabban emlegetett teória volt a hatvanas és a hetvenes években. Az elmélet Selye János munkássága révén vált ismertté (Selye, 1956; Selye és Prioreshi, 1960; Selye és Tuchweber, 1976). Lényege, hogy az élet során elszenvedett stresszek a szervezetben maradandó nyomot

hagynak, és ezek növekvő halmaza okozza az öregedést. Gunderson és Rache (1974) szerint a hosszú időn keresztül ismétlődő stresszes állapotok különösen veszélyeztetik a cardiovascularis-, az emésztő-, az immun- és az idegrendszert. Paré (1965), valamint Árvay (1976) a patkányfarok kollagén rostjainak az öregedéséért is a stresszt okolja. Selye és Tuchweber (1976) azt állítják, hogy az egyed élettartama egy késleltetett általános adaptációs szindrómának tekinthető. 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. Más szóval a szervezet öregedése minden külső hatás nélkül, feltétlenül végbemegy. Az öregedést specifikus gének irányítják, melyek mind az egyed öregedésének ütemét, mind a különböző fajok élettartamát meghatározzák.

2.1. Genetikai program elmélet

Régen ismert tény, hogy a különböző fajok élettartama genetikailag meghatározott, s ugyanúgy, mint a teljes egyedfejlődés minden fázisa, genetikailag determinált, vagyis minden létező faj mutat öregedést, ugyanakkor a fajok között igen nagy különbségek vannak az élettartam időskáláját tekintve (Strehler, 1959, 1960; Comfort, 1964; etc.). Korán megjelentek azok az elképzelések, hogy az öregedés nem a programozott halál feltétele, hanem a genetikai program meghibásodásának eredménye (Comfort, 1970). Von Hahn (1966) azt hangsúlyozta, hogy a celluláris öregedés irányítása a transzkripció során történik. Véleménye szerint a DNS szerkezet egyre kötöttebbé válik, a két DNS szál szétválásához szükséges energia nő, s mivel a szétválás a transzkripció feltétele, a folyamat gátlása egyben az átírást is blokkolja, ami a genetikai információ részleges elvesztésével jár.

Külön csoportot képez Hayflick (1965, 1970, 1973, 1975) öregedési program elmélete. Ezt arra a "megfigyelésére" alapozta, hogy az embrióból vett fibroblasztok sejtenyészetekben 50 osztódásra képesek, majd megöreg-szenek és bizonyos idő után elpusztulnak. Ugyanakkor, ha a fibroblasztokat felnőttből, vagy öregebb egyedekből vesszük, a "doubling number" lecsökken 20 körüli értékre. Jóllehet igen sokan elfogadták Hayflick elméletét, s mind a mai napig sok követője van, nem lehet figyelmen kívül hagyni azokat a kritikai hangokat, amelyek ugyancsak igen nagy számban megnyilvánultak. Már maga az ú.n. "limited doubling number" megfigyelés sem igaz, hiszen kiderült, hogy ez egy artefaktum, s lényegében a kísérleti körülményektől függ (Balin, 1982, 1985). Számos további részlet tisztázása is arra vezetett, hogy a Hayflick limit léte nem fogadható el hiteles öregedési elmélet alapjaként (részletek: Zs.-Nagy, 1994). Legújabbán Hayflick a telomer-óra alapján (lásd alább) próbálja igazolni elméletét, de ez a próbálkozás is számos sebből vérzik (Rubin, 2002). Tanszékünkön kiszámították, hogy ha elfogadjuk a Hayflick limit létezését (50 osztódás lehetősége) akkor az így nyerhető sejtszám a vérképzéshez szükséges sejtek számánál is sok ezerszer kevesebb az emberben átlagosan 75 éves élettartamra számítva, s akkor még hol vannak a többi szövetek (hám, izom, kötőszövet, stb) felépítéséhez és fenntartásához szükséges sejtek (publikálatlan adatok).

Mindezek ellenére létezik az öregedés replikatív szeneszenciának nevezett elmélete (Smith és Pereira-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-szuppresszor hatású jelenség; elvesztése daganatképződéshez vezet.

2.2. Neuroendokrin rendszerrel kapcsolatos elméletek

Van Gool és Mirmiran (1986), valamint Turek (1995) arra a következtetésre jutottak, hogy az öregedés időszakában a melatonin napszaki ritmusának eltűnése jelzi a ciklikus hormonális szabályozásban kulcsszerepet játszó nucleus supra-chiasmaticus (SCN) magterület funkciójának zavarát, melynek időskori degenerációját több morfológiai és biokémiai adat igazolja. Az öregedés korában

mutatkozó csökkent adaptációs készség, a bioritmusok szabályozásának zavara feltehetően összefügg a melatonin-szint napi ritmusában mutatkozó zavarokkal (Reiter, 1994). Dubovich (1991) is azt találta, hogy az öregedés folyamán csökkenő melatonin szint hatása a biológiai ritmusok deszinkronizációjában a központi idegrendszerben lokalizálható hatáshelyeken érvényesül, mint a membrán receptorokon kifejtett hatás. Az ontogenezis során a szervezet minden sejtje a melatonin szignál szerint programozott, vagyis az életkor előrehaladtával csökkenő melatonin szint feltehetően a szervezet minden sejtje számára szignált jelent az öregedés felé. A melatonin jelenléte központi idegrendszeri hatáshelyeken, receptorokon képes késleltetni az öregedéssel járó bioritmus szabályozási zavarok kialakulását (Reiter, 1995). Mindezzel kapcsolatban meg kell említeni, hogy más szerzők szerint itt inkább az öregedés következményeiről, mint okairól van szó.

2.3. Telomer-óra elmélet

Az elmúlt évtizedekben komoly érdeklődés támadt az eukarióta kromoszómavégek, a telomerek tulajdonságai és biológiai jelentősége iránt (Blackburn, 1994; Greider, 1996). Szemben a baktériumok cirkuláris DNS-ével, az eukarióta kromoszómák lineáris DNS-t tartalmaznak.

Ezen DNS molekulák két vége speciális szerkezetű, kiterjedt régió: nagyszámú, fajra jellemző bázisszekvenciájú, tandem módon ismétlődő rövid szakaszokból épül fel. Emberben a telomer-DNS ismétlődő egységei: TTAGGG, mely kromoszómavégenként mintegy 2000 példányban ismétlődik. Géneket nem tartalmaz, szerepe a kromoszómavégek védelme. Egyesek szerint minden sejtciklusban néhány bázispárral rövidül, míg mások ezt cáfolják (Rubin, 2002).

1985-ben felfedeztek egy enzimet a telomerázt, mely képes megakadályozni a telomerek fiziológias rövidülését (Greider, 1996, 1998). A telomer-óra elmélet feltételezi, hogy a sejt telomerjének rövidülésével méri életkorát, pontosabban azt, hogy élete során hány osztódáson esett keresztül. Sejtkultúrákban a telomeráz enzim expressziójával meghosszabbították a sejtek generációs idejét, de a sejtek proliferációs képessége és a telomeráz között nincs mindig szoros kapcsolat, vagyis, ezek a megfigyelések nem elsősorban az öregedés, inkább a daganat kutatás területén hozhatnak eredményeket, mivel az emberi daganatok 85 %-ában kimutatható telomeráz aktivitást mutatnak, mely a tumorprogresszió során rossz

prognosztikai jel, és a malignitás fokozódását jelzi. E terület jelenleg intenzív kutatások tárgyát képezi, s az elképzeléseket jelentős viták kísérik (Campisi et al., 2001; Hao and Tan, 2001; Rubin, 2002).

A.3. A teoretikus gerontológia megalapozása

Már a fentiekből is kitűnik, hogy minden gerontológiai kutatás eredményességének alapfeltétele olyan egységes gerontológiai elmélet felállítása, amelynek birtokában az ismert tények logikus rendszerbe foglalhatók. Az elmélettel szemben továbbá követelmény, hogy benne a tények ne kerüljenek egymással lényegi ellentmondásba. Ha sikerül ilyen elméletet felállítani, annak alapján tézisek fogalmazhatók meg, ezeket megfelelő kísérleti ellenőrzésnek vethetjük alá, s a kapott eredmények alapján az elméletet megerősíthetjük, vagy cáfolhatjuk.

Ilyen típusú elméleti gerontológiai alapvetés jelent meg Esposito tollából (1983). Ez mindennek előtt rendszerezni próbálta az öregedési elméleteket, azokat három csoportba osztotta: (1) kauzális elméletek, (2) szisztematikus elméletek és (3) evolúciós elméletek. Ezek a csoportok magukba foglalják mindazokat az elképzeléseket, amelyeket a fentiekben is felvázoltunk, de a korábbi elméletekhez képest jelentősen szélesebb elméleti alapokat használnak az öregedési jelenségek értelmezhetősége számára. S ami még ennél is fontosabb, Esposito (1983) modellje nemcsak rendszerezi a jelenségeket és elméleteket, hanem megfogalmazta a teoretikus gerontológia alapvető kérdéseit is, amelyeket a kísérleti gerontológiának meg kell válaszolnia. Ezek részletezése nem fér bele a jelen munka terjedelmébe, ezért csak utalunk arra, hogy Tanszékünk 1973 óta folytatott munkássága és publikációi széles alapokon megegyeztek ezen megközelítés elveivel, azt alkalmazták, fejlesztették tovább, s a teoretikus gerontológia Esposito (1983) által megfogalmazott kérdéseire is megadták a lehetséges válaszokat. E munka eredménye az öregedés membránhipotézisének (angolul membrane hypothesis of aging = MHA) kialakulása, amely ma a nemzetközi irodalomban is jól ismert (Zs.-Nagy, 1978, 1979, 1987, 1988, 1994, 1997, 2000, 2001).

A.4. Az MHA rövid összefoglalása

Az MHA lényegi összefüggéseit az 1. ábra mutatja be. Az MHA abból indul ki, hogy az élő szervezetek valamennyi alkotórészének folyamatos újratermelődését azok folyamatos károsodása teszi szükségessé. A biokémia alapvető szabályai szerint a károsodások nem származhatnak pl. az enzimek működéséből, hiszen az enzimek a katalizált folyamatokból köztudottan minden változás nélkül kerülnek ki. 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. E folyamatok közül a második (lizoszomális rendszer) és a harmadik (fehérjeszintetikus apparátus) igen sok részlete ismert, de sok a bizonytalanság az első helyen említett károsító tényezők vonatkozásában.

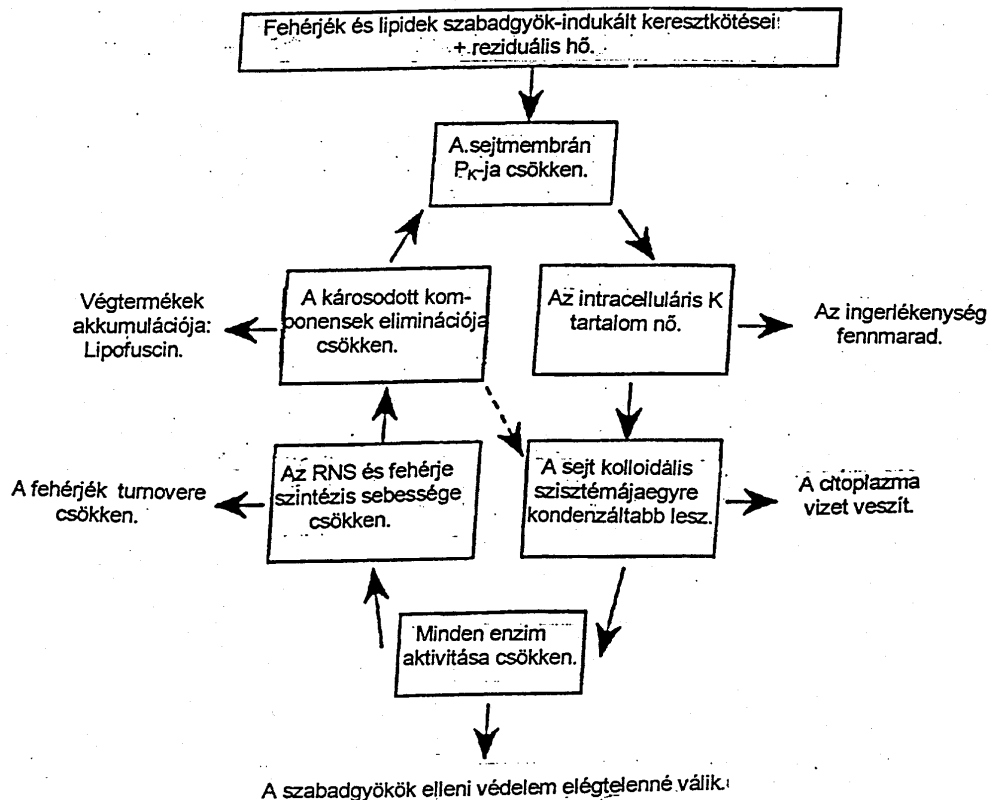
Az MHA elfogadja, hogy a legfontosabb károsító tényezők az oxigéneredetű szabadgyökök között keresendők, s ebben a vonatkozásban felhasználja az öregedés szabadgyök teóriáját (Harman, 1956, 1981, 2001). Mivel azonban ezen szabadgyökök polimerizáló, keresztkötő hatásait döntően befolyásolja a struktúra denzitása (lásd alább részletesen kifejtve), az MHA szerint a szabadgyökök okozta ártalom nagyobb valószínűséggel lép fel a tömöttebb szerkezetű sejtal-katréseken, például a membránokon,.

Figyelembe kell venni továbbá azt a tényt, hogy a membránok között is kitüntetett szerepet játszik a sejt külső membránja (plazmamembrán), mivel azon jelentős elektromos polaritás (-40 és -100 mV közötti ún. nyugalmi potenciál) épül fel. Minden ingerületi állapotváltozás e polaritás meredek "letörésével" jár, amikor is a plazmamembrán úgy viselkedik, mint egy kondenzátor, vagyis kisülésekor jelentős hőfejlődés lép fel. Mivel pedig a depolarizáció mindössze 1-2 msec alatt megy végbe, a keletkezett hő egy jelentős része (minimálisan kb 10 %-a) nem tud disszipálódni a rendszerből, vagyis a membránban marad. Ezt a hőmennyiséget "reziduális hő"-nek nevezték el (Ritchie, 1973), ami praktikusán hiányzik, illetve elhanyagolhatóan kicsi más, intracelluláris membrán komponenseknél. A reziduális hő legvalószínűbben kovalens kémiai kötések formájában maradhat a plazma-membránban. Ezek a kovalens kötések lehetnek azon további faktorok, amelyek a sejtmembrán fehérjeinek rövid életéhez hozzájárulnak, különösen

jelentős mértékben az erősen ingerlékeny struktúrákban, úgymint a neuronok és az izomsejtek plazmamembránja.

E kérdéskör további részletei kifejtésre kerültek már korábban (Zs.-Nagy, 1979, 1994), itt csupán azt kívánjuk kihangsúlyozni, hogy ezen megfontolások alapján az MHA a sejtek legsérülékenyebb szerkezeti elemének a plazmamembránt tekinti. Ez a felfogás jó összhangban van számos kísérleti ténnyel, amelyek szerint a sejtfehérjék közül a plazmamembrán fehérjéinek van a legrövidebb fél-életideje (Tauber és Reutter, 1981, etc), vagyis turnoverük kb. 4-6-szor gyorsabb pl. a májsejtekben, mint a máj összes többi fehérjei esetében.

A fentebb vázolt felfogás, miszerint valamennyi sejtkomponens között a plazmamembrán károsodik a leggyorsabban, további logikai lépéseket diktál. Ezeket vázolja fel az MHA egy ciklusos folyamat formájában (1. ábra).



1. ábra. Az MHA sémás összefoglalása Zs.-Nagy (1994) alapján.

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 sejtkolloidok kondenzációját (aggregációját), s ezzel az intermolekuláris keresztkötések képződésének valószínűségét is. Ennek következtében a sejtkolloidok egyre nagyobb, aggregált partikulákat képeznek, aminek egyenes következménye az intracelluláris kolloid ozmótikus nyomás csökkenése, ami a legfontosabb vízmegtartó erő a sejtekben, tehát a sejten belüli állomány vizet veszít. A dehidráció következménye az, hogy a relatív szárazanyag tartalom növekszik a sejtekben.

Meg kell itt jegyezni, hogy 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 sejtnak, az optimális maturáció elérése után ez a dehidrációs trend nem áll meg, sőt fokozatosan felgyorsul, s végül funkcióvesztéshez vezet, ami már az öregedési folyamat része. Ezen felfogás szerint nincs semmilyen speciális öregedési folyamat, csupán az ontogenezist szabályozó automatizmusnak az optimális funkcióképesség elérése utáni megállíthatatlan további működéséről van szó, ami végül az öregedési folyamat progresszív, destruktív, intrinsic és univerzális jellegét eredményezi (Strehler, 1959).

Természetesen magyarázatra szorul, hogy a megnövekedett sejten belüli denzitás hogyan képes előidézni a funkcióvesztési jelenségeket. Ehhez a kulcsot a molekuláris enzimkinetikai modellek adják meg, amelyek szerint a környezet denzitás-növekedésével minden enzimaktivitás (aktivitás/mol enzim egységben kifejezve) fordítottan arányos (Damjanovich és Somogyi, 1973; Somogyi és Damjanovich, 1975; Damjanovich et al. 1989). Az elméleti megfontolásokat igen sok kísérleti eredmény támasztja alá (Zs.-Nagy és Floyd, 1991; Zs.-Nagy, 2001). Kiszámítható volt, hogy az in vivo agykérgi idegsejtekben mérhető víztartalom csökkenés következménye egy nagyságrenddel lehet képes csökkenteni az enzimaktivitásokat (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. Másszóval, a fehérjeszintézis, vagy ha tetszik, a génexpresszió lassulása az ontogenezis második szakaszában is egyértelműen magyarázható az intracelluláris denzitásnövekedés hatásával. Ezzel párhuzamosan csökken a lizoszómák által végzett eliminációs, leépítési folya-matok gyorsasága is, ami az ún. öregedési pigmentek felhalmozódásához vezet (Zs.-Nagy, 1988, 2002). Mindezen folyamatok elegendő magyarázatot szolgál-tatnak minden sejt- és szövetfunkció korfüggő hanyatlására, anélkül, hogy az ismert tényekkel ellentmondásba kerülnénk.

Le kell itt szögezni, hogy az MHA fentvázolt ciklusát minden ponton többoldalú, egymástól független kísérleti bizonyítékok támasztották alá az elmúlt 25 év során. Az esetleg érdeklődő olvasó számára jó összefoglalást jelenthet az MHA-ról megjelent monográfia (Zs.-Nagy, 1994), de számos más későbbi közlemény is (Zs.-Nagy, 1997, 2000, 2001, 2002). Az MHA lényegi megállapításait a molekuláris genetika legújabb eredményei is alátámasztják: nagy jelentőségűnek tartható az a tény, hogy a sejtciklus szabályozásában fontos celluláris onkogének termékeinek nagy többsége a plazmamembránra lokalizálódik, jelezve a plazmamembrán központi szerepét a mitotikus regulá-cióban, a sejtek differenciálódásában és az öregedésben.

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. Erre nézve Tanszékünkön jelentősnek tartott, koncepcionálisan új gondolatok és lehetőségek fogalmazódtak meg, amelyek nagy visszhangot váltottak ki világszerte (Zs.-Nagy, 1992, 1995, 2001). 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. Ezért, mintegy kiindulási pontként, az alábbiakban összefoglaljuk az oxigéneredetű szabadgyökökről rendelkezésünkre álló legfontosabb ismereteket.

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 kémiaailag erősen reaktívak és ennek megfelelően, rövid az élettartamuk (Pryor, 1976).

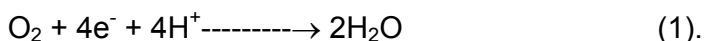
A fenti definíció alapján a gyököket csoportosítani lehet bizonyos kritériumok alapján. Például, nagyság szerint a legegyszerűbb gyök a szolvatált elektron (e^-), de lehetnek egyatomos vagy többatomos szabadgyökök, ionok, de akár óriásmolekulák is viselkedhetnek szabadgyökként. A kettős szabadgyök (biradikál) egy olyan kémiai anyag, amely két párosítatlan elektront tartalmaz külső orbitáljain, pl. a molekuláris oxigén. A gyökion egy pozitív vagy negatív töltésű szabadgyök pl.: O_2^- (szuperoxid aniongyök).

A szabadgyök által indukált reakciók általában láncreakciók. Ezekben a láncreakciókban a gyökök az iniciációnak nevezett lépcső vagy lépcsők során keletkeznek (amikor is elektron felvétel vagy leadás történik valamilyen okból), azután az ún. propogációs lépcsők sorozatán keresztül a párosítatlan spinű elektron megtalálja a párját, s ezáltal a gyök állapot megszűnik.

Nem kétséges, hogy a biológiai rendszerekben előforduló szabadgyökök között kitüntetett helyet foglalnak el az oxigéneredetű szabadgyökök, amelyeket angolul "reactive oxygen species" névvel is illetnek (rövidítve ROS). Az oxigén rendszáma 8, ami azt jelenti, hogy 8 protonja összesen 8 elektron negatív töltését képes semlegesíteni. Mivel azonban a belső (L) és a külső (K) elektronhéjakon $2+8 = 10$ elektron helyezkedhet el, az oxigén atomos állapotban nem tud létezni. A K elektronhéjon lévő 2 üres helyet "kölcsonvett" elektronokkal tölti fel minden oxigén atom, aminek legkézenfekvőbb forrása, már csak szimmetria okokból is, egy szomszédos másik oxigén atom. Az elektronok sajátos "kölcsonzése" úgy megy végbe, hogy kétatomos oxigén molekulák (O_2) jönnek létre, amelyekben 2-2 pár elektron az időben megosztva lényegében mindkét atom körül kering. Ezeket

az elektronpárokat nevezzük "vegyérték" elektronoknak. Teljesen hasonló módon keletkeznek a többi kétatómos formában létező gázmolekulák is (H_2 , N_2 , stb). Különleges formája az oxigén állapotának az ózon, amelyben 3 oxigén atom vesz részt, egymást 1-1-1 elektronpárral tartva kötésben.

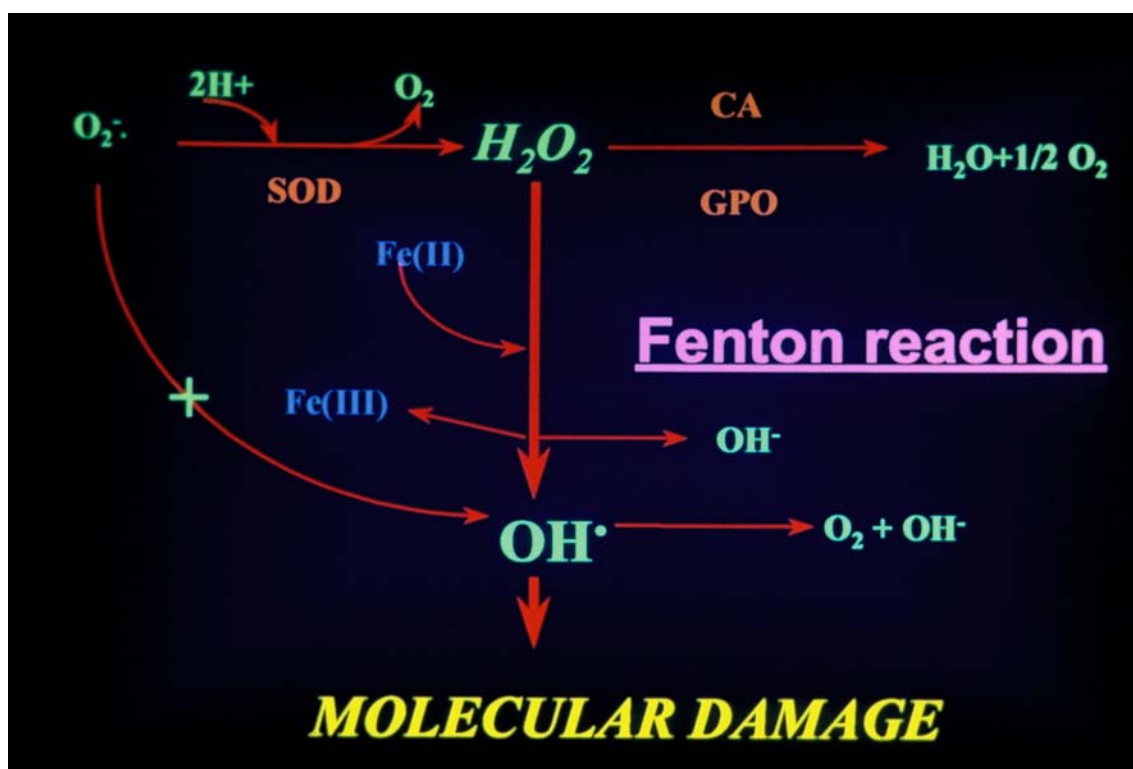
A kétatómos oxigén molekulák relatíve stabilak, emiatt az oxigén alapállapotában csak gyenge oxidáns. Ahhoz, hogy az O_2 -t a biológiai rendszerek energia-termelésre tudják felhasználni, azt aktiválni kell, amely folyamat az intermediér anyagcsere rendkívül fontos mozzanata. Ez az O_2 redukcióját jelenti, amikor a molekula négy elektront vesz fel, vagyis mindkét atomja önállóan hozzájut a lehetséges 10-10 elektronjához. Ezt a tetraavalens redukciót egyetlen lépésben csak a citokróm-oxidáz képes végrehajtani a mitokondriális elektrontranszport lánc végén, s az aktiválódott két oxigén atom képesé válik 4 proton megkötésére, vagyis víz keletkezik belőle (1).



A víz keletkezése során még soha nem sikerült szabadgyökös állapotú oxigént detektálni, ezért elfogadott, hogy a H_2 biológiai elégetése gyökmentes folyamat. Mindemellett a sejtekben vannak olyan reakciók is, amelyekben a redukció nem tetraavalens, s amelyekből ezért részlegesen redukált O_2 -származékok keletkeznek. Monoavalens redukcióra képes egy sor lizoszómális enzim, mint a citokróm P-450 család tagjai, xantin oxidáz, aldehid oxidázok, stb (Fridovich, 1976; Forman és Boveris, 1982; Jamieson et al., 1986; Cadenas, 1989). Kvantitatively mégis legfontosabb helye a monoavalens redukciónak az ubiquinon, amely a mitokondriális elektrontranszport lánc elején helyezkedik el, s a folyamatos kinon-szemikinon-hidrokinon oszcillációk során igen nagy mennyiségben termel szuperoxid-anion ($O_2^{\cdot-}$) szabadgyököket (Mishra és Fridovich, 1972; Boveris et al., 1976; Turrens és Boveris, 1980, etc.). Ma már tudjuk, hogy az elhasznált oxigénnek kb a 8-10 %-a $O_2^{\cdot-}$ szabadgyökké alakul át (Halliwell and Gutteridge, 1985). Meg kell itt jegyezni, hogy a $O_2^{\cdot-}$ szabadgyökök csak igen rövid ideig képesek létezni, mivel a felesleges elektronjukat spontán módon képesek egymásnak átadni, vagyis kölcsönösen tovább redukálják egymást. Ezt a folyamatot dizmutációnak nevezik a kémiában, aminek a terméke egy kétvegyértékű oxigén molekula, vagyis $-O_2-$, ami természetesen azonnal protonokat fog megkötni, vagyis H_2O_2 jön létre.

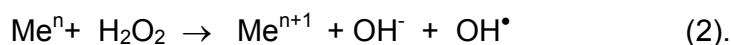
Általános felfogás szerint a $O_2^{\cdot-}$ szabadgyök egy káros oxidatív melléktermék, amelynek az eliminációjára hivatott a szuperoxid dizmutáz (SOD) nevű enzim, amelyet McCord és Fridovich (1969a,b) fedeztek fel a korábban hemokupreinnek nevezett fehérjék csoportjában. Mára SOD enzimek több típusa vált ismertté, amelyekben különféle fématomok találhatók az enzim aktív helyén, s nevüket is erről kapják (Mn-SOD, Fe-SOD, CuZn-SOD), de a funkciójuk mindenütt azonos. A SOD hatására a spontán dizmutációs folyamat kb 4 nagyságrenddel felgyorsul, ezért a SOD-ot antioxidáns védő enzimnek tekintik az irodalomban. Ennek a felfogásnak számos tény mond ellent (Zs.-Nagy, 1992, 1995, 1997, 2001), amelyeket itt nem részletezünk, de egy fontos alapvető problémára rá kell mutatnunk. Nevezetesen, ezt a gyököt tévesen tartják oxidatív jellegűnek, hiszen ez egy elektron-donor, s mint ilyen redukzív hatása van, a megtévesztő név ellenére. Ebből kifolyólag terminológiai hiba az is, hogy a SOD enzimet szinte mindenki "antioxidánsként" emlegeti, holott ez lényegében antireduktáns (vagy pro-oxidáns), hiszen egy redukzív szer eliminációját végzi, s reakciójának terméke a hidrogént oxidálja.

A 2. ábra foglalja össze, amit a fentebb vázolt reakcióról, illetve a keletkezett H_2O_2 további sorsáról tudunk. A H_2O_2 minden élő sejtben és szövetben folyamatosan keletkezik, s mivel a vízzel ellentétben, ez egy apoláros vegyület, szabadon képes diffundálni a sejteken keresztül az intra- és extracelluláris vízben. Önmagában ugyan kevésbé veszélyes komponens, mégis a szövetekben létezik két enzim, a kataláz (CA) és a glutathion-peroxidáz (GPO), amelyek a szabad, illetve a kötött peroxidokat képesek visszalakítani vízzé és molekuláris oxigénné. Ezen enzimek csökkentik ugyan a H_2O_2 szöveti koncentrációját, de nem képesek azt teljesen eliminálni két okból (lásd részletesen: Zs.-Nagy, 1994, 1997). (1) A CA nagyon változó aktivitással van jelen a szövetekben, pl. a máj csaknem 200-szor több CA aktivitást mutat, mint az agykéreg, ugyanakkor a CA viszonylag magas K_m értéke miatt (Goldstein, 1968), valamennyi H_2O_2 megmaradásával a legmagasabb CA aktivitás mellett is számolni kell. (2) GPO ugyan jelen van jelentős aktivitással az agyban is, ez viszont csakis a már megkötött H_2O_2 -ot (pl. lipidperoxidokat) képes elbontani, de ezeket sem korlátlanul, mivel működéséhez glutathionra van szüksége, ez pedig igen nagyszámú enzimnek kofaktora, vagyis korlátlanul nem áll rendelkezésre mindig és mindenütt.



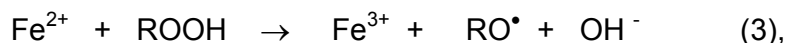
2. ábra. Az oxigéneredetű szabadgyökök keletkezési sémája és egymással való összefüggései.

Mindezek alapján a maradék H_2O_2 a legnagyobb valószínűséggel Fenton reakcióban vehet részt (2. ábra). Ennek lényege, hogy tranziens fémionokkal (leginkább Fe^{2+} -vel, de lehet réz, mangán stb ion is) találkozáskor a fémtől (Me^n) egy elektront kap, aminek következtében a H_2O_2 molekula heterolízist szenved a (2) egyenlet szerint, 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 (Walling, 1975). Divalens vas mindig elegendő mennyiségben áll rendelkezésre a Fenton reakcióhoz, feltéve, hogy a sejtek C-vitamin tartalma normális (Floyd és Lewis, 1983).

Az élő szervezetben a H_2O_2 -ot a Fenton reakcióban organikus hidroperoxid (ROOH) is helyettesítheti a (3) egyenlet szerint:



amikor alkoxigyökök ($\text{RO}^\bullet$) keletkeznek, amely csak alig valamivel kevésbé reaktív, mint a $\text{OH}^\bullet$ szabadgyökök. Az alkoxigyököknek az a tulajdonsága, hogy a hiányzó ellentett spinű elektront nagyon gyorsan beszerzi a legkönnyebben elérhető helyről, vagy a meglévő páratlan spinű elektronját leadja a környezetében lévő elektronfelvételre képes komponenseknek.

A legkorábban felismert biológiai jelentőségű szabadgyök-ártalom a lipidek zsírsavjainak peroxidációja volt (Chio és Tappel, 1969a,b; Chio et al., 1969; Tappel, 1980; Donato and Sohal, 1981). Ma már ismert azonban, hogy a lehetséges szabadgyök ártalomnak ez csak egy kis részét teheti ki. Arról van szó, hogy mivel a $\text{OH}^\bullet$ gyökök a vizes fázisban keletkeznek, nagy többségük gyakorlatilag a vízdékony komponensekkel (fehérjék, nukleinsavak, cukrok, stb) sokkal előbb reakcióba lép, mint a viszonylag távol lévő, hidrofób fázisban elhelyezkedő zsírsavak (Zs.-Nagy és Nagy, 1980; Zs.-Nagy és Floyd, 1984, etc.).

A nyolcvanas évek elejétől kezdődött annak a felismerése, hogy a Fenton reakció révén keletkező $\text{OH}^\bullet$ gyökök igen jelentős hatásokat fejtenek ki mind a fehérjékre, mind az aminosavakra, mind a nukleinsavakra, stb (Zs.-Nagy és Nagy, 1980; Levine, 1983a,b; Floyd és Zs.-Nagy, 1984; Zs.-Nagy és Floyd, 1984; Fulks és Stadtman, 1985; Stadtman, 1986; etc.). 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

Ma már el lehet határolni a szabadgyökök szerepének két alapvető felfogását. Az első Denham Harman nevéhez fűződik, aki 1956-tól kezdve vetette fel, s mind a mai napig fenntartja azon felvetését, 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. A 60-as és 70-es évek során, amikor ez a felfogás elterjedt, a műszeres analitika "fejlettsége" csak korlátozott lehetőséget kínált a megfelelő kísérletek elvégzéséhez. Így azok a

kísérletek kerültek előtérbe, melyek a szabadgyökök hatásáról indirekt bizonyítékot szolgáltatottak, vagyis az antioxidánsok szerepét vizsgálták élő szervezeteken.

Harman (1956, 1962, 1968) a cisztein, ciszteamin, C-vitamin és 2-mer-kapto-
etanol közepes élettartamot prolongáló hatását vizsgálta, melyek közül az utóbbi bizonyult a leghatásosabbnak. Comfort et al. (1971) etoxikvinnel egereken folytatott vizsgálataikban hasonló szignifikáns közepes élettartam hosszabbodást tapasztaltak. Fontos megjegyezni, hogy egyik antioxidáns sem növelte azonban az állatok maximális élettartamát. Kohn (1971) megismételte a Harman kísérleteit és bár nem tapasztalt élettartam hosszabbodást, életminőség javulást azonban igen. Czapsky (1971) és Goscin (1973) kimutatták, hogy a hidroxilgyök elsősorban a lizoszóma-membránokat és lipideket károsítja. Lucy (1972) feltevése szerint az E-vitamin a membránok foszfolipideiben az arachidonsav molekulával stabil komplexet képez, s e helyen megakadályozza a sokszorosán telítetlen zsírsavak oxidatív károsodását (peroxidációját).

Számos további kísérleti eredmény is amellett szól, hogy a ROS valóban képes molekuláris károsodásokat okozni, s ezáltal az élő rendszerek fokozatos destrukcióját előidézni. Kiemelkedő fontosságúak a C és E vitaminnal végzett kísérletek. Előbbi egy erős redukálószer, instabil és könnyen elveszti hidrogén-atomjait. Részben láncmegszakító antioxidáns. A peroxigyökkel reagálva stabil monodehidro-aszkorbát keletkezik belőle, egyik hidrogénjének leadása után. Ezen kívül direkt $O_2^{\cdot -}$ szabadgyök illetve $OH^{\cdot}$ szabadgyök scavenger hatása is van, amely reakciók során monodehidro-aszkorbát illetve dehidro-aszkorbinsav keveréke keletkezik belőle, 2 hidrogén atom leadása után (Porter, 1980; Dormándy, 1983). Ezenkívül képes az oxidált glutathiont redukálni, így a sejt redox homeosztázisában a legfontosabbnak tartott antioxidáns, a redukált glutathion koncentrációját képes emelni (Niki, 1983).

Az E-vitamin a fő lipidfázisú antioxidáns. A hidroperoxidoknak hidrogént ad át, így ezek képződését megakadályozza, így ezáltal a láncreakciót megszakítva meggátolja a patológiás szabadgyökreakciók terjedését. (Folkers, 1973).

Természetes antioxidáns az A-vitamin, a K-vitamin, a glukóz (Sagone et al. 1983), a szelén- és tioltartalmú vegyületek, mint amilyen a cisztein, ciszteamin, glutathion (Frank, 1980) methionin, ubikinon, urát (Freeman et al., 1982; Hornsby, 1983; Smith, 1983).

A fenti példák korántsem képezik az ismert eredmények teljes listáját, csupán rámutatnak arra, hogy a kérdéssel igen kiterjedt irodalom foglalkozik. Van azonban az orthodox felfogásnak néhány alapvetően gyenge pontja, amelyeket nem lehetett figyelmen kívül hagyni. Nevezetesen, régen ismert tény, hogy a leghatékonyabb scavengere a ROS-nak a KCN, ami tökéletesen leállítja a ROS keletkezését, de nemcsak hogy nem hosszabbítja meg az életet, hanem az egyik legtoxikusabb anyag, amit valaha is ismertünk a biológiában. Ezt a toxicitást sokan úgy próbálják magyarázni, hogy a KCN energihiányt idéz elő, s ezért halálos. Ez azonban így nem igaz, mert abban az első másodpercben, amikor a KCN megöli az állatot, az agyban mérhető energia-rezerv (ATP, ADP, kreatinin-foszfát) még legalább 15-20 percre elegendő lenne az élő állapot fenntartására (Zs.-Nagy, 1992, 1995, 2001), az élet azonban késedelem nélkül megszűnik. A vízbefúló embernél a halál mintegy 3 perc alatt áll be, ugyancsak még mindig jelentős energiatartalékok megléte mellett. Mindez akkor válik világossá, ha feltételezzük, hogy az élő állapot fenntartásához impliciten szükség van a $\text{OH}^\bullet$ szabadgyökök folyamatos termelődésére, s ezt kapcsolja ki a KCN, mivel legelső hatásaként közvetlenül blokkolja az oxigén átvitelét a hemoglobintól a szövetek felé, vagyis megszakítja a gyökfluxust. Ugyanez megy végbe a vízbefúlás esetén is azzal a különbséggel, hogy a hemoglobin oxigéntartalékainak a teljes kimerülése 2-3 percet is igénybe vehet. Ebben a nem-orthodox felfogásban az foglaltatik benne, hogy 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 csere azonban egy sor fizikokémiai okból nem lehet tökéletes, így hibák halmozódnak fel elsősorban a legnagyobb turnover sebességet mutató alkatrészekben, mint a plazma membrán, ami aztán meg tud határozni egy sor folyamatot a sejtek összes belső funkcióinak a számára (Zs.-Nagy, 1992, 1994, 1997, 2001).

A szabadgyökök nem-orthodox felfogása impliciten diktálta azt is, hogy a sejt differenciálódás 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 (Zs.-Nagy, 1992, 1994, 1997, 2001).

E felfogás kísérletes tesztelésének egyik első megközelítése volt annak vizsgálata, hogy a kémiai úton generált $\text{OH}^\bullet$ szabadgyökök hogyan befolyásolják

a csirkeembrió végtagtelepéből származó sejtek differenciálódását, illetve öregedését (Zsupán et al., 1987). Ezt követően pedig megállapítást nyert, hogy a Fenton reakció révén indukálni lehet malignus sejtvonalak (K562, HL60) differenciálódását (Nagy et al., 1993, 1995).

Amikor jelen értekezés szerzője a Tanszék kutatásaiba bekapcsolódott (1993), s lehetőség nyílt egy sejttenyésztő laboratórium kialakítására, természetes módon adódott ennek a problémakörnek a kiterjedtebb vizsgálatára való igény. E munka során születtek azok az eredmények, amelyeket egyrészt több közleményben hoztunk nyilvánosságra (Szabó et al., 1999; Jeney et al., 2000; Bazsó-Dombi et al., 2000; Oravecz et al., 2001, 2002), másrészt még közlésre várnak, s amelyeket jelen értekezés összefoglalóan bemutat.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtvonalak

K562 sejtvonal

A K562 folyamatosan tenyésztethető sejtvonalat Luzzo és Luzzo (1975) hozták létre egy 53 éves krónikus myeloid leukémiás nőbeteg pleura folyadékából, a terminális blasztkrízis során. A sejtpopulációt magasan differenciálatlannak és granulocita szériához tartozónak karakterizálták (Luzzo és Luzzo, 1979). Andersson et al. (1979) felületi membránkutatásaik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a K562 egy humán erythroleukémia sejtvonal. Több tanulmány arra utal, hogy a K562 blasztkok multipotenciális hematopoetikus malignus sejtek, melyek spontán differenciálódnak az erythrocyta, granulocita és monocita szériák azonosítható őssejtjeivé (Luzzo et al., 1981). A K562 sejtvonalat széles körben használják az ún. "natural killer-assay"-ekben, mint igen szenzitív in vitro targetet (Orlando et al., 1977).

L-929 sejtvonal

Ezt a sejtvonalat Sanford et al. (1948) izolálta az L szülői vonalból, melyet egér kötőszövetből hoztak létre (Earle, 1940). A sejtenyésztés történetében az L vonal volt az első sejt, mely folyamatos kultúrában tenyésztett és a 929 klón volt az első azonosított sejtvonal. A szülői L vonal 100 napos egér C3H/An normál subcutan areolájából és zsírszövetből származik és a 929 klónt kapilláris technikával végrehajtott egyedi sejt izolálással hozták létre a szülői vonal 95. generációjából. A mai napig létezik az eredeti sejtvonal, melyet 50% Earle's BSS médium, 30% ló szérum és 20% csirke embrió extraktum tartalmú tápfolyadékban antibiotikum mentesen tenyésztene. Az L vonal az egyik legszélesebb körben tanulmányozott sejtvonal, melyet kezdetben a carcinogenesis in vitro demonstrálásának tanulmányozására használtak.

A 929 klónt a következő technikák kifejlesztésében alkalmazták:

1. Ismételt tenyésztési technika és kvantitatív sejt kultúra módszerek;
2. kémiaiailag definiált médiumok kidolgozása;
3. folyadék szuszpenziós tenyésztési technikák;
4. daganat transzformációs kutatások;
5. táplálkozás-metabolizmus és enzimek tanulmányozása;
6. morfológiai és kromoszóma vizsgálatok;
7. vírus assay;
8. immunológiai, sugárbiológiai és toxikológia vizsgálatok.

NIH/3T3 sejtvonala

A NIH/3T3 sejtvonala NIH Swiss egér embrióból hozta létre Aaronson, hasonló módszerrel mint az eredeti random bred 3T3-at, melyet Todaro és Green (1962) izolált Swiss egér embrióból. A 3T3 sejtvonala olyan körülmények között tenyésztették, hogy proliferáció során megőrizze a sejt a kontakt gátlási képességét és hogy frissen kihelyezett kultúrákban sokkal erősebb kontakt gátlást mutassanak, mint a diploid fibroblasztok. A létrehozott NIH/3T3 vonal sejtjei is igen magas kontakt gátló képességgel rendelkeznek. A sejtvonalon több mint 5 szubklónozási ciklust hajtottak végre abból a célból, hogy kidolgozzanak egy olyan morfológiai karakterű szubklónt mely transz-formációs assay-ekhez a legalkalmasabb.

A fenti ún. "established" sejtvonalakon túl, kísérleteinkhez használtunk számos esetben általunk tenyésztetbe vitt primér sejtvonalaikat is. Ezek eredetéről, előállításáról és tenyésztéséről a módszerek leírása során később fogok szólni.

Vegyszerek, reagensek és festékek

- Adenosine 5'-diphosphate-sodium salt (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)
- Benzidin (Reanal, Budapest, Hungary)
- Bovin Serum Albumine (BSA) (Serva, Heidelberg, Germany)
- Catalase (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)
- Collagen, Type I. (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)
- Cytochrome-C (Sigma, St. Louis, MO U.S.A.)
- DNA-sodium salt (Sigma, St. Louis, MO U.S.A.)
- Folin-Ciocalteu reagenz (Merck, Darmstadt, Germany)
- 1,9 - Dimethyl-methylen blue (Aldrich, Sreineim, Germany)
- 2,7 - Diaminofluorene (Fluka, Buchs, Germany)
- Dimethyl sulfoxid (Sigma, St. Louis, MO U.S.A.)
- Eisen-Standardlösung (1,0 g/l) (Merck, Darmstadt, BRD)
- Haemalaun
- Hoechst 33258 (Sigma, St Louis, MO U.S.A.)
- Micromount (Surgipath, Grayslake, IL U.S.A.)
- Oil Red O (Aldrich, Milwaukee, WI U.S.A.)

- Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMFS) (Sigma, St. Louis, MO U.S.A.)
- Rabbit anti-human Ki-67 antigen. Primary antibody + negativ control (DAKO, Carpinteria, CA U.S.A.)
- Sudan IV. (Aldrich, Milwaukee, WI U.S.A.)
- Superoxide dismutase (Sigma, St. Louis MO U.S.A.)
- TiOSO_4 oldat (Debreceni Egyetem, Szervetlenkémiai Tanszék)
- Thrypsin - EDTA (Gibco, Paisley, Scotland)
- Trypan blue 0,5% solution (Serva, Heidelberg, Germany)
- tRNA (Sigma, St. Louis, MO U.S.A.)
- Tween 20, /Polyoxyethylenesorbitan monolaurate / (Sigma Steinheim, Germany)
- Vectastain Elite PK-6200 ABC KIT (Vector Labor. Burlingame, CA U.S.A.)
- Vector Vip Substrate Kit for Peroxidase (Vector Labor. Burlingham, CA U.S.A.)
- Vas (II) ammónium-szulfát (Reanal, Budapest, Hungary)
- Xanthine-sodium salt (Sigma, St.Louis, MO U.S.A.)
- Xanthine oxidase (Sigma, St. Louis, MO U.S.A.)
- Általánosan használt laborvegyszerek: acetone, etanol, éter, glicerin, metanol, 2-propanol, zselatin.

Tápfolyadékok, pufferoldatok és adalékaik

- Medium 199 (Sigma, St. Louis, MO U.S.A)
- DMEM (Sigma, St. Louis, MO U.S.A.)
- RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO U.S.A.)
- FBS - Foetal Bovine Serum (Gibco, Paisley, Scotland)
- Fiziológias NaCl oldat (Biogal, Debrecen, Hungary)
- L-Glutamine (ICN, Costa Mesa, CA U.S.A.)
- D (+) Glükóz (Reanal, Budapest, Hungary)
- NaHCO_3 (Sigma, St. Louis, Mo U.S.A.)
- PBS (Sigma, St. Louis, MO U.S.A.)
- Penicillin (Biogal, Debrecen, Hungary)
- Streptomycin (EGIS, Budapest, Hungary)

Laboratóriumi műszerek

- CO₂ Termosztát (ASSAB T305GF KEBO Biomed, Spånga, Sweden)
- Cytocentrifuga
- Cytoflow-FACSAN (Becton Dickinson, San Jose, CA U.S.A)
Fényforrás: 15-mW, 488-nm, levegőhűtésű, argon-ion lézer.
- Fénymikroszkóp (Zeiss, Jena, Germany)
- Fénymikroszkóp Axiolab E + Contax 167 MT fényképezőgép (Zeiss, Jena, Germany)
- Invertmikroszkóp, Mic 1727 (Unitron, Newton Highlands, MASS U.S.A.)
- Laborcentrifuga K-23 (MLW, Leipzig, DDR)
- Laborcentrifuga K-26 D (MLW, Leipzig, DDR)
- Laminarbox 1446 GV (Elektromat, Dresden, DDR)
- PH mérő OP-208/1 (Radelkis, Budapest, Hungary)
- Spektrofotométer Hitachi U-2000 UV/VIS (Hitachi, Japan)

Laboratóriumi eszközök

- Cellulózacetát szűrő membrán 0.22 µm pórusátmérővel (Sartorius, Göttingen, Germany)
- Centrifugacsövek, fagyasztócsövek (Nunc, Naperville, IL U.S.A.)
- Mikroszkópi tárgylemez Super Frost (Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig, Germany)
- Mikropipetta (Gilson, France)
- Mikroszkópi tárgylemez két sejtenyésztő kamrával, Lab-Tek (Mile Scientific, Naperville, IL U.S.A.)
- Sejtenyésztő edények, flaskák, Petri csészék (Nunc, Naperville, IL U.S.A.)
- Steril szűrőkészülék (Nalgene, Nalge Comp. Rochester, NY U.S.A.)
- Steril szűrő fecskendőhöz (Sartorius, Göttingen, Germany)

A használt módszerek

Primér sejtvonal szeparálása és tenyésztése

Primér sejtvonalak előállításához endocrin ophtalmopathiás (EOP-os) betegektől korrekciós műtét során nyert szemizom darabot, illetve dekompressziós műtét kapcsán eltávolított zsírszövetet dolgoztunk fel, lényegében Bahn et al. (1987) módszerét követve. Kontrolként, strabismus műtétek során kivett szemizom darabot, és EOP által nem érintett betegek szemműtétei során kivett zsírszövetet használtunk, valamint humán bőrszövetet melyet az alkar belső felszínéről vagy a hasról nyertünk.

A műtétek során eltávolított szövetdarabokat már a műtőben steril tápfolyadékba helyezték, mely antibiotikumot tartalmazott (Penicillin/Strep-tomycin: P/S). Ezt követően a mintákat a laboratóriumba vittük. Laminár boxban folytattuk a feldolgozást. P/S tartalmú PBS-ben többszöri mosás után kb. 2x2mm-es darabokra vágtuk, majd NH_4Cl tartalmú oldatba helyeztük 15 percre a szövetdarabkákat, abból a célból, hogy a maradék vért hemolizáltassuk, mivel nagy mennyiségű vvt jelenléte rontja a tenyésztés esélyeit. Ezután újra mostuk PBS-sel, majd egy tápfolyadékos mosás következett, az így előkészített szövetdarabkákat Petri csészébe helyeztük egyenletesen szétszórta, hogy a tenyésztés során kinövő fibroblasztoknak teret biztosítsunk. A bőrszövetből készített darabokra fedőlemezeket is tettünk. Végül 20% FBS tartalmú Médium 199 tápfolyadékot pipettáztunk a szövetekre, olyan óvatosan, hogy ne mozduljanak el sem most, sem a teljes növesztési periódus során egyetlen médium csere alkalmával sem. A Petri csészéket termosztátban tartottuk 37°C -on, 5% CO_2 és 80% páratartalom mellett. Hetente kétszer cseréltünk tápfolyadékot. Általában 5 nap múlva megjelentek az első fibroblasztok a szövetek körül. Körülbelül 3 hét múlva kivettük a szövetdarabokat, hogy ezek helyét is be tudják nőni a fibroblasztok. 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 Médium 199-ben a kívánt sejtszám eléréséig.

Immortalizált sejtvonalak tenyésztése

A K-562 sejteket RPMI 1640-ben tenyésztettük, 10% FBS mellett heti kétszeri tápfolyadék cserével, szuszpenziós kultúrában.

Az L-929 sejteket RPMI 1640-ben tenyésztettük, 10% FBS jelenlétében, heti kétszeri tápfolyadék cserével, monolayer kultúrában.

Az NIH/3T3 sejteket DMEM tápfolyadékban tenyésztettük, mely 3.5 g/l glükózt és 10% FBS-t tartalmazott, és hetente kétszer cseréltük a monolayer kultúrában élő sejteken.

Mind az RPMI, a M199 és a DMEM tápfolyadékok 50 IU/ml penicillint és 50 µg/ml streptomycint is tartalmaztak.

Minden sejttípus tenyésztése 37°C-on 5% CO₂, és 80% páratartalom mellett történt.

A sejtkultúrákon alkalmazott kezelések

A OH[•] szabadgyökök hatásának tanulmányozását a különböző sejtvonalakon Fenton reakció segítségével végeztük (Fenton, 1894). A sejtenyészetekben Fe²⁺-ADP komplex és H₂O₂ hozzáadásával OH[•] szabadgyököket generáltunk (Floyd és Lewis, 1983). Az Fe²⁺-ADP komplexet Fe²⁺-ammónium szulfátból és ADP-ből desztillált vizes oldással készítettük és felhasználás előtt 1:1 arányban töltöttük össze. A vas végkoncentrációja a tenyésztő médiumban 100 µM volt. A vas autooxidációjának kivédése céljából az ADP végkoncentrációja mindig 20-szorosa volt a vasénak. A hidrogén-peroxid koncentrációját kísérletileg határoztuk meg és 55 µM végkoncentrációt találtunk ideálisnak, mind a primér, szövetből kinőtt sejtekre mind a daganatsejtekre (kivéve a K-562-nél). Az oldatokat mindig frissen készítettük és felhasználás előtt 0.22 µm pórusátmérőjű szűrőn szűrtük.

A sejteket két csoportba osztottuk, 20ml médium térfogatban 2x10⁵ sejt/ml kezdeti sejtszuszpenzió koncentrációval dolgoztunk. Az egyik csoportot Fenton reaktánsokkal kezeltük, a másik csoportot kontrolként szolgált. A kezelés 96 óráig tartott. Az első 48 óra után mind a kontrol, mind a kezelt sejteken tápfolyadék cserét végeztünk. A már egyszer kezelt sejtekhez ismételten frissen készített reakció elegyet adtunk /megismételtük a kezelést/. A második 48 óra elteltével a sejteket PBS-ben mostuk, számoltuk, életképességet vizsgáltunk, speciális biokémiai detektálást, mérést és hisztokémiai festéseket végeztünk a sejtek differenciálódásának követésére.

A K-562 sejtek vizsgálatakor a kezeletlen kontrol sejtek mellett, egy, az irodalomban (Feriotto et al., 1988) általánosan elfogadott differenciáltató szerrel,

Ara-C-vel is kezeltünk egy sejtcsoportot (1.8 μM végkoncentrációban). A Fenton reakció kivitelezése úgy történt mint a többi sejttypusnál, kivéve a hidrogénperoxid koncentrációját (100 μM) és a kezelési periódusok idejét (2x48 óra). A K-562 sejteknél a differenciálódás bizonyítására kvalitatív hemoglobin meghatározást és hisztokémiai festést is végeztünk.

Életképesség teszt

A sejtszuszpenziót lecentrifugáltuk, a pelletet 1 ml tápfolyadékban reszuszpendáltuk. Ebből a homogén szuszpenzióból kivettünk 0.1 ml-t, melyet egy 0.8 ml PBS-t és 0.1 ml Trypán-kék (0.4%-os) festéket tartalmazó csőbe tettünk, és alaposan, de kíméletesen összekevertük. 3-4 perc várakozás után néhány cseppet pipettával Bürker kamrába helyeztünk. Gyorsan megszámloltuk a Trypán kékkel festődött sejteket és a teljes sejtszámot. Azok a sejtek, melyeknek a membránja ép, nem veszik fel a festéket egy bizonyos ideig, mivel azonban a festék toxikus, a sejtek folyamatosan pusztulnak, és az elpusztult sejtek membránján akadálytalanul hatol át a festékszemcse, vagyis az idő előrehaladtával hamis eredményt kapunk.

Hemoglobin kimutatás benzidinnel (Rowley et al., 1981)

Festékoldat készítése:

1. Négy mg benzidint oldunk 240 μl 96%-os ecetsavban;
2. hozzáadunk 1740 μl 0.5 M Na-acetát puffert (pH 4.5);
3. és 20 μl 30%-os H_2O_2 -ot.

Festés

A sejtszuszpenzióból (az ideális sejtsűrűség kb. 2×10^6 sejt/ml) és a benzidin festő oldatából 1:1 arányú keveréket készítünk. 5 perc elteltével az elegyhez kevés PBS-t adunk és 7 percig 800 rpm-el centrifugáljuk a sejteket. Az üledéket 200 μl BPS-ben reszuszpendáljuk, Bürker kamrába cseppentjük és számloljuk a kék (hemoglobin pozitív) és a festetlen sejteket. Legkevesebb 5x100 sejtet számloltunk mintánként.

Hemoglobin kimutatás (2,7- diaminofluorén) segítségével

Festékoldat készítése hisztokémiához (Kaiho et al., 1985)

1. Festék törzsoldat: 100 mg DAF-ot oldunk 10 ml 90% ecetsavban. Polipropilén edényben dolgozunk, mert a polisztirol és az üveg spontán katalízist indít el a DAF reakció-elegyben. A festék törzsoldat sötét helyen 4°C-on tárolva egy hónapig stabil.
2. Festő elegy: 10 ml Tris-HCl pufferhez (pH 7.0) adunk 1 ml-t a DAF festék oldatból és 0.1 ml 30%-os H_2O_2 -ot.

Festés

A DAF festő elegyből 0.1 ml-t, valamint 0.1 ml sejtszuszpenziót óvatosan összekeverünk. Szobahőmérsékleten 5 percig reagáltatjuk, utána mikroszkópban megszámoljuk a totál sejtszámot és a hemoglobin tartalmú sejteket, melyek kékre színeződtek.

DAF oldat készítése spektrofotometriás méréshez (Worthington et al. 1986)

1. Festék törzsoldat készítés a hisztokémiai festésnél leírt módon.
2. Tris-urea puffer: 360.4 g ureát és 12.1 g Tris bázist oldunk 500 ml vízben, majd kiegészítjük 950 ml-re deszt. vízzel s ekkor beállítjuk a pH-t 85%-os foszforsavval 7.0-re és utána kiegészítjük 1000 ml-re.
3. 0.1 ml DAF-festék törzsoldat + 0.06 ml 30%-os H_2O_2 + 10 ml Tris-urea puffer összemérésével kapjuk a spektrofotometriás reagenst.

Spektrofotometriás mérés:

Ismert sejtszámú üledéket lizálunk 0.5 ml 0.01% NP-40 tartalmú deszt. vízben 25°C-on vortex segítségével. Hozzáadunk 1.5 ml DAF kolorimetriás reagenst, összekeverjük és 5 percig inkubáljuk 25°C-on. Spektrofotométeren 610 nm-nél mérjük az optikai denzitást.

A K562 sejtek differenciálódásának nyomon követése flow-cytométerrel

Minta előkészítése:

1 ml sejt szuszpenzióhoz 2 ml 70%-os etanol adtunk, ezzel fixáltuk a sejteket. Ebből a sejt szuszpenzióból hígítottuk a méréshez ideális sejtsűrűséget. A mérés során általában 10,000 sejtről szereztünk információt és a vizsgálni kívánt sejtpopulációt digitalizált "kapuk" felhelyezésével jelöltük ki.

Tenyésztő médiumok vastartalmának meghatározása atomabszorpciós spektrometria (AAS) segítségével

A módszer elve a következő: Az atomabszorpció a megfelelő energiájú fény és az atomok közti olyan kölcsönhatás, melynek során egy elem szabad atomjai az atom szerkezetétől függő hullámhosszúságú fényt abszorbeálva, magasabb energia állapotba jutnak. Mivel az elnyelt fény hullámhosszát az atom minősége, a fényerősség csökkenését pedig a szabad atomok száma határozza meg, a jelenség specifikus és szelektív analitikai módszerként használatos (Price, 1977).

Minta előkészítése és mérése

A tápfolyadékot a 10% savótartalom miatt fehérje mentesíteni kell. 10%-os triklór-ecetsavat és a vizsgálandó tápfolyadékot 1:1 arányban összekeverjük és utána lecentrifugáljuk 2400 rpm-el 20 percig. A felülúszóból közvetlenül mérjük a vasat lángtechnikával 248.3 nm-en vas kalibráló oldatsor segítségével.

GAG kimutatás hisztokémiával és mérés spektrofotometriával, dimetilmetilénkék /DMB/ reakcióval

(Farndale et al. 1982)

Dimetilmetilénkék /DMB/ reagens oldat készítése

1. 16 mg 1.9-dimetil-metilénkéket oldunk 5 ml etanolban,
2. hozzá adunk 2.0 g nátrium formiátot és 2.0 ml hangyasavat,
3. feltöltjük 1000 ml-re desztillált vízzel.

A reagens /A₅₃₅: kb. 0.38/ barna üvegben szoba-hőmérsékleten tárolandó.

Minta előkészítés GAG méréshez

50 mM-os foszfát pufferhez /pH: 6.5/, mely tartalmaz 2 mM N-acetyl cysteint és 2 mM EDTA-t hozzáteszünk 300 µg/ml papaint.

Ismert sejtszámú sejt üledéket a fenti oldatban 65 C°-on 1 óráig inkubálunk.

Spektrofotometriás GAG mérés

250 µl feltárt sejtoldatot polystyrol csőbe pipettázzuk és hozzámérünk 2.5 ml DMB reakció elegyet jól összekeverjük és 535 nm-en rögtön mérjük.

Ki-67 proliferációs antigén kimutatás

1. Sejt monolayer mosása PBS-el 2x
2. Fixálás hideg acetonnal 4 C -on 10 percig.
3. Endogén peroxidáz bénítás hideg metanollal 30 perc.
4. Aspecifikus ellenanyag blokkolás normál savóval a Vectastain Elit ABC KIT-ből 20 percig.
5. Reakció elsődleges antitesttel, Rabbit anti-humán Ki-67 antigénnel (DAKO) 1 óráig.
6. Reakció másodlagos biotinilált antitesttel Vectastain Elit PK-6200 ABC KIT-ből 30 percig.
7. Inkubálás peroxidázzal jelzett avidin-biotin komplex-szel a KIT-ből 45 percig.
8. Előhívás Vector VIP szubsztrát KIT-tel.
9. Háttér festés ha szükséges pl. Haemalaunnaal és kékítés.
10. Lefedés Micromaunt-al.

Zsírfestés Oil red-O-val (Tanka és Keller, 1974)Oil Red-O festék készítéseTörzsoldat:

A festéket mindig frissen készítjük. 0.5 g Oil red-O festéket 100 ml i-propanolban oldunk 2 órás kevertetés során.

Festő oldat:

A törzsoldatból 1:1 arányú desztillált vizes hígítást készítünk, és szűrőpapíron szűrjük.

Festés

1. A monolayer sejt kultúrákat, melyek vagy üvegen vagy műanyagon nőttek Ca-formolban fixáltuk 2 óráig.
2. Ezután a formalint alaposan kiáztattuk és a „metszeteket” 60%-os propanolban megmártottuk.
3. Festés Oil red-O-val 20 percig.
4. 60%-os propanolos gyors differenciáltatás.
5. Desztillált vizes mosás.
6. Magfestés Heamalaunnaal 1 percig.
7. Áramló csapvizes előhívás.
8. Desztillált vizes öblítés.
9. Lefedés glicerín-zselatinnal.

Zsírok kimutatása Szudán IV. festékkal (Tanka és Keller, 1974.)

Szudán IV. festék készítése

50 ml aceton és 50 ml 70%-os etilalkohol elegyében 37C°-on telített Szudán IV. festék oldatot készítünk. Festés előtt szűrjük.

Festés

1. A monolayer sejt kultúrákat, melyek vagy műanyagon vagy üvegen nőttek, Ca-formolban fixáltuk 2 óráig.
2. Ezután a formalint alaposan kiáztattuk, és a „metszeteket” 70% etilalkoholban megmártottuk.
1. Festés Szudán IV festékkal 1.5-2 percig.
2. Differenciálás 70%-os alkoholban.
3. Magfestés Haemalaunnaal 1 percig.
4. Csapvizes előhívás.
5. Deszt. vizes öblítés.
6. Lefedés glicerín- zselatinnal.

A sejtek szolubilizálása enzimmérésekhez (SOD, kataláz)

(Kasugai és Yamada, 1992.)

Szolubilizáló oldat

50 mM Tris-HCl pH:7.5

0.3% Triton X-100

0.2 mM fenil-metil szulfonil fluorid

0.5 % (w/v) cetil-trimetil-ammónium bromid

Szolubilizálás

1. A sejteket PBS-ben 2x mossuk, eközben átvisszük Eppendorf csőbe és megszámloljuk. Körülbelül 1×10^7 sejtet teszünk csővenként, és lecentrifugáljuk.
2. A centrifugátumot kb. 100-200 μ l PBS-ben felvesszük (sejtszámtól függően) és alaposan felfuszpendáljuk.
3. Kiveszünk ismert térfogatot DNS méréshez.
4. Újra lecentrifugáljuk és az üledéket felvesszük szolubilizáló oldatban.
5. 4x fagyasztjuk és felolvasztjuk, cseppfolyós nitrogén segítségével.
6. A mintákat rázatjuk 4°C-on 1 óráig.
7. Centrifugálás 1200 g-vel 5 percig 4°C-on.
8. A felülúszót leszívjuk és eltesszük enzimméréshez (-70°C-ra).

Szuperoxid-diszmutáz (SOD) aktivitás mérése sejt-szolubilizátumból

(Flohé és Ötting, 1984.)

Oldatok a SOD meghatározáshoz

A oldat: 0.76 mg xantin 10 ml 0.001 N nátriumhidroxidban és 24.8 mg (2 μ mol) citokróm-C 100 ml 50 mM foszfát pufferben (pH:7:8) mely 0.1 mM EDTA-át tartalmaz. Az oldat 3 napig stabil 4°C -on.

B oldat: kb. 0.2 U/ml xantin -oxidáz 0.1 mM EDTA-ban frissen készítve. A xantin-oxidáz mennyiségét úgy változtatjuk, hogy az abszorbancia csökkenés 0.025 DA/min legyen a SOD nélküli alapreakciónál. Az oldat jégen tartandó.

300 μ M KCN-oldat

A spektrofotometriás SOD mérés menete

Standard beállítás: x μ l B oldat (~15 μ l)

1.4 ml A oldat

10 μ l KCN

25 μ l deszt. Víz

A minták mérése: 1.4 ml A oldat

10 μ l KCN

25 μ l minta (felülúszó)

~15 μ l B oldat

A standard görbe felvételéhez 0-300 ng SOD tartalmú standardokat használtunk.

Kataláz mérés sejt szolubilizátumból (Gaunt és De Duve, 1976.)

Méréshez szükséges oldatok

5 mg BSA

1 ml 100mM-os imidazol puffer

1 ml 1%-os Triton x-100

20.43 μ l H_2O_2 (30%-os) ad 10 ml bideszt. víz.

TiOSO₄ oldat (2N H_2SO_4 -ban telített titánium oxiszulfát) mérés előtt 2x-ére hígítva bideszt vízzel.

Spektrofotometriás mérés menete

A vak mérése:

100 μ l minta,

100 μ l bideszt. víz és

2 ml TiOSO₄ oldat.

A totál mérése:

100 μ l bideszt. víz,

100 μ l inkubáló oldat és

2 ml TiOSO₄ oldat.

A minták mérése:

1. Összemérünk 100 μ l hígított mintát (tapasztalataink szerint kb. 4×10^4 sejt szolubilizátuma)
 2. 100 μ l inkubáló oldatot és
 3. 2 ml TiOSO_4 oldatot.
- 25 perc múlva 405 nm-en leolvassuk az abszorbanciákat.
A standardok 0-50 Unit katalázt tartalmaztak.

DNS mérés (Teixeira et al., 1995.)Méréshez szükséges oldatok:

- 10 mM EDTA oldat (pH: 12.3)
3 M Na-acetát oldat (pH: 5.2)
10mM Tris-t és 100 mM NaCl-ot tartalmazó oldat (pH: 7.0)
1mg/ml-es Hoechst 33258 törzsoldat, 200 ng/ml-es és 2000 ng/ml-es munkaoldatok:
1M NH_4OH oldat
PBS (pH: 7.2-7.4)
1 mg/ml-es DNS törzsoldat
1 M KH_2PO_4 oldat
2%-os Triton X-100 oldat
200 μ g/ml tRNS oldat
96%-os etanol

A sejtek szolubilizálása

1. A sejteket Ca, Mg mentes PBS-el 2X mossuk.
2. 300 μ l 2%-os Triton X-100-at adunk a sejtekhez, és ezzel többször felszuszpendáljuk, majd szobahőmérsékleten 30 percig állni hagyjuk.
3. Eppendorf csőben -20°C -on tároljuk, vagy azonnal mérjük.

A DNS mérés menete

1. 75-250 μ l Tritonos szolubilizátumhoz fele térfogatnyi 3 M-os Na-acetátot adunk. A sejtszám 10^4 és 10^5 nagyságrend körül ideális.

2. 20 µg tRNS-t adunk hozzá.
 3. 1.5 ml-re feltöltjük ethanollal.
 4. A DNS kicsapás 30 perc -70°C -on, de ha kevés a DNS akkor 12 óra.
 5. Centrifugálás 13 000 g 10 percig.
 6. A felülúszót leszívjuk és a pelletet vákumszárítjuk.
 7. 700 µl 10 mM-os EDTA-ban feloldjuk a kicsapott nukleinsavat.
 8. 50 µl 1 M-os KH_2PO_4 -al semlegesítjük
 9. A mintákhoz egyenlő térfogatú festékoldatot adunk (750 µl-t) a 200 ng/ml-es festékoldatból.
 10. Spektrofluoriméteren 460 nm-nél mérjük.
- A DNS standardokat 50 és 1000 ng között vesszük fel.

Fehérje mérés (Lowry et al., 1951.)

Méréshez szükséges oldatok

Pufferoldat:

200 mM NaOH

377.2 mM Na_2CO_3

2.13 mM K-Na- tartarát x 4 H_2O

ad 100 ml bideszt. víz

43 mM-os CuSO_4 oldat (használat előtt hígítani kell 1:49 arányban pufferrel)

Folin-Ciocalteus_reagens (használat előtt hígítani kell 1:6 arányban deszt. vízzel)

1 mg/ml-es BSA oldat (a standard görbe felvételéhez)

A mérés menete

Standard készítés:

1. BSA hígítási sor minden csövében az össztérfogatot 50 µl-re kell kiegészíteni deszt. vízzel.
2. Minta előkészítés: 10 µl sejt homogenizátum + 40 µl deszt. víz

Mérés:

A standard sorozatra (50 µl) és a mintákra (50 µl) rámérünk 500 µl CuSO_4 oldatot, összekeverjük, 20 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, ezután

rámérünk 500 μ l Folin reagenst és 30 percig inkubáljuk. Spektro-fotométeren 630 nm-en mérjük.

EREDMÉNYEK

K562 sejtvonalon végzett vizsgálataink és azok eredményei

A K562 humán erythroleukemia sejtvonal általános sejtenyésztési körülmények között korlátlanul szaporodik. E sejteknek csupán 3 %-a mutat spontán erythroid differenciálódást. A differenciálódás során megfigyelhető, hogy az adott sejtek szaporodása leáll és a normál vörösvérsejtekkel azonos módon hemoglobint kezdenek szintetizálni. Több olyan hatóanyagot ismerünk, amely képes beindítani ezt a differenciálódást, pl: 1- β -D-arabinofuranosyl-cytosine (Ara-C) (Rowley et al. 1981; Feriotto et al. 1988; Bianchi Scarrá et al. 1989; Moore et al. 1991), phorbol észter (Pelicci et al. 1984), fagaronine (Comoe et al. 1987), tiazofurin és ribavirin (Oláh et al. 1988), hemozolomide (Zucchetti et al. 1989), pyrizinone (Mizubishi et al. 1990), stb.

Zs.-Nagy (1991,1992,1994) hipotézise szerint, a hidrogénperoxid vas által indukált heterolízise során keletkező $\text{OH}\cdot$ szabadgyököknek lényeges fiziológiai szerepe lehet a sejtek növekedésében és a maturációjában. HL-60 promyelocita leukémia sejteken (Nagy et al., 1993), valamint K562 erythroleukémia sejteken (Nagy et al., 1995) végzett kísérletek eredményei alátámasztották ennek a teóriának a realitását. Kísérleti munkánk egy részét mi is ez utóbbi sejtvonalon végeztük, azon egyszerű okból kiindulva, hogy a K562 sejtekben a differenciálódás során keletkezett hemoglobint viszonylag könnyen lehet detektálni.

Kísérleteinkben 75 cm^2 -es tenyésztőfelületű, úgynevezett T/75-ös sejtkultúra edényeket használtunk. A K562 sejteket 2×10^5 sejt/ml induló sejtsűrűségnél kezeltünk 2x48 óráig Fenton reaktánsokkal (végkoncentrációkban értve): Fe^{2+} -ADP komplex (2 mM ADP és 0.1 mM Fe^{2+}) és 0.1 mM H_2O_2 hozzáadásával. A tenyésztő médiumok (RPMI és M199) vas tartalmát atomabszorpciós méréssel határoztuk meg, s a kapott vastartalom 2.25 mg /l-nek vagyis $4.5\text{ }\mu\text{mol}$ -nak adódott. Ehhez képest a tápfolyadékhoz adott Fenton reaktáns 22-szeresére emeli a médium vas szintjét.

A kezeletlen kontrol sejtek vizsgálata mellett úgynevezett pozitív kontrol kezelést is végeztünk $1.8\text{ }\mu\text{mol}$ 1- β -D-arabinofuranosylcytosine-nal (Ara-C), amely szerről a fentiek szerint már bizonyítottan tudjuk, hogy elindítja ezen sejtek erythroid differenciálódását.

A 96 órás kísérleti periódus lejártakor a kontrol és kezelt kultúrákban talált sejtszámokat foglalja össze az 1. táblázat.

1. táblázat. K562 sejtek száma a 2x48 órás tenyésztési periódusok után (3 kísérlet átlaga $\pm$ SD).

Kezelés fajtája	Sejtszám ($\times 10^4/\text{ml}$)	Szignifikancia ($p <$)
Normál kontrol	188.6 $\pm$ 14.9	
Ara-C	19.5 $\pm$ 3.9	0.001
Fenton-kezelt	16.1 $\pm$ 8.3	0.001

Az 1. táblázat adatai egyértelműen igazolják, hogy mind az Ara-C, mind a Fenton reaktánsokkal való kezelés nagy mértékben, statisztikailag erősen szignifikánsan, lelassítja a sejtek szaporodási ütemét, vagyis gátolja a sejtproliferációt. Annak detektálására, hogy az erythroleukémia sejtekben megindult a hemoglobin szintézis, benzidin festést végeztünk a sejtuszpenzióban és Bürker kamrában számoltuk a kékre színeződött, vagyis hemoglobint tartalmazó sejteket.

A 2. táblázatban a 96 órás kísérleti periódus végén kapott benzidin pozitív sejtek számát tüntettük fel az összes sejtek százalékában.

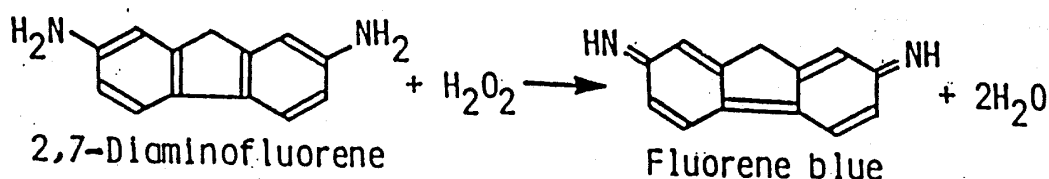
2. táblázat. A benzidin-pozitív K562 sejtek százalékos aránya a 2x48 órás tenyésztési periódusok után (legalább 3 kísérlet átlaga $\pm$ SD).

Kezelés fajtája	Benzidin pozitivitás (%)	Szignifikancia ($p <$)
Normál kontrol	3.2 $\pm$ 1.1	
Ara-C	42.2 $\pm$ 8.8	0.001
Fenton-kezelt	28.1 $\pm$ 4.5	0.001

Jóllehet az 1. és 2. táblázat eredményeinek tendenciái megegyeztek azokkal, amelyeket a korábbi kísérletekben kollégáink leírtak, a színreakció kiértékelése során azt tapasztaltam, hogy a Bürker kamrában történő mikroszkópos fókuszálás ("élesre állítás") során a preparátum "vastagsága" miatt interferenciagyűrűk jelennek meg, amely jelenség miatt a különböző mélységű beállítási síkokban különböző sejtek tűnhetnek kéknek.

Ez némileg bizonytalanná teszi a benzidin-reakciónak Bürker kamrában végzett számolási módszerét.

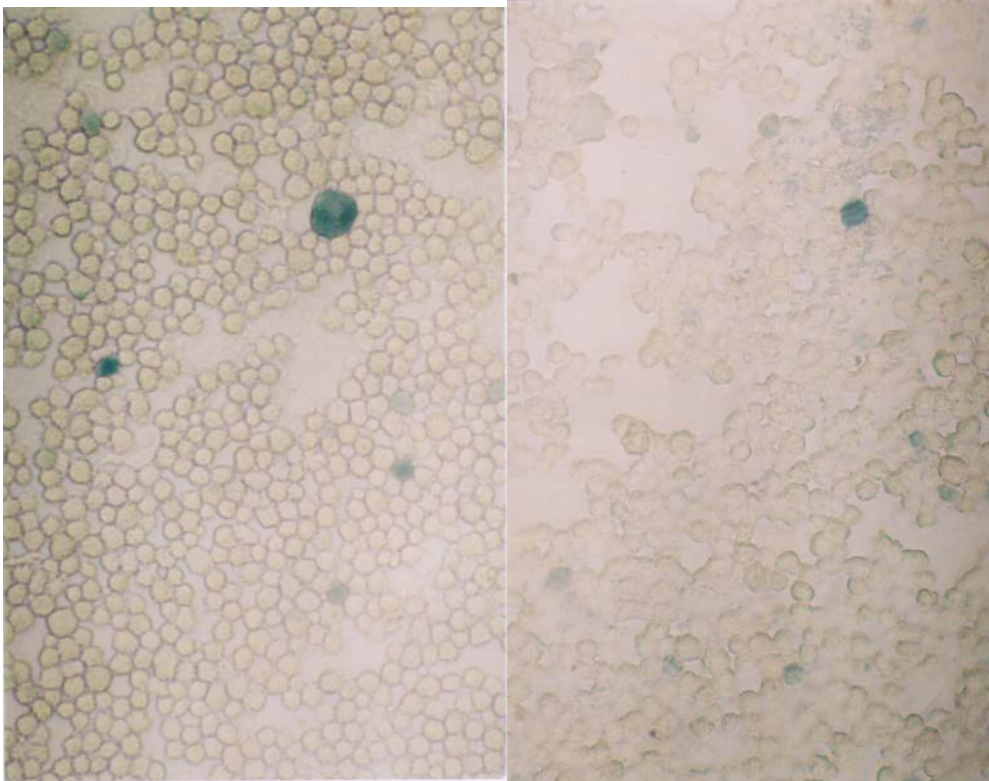
Ez a probléma inspirált más detektálási technika keresésére az irodalomban. Hemoglobin kimutatására a 2,7-diaminofluorén (DAF) nevű vegyületet Kaiho és Mizuno (1985) alkalmazta először az erythroid differen-ciálódás kimutatásához Friend sejteken (L 745A sejtvonalon). Bár az új vegyület bevezetésének indoka az volt, hogy a benzidin bizonyítottan erős mutagén és karcinogén vegyület, és ennek ellenére a hisztokémiai és toxiko-lógiai laboratóriumokban mindmáig általánosan használatos a hemoglobin kimutatására. A benzidinnel történő hemoglobin meghatározás a hemoglobin pseudoperoxidáz aktivitásán alapul, ahol a benzidin a hidrogén donor. A dia-minofluorén szintén a hidrogén donor szerepét tölti be a peroxidáz assaykben. A reakció során hidrogén peroxid jelenlétében a peroxidáz katalizálja a fluorén kék képződését a diaminofluorénből (Kaiho és Mizuno 1985) a következő módon:



Mind a benzidin mind a DAF festés a sejtek dehidrációja nélkül is elvégezhető. Azzal a különbséggel, hogy míg a benzidin interferál a tápfolyadékkal, elsősorban annak savó komponensével, addig a DAF reakciót nem zavarja a savó jelenléte. Így lehetőséget teremt több minta gyors szimultán mérésére multiwell platekben, vagy erythroid kolóniákban hemoglobin kimutatására zselés állagú médiumon.

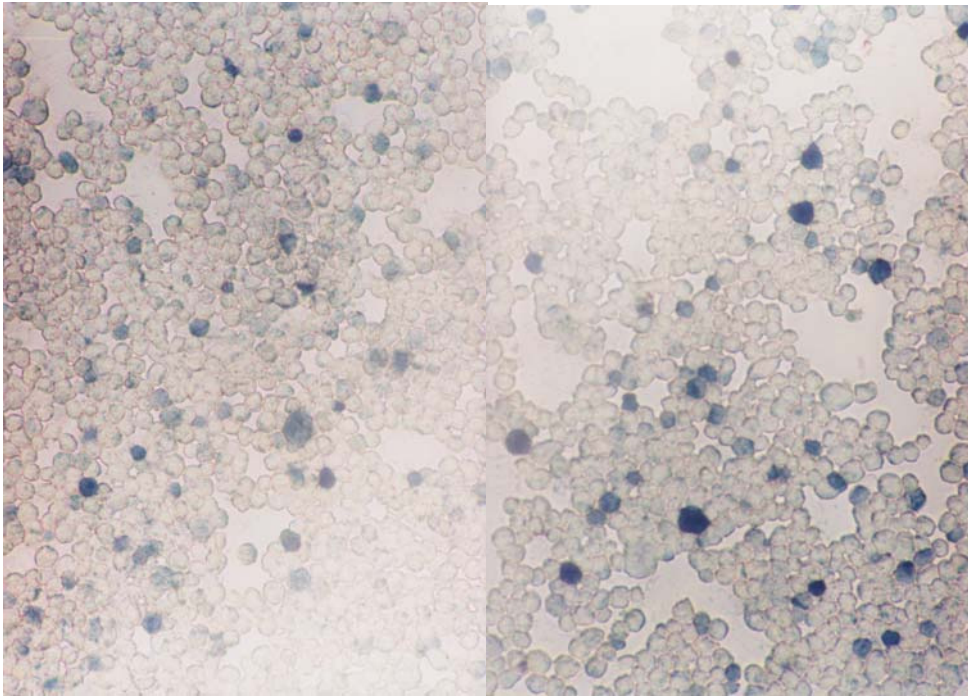
A DAF használatának előnyei más területeken is bizonyítást nyertek. Például, Worthington et al. (1987) méréseikkel bizonyították, hogy a DAF hemoglobin fotometriás meghatározás mintegy 80-szor érzékenyebb mint a benzidin-hemoglobin reakció. A közelmúltban pedig Montano és Morrison (1999) használták a DAF-hemoglobin reakciót antitest-függő complement-aktivált hemolízis quantitativ mérésére, s azt közölték, hogy még a ^{51}Cr -jelzést használó technikával is összemérhető az érzékenysége, ugyanakkor pedig egyszerűsége miatt annál lényegesen előnyösebb.

A K562 sejteken Ara-C-vel és Fenton reaktánssal történő kezeléseket után hemoglobin kimutatást végeztünk DAF festéssel. Az ilyen módon festett preparátumokról készült fotókat mutatunk be a következő felvételeken



3. és 4. ábra. Kezeletlen, kontrol K562 sejtek DAF festés után.

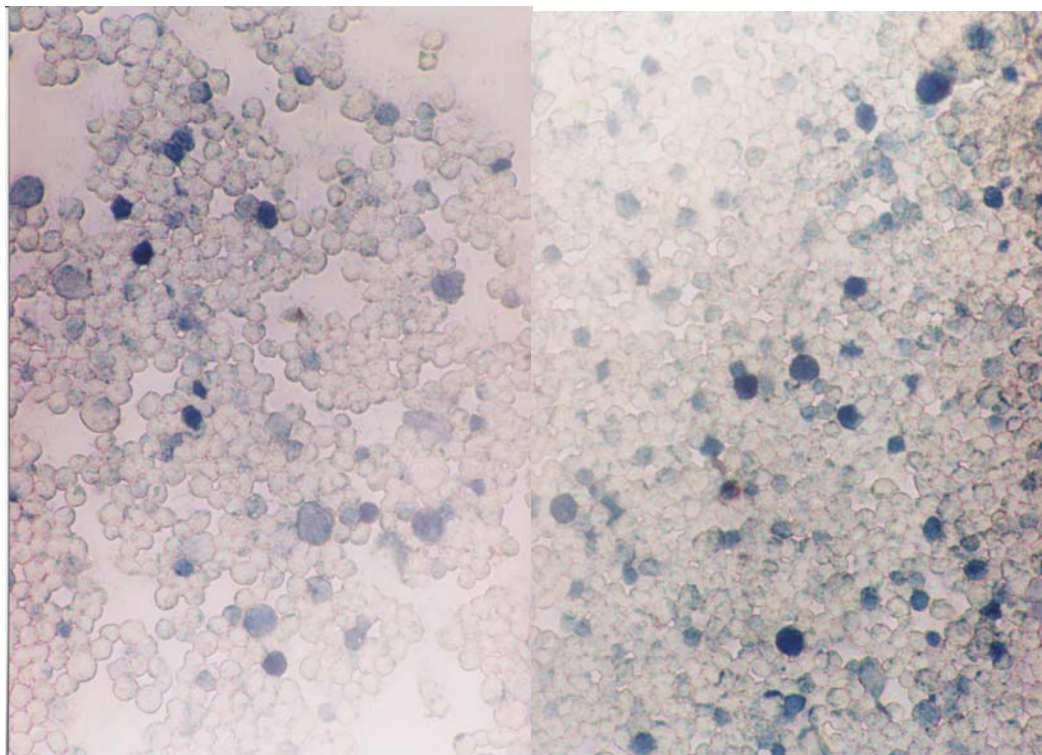
Kezeletlen kontrol sejteken elvégezve a hemoglobin kimutatást DAF-al szembetűnő, milyen csekély a hemoglobint tartalmazó sejtek száma. Ezt láthatjuk az 3. és a 4. ábrán. A jelenségnek az az oka, hogy ezek a sejtek az erythropoesis folyamatában a blaszt stádiumban megrekedtek, s mind-össze néhány százalékuk, mely a spontán differenciálódás jeleit mutatja, vagyis DAF-al hemoglobin tartalmuk kék színreakciót ad.



5. és 6. ábra. Ara-C kezelés hatása a K562 sejtek hemoglobin szintézisére.

Ara-C kezelés hatására elindul a hemoglobin szintézis a sejtekben, melyet DAF festéssel detektáltunk, és a 5. és 6 ábrán mutatunk be. A kontrolhoz viszonyítva sok kék sejtet láthatunk a preparátumban melynek az az oka, hogy a blaszt sejtek nagy számban elkezdtek szintetizálni a hemoglobint vagyis továbbléptek az erythropoesis-ben megakadt állapotuk-nál, a blaszt állapotnál.

Nagyszámú hemoglobin pozitív, diaminofluorénnel kék színreakciót adó sejtet láthatunk az 7. és a 8. ábrán, annak bizonyosságaként hogy erythro-eukemia sejtek tenyészetében a generált $\text{OH}\cdot$ szabadgyökök elindítják a sejtek differenciálódását, úgymint azt az Ara-C-vel végzett kezelésnél láthattuk, melynek egyik jele ezen sejteknél a DAF-al detektálható hemoglobin szintézis.



7. és 8. ábra. Fenton kezelés hatása K562 sejtek hemoglobin szintézisére.

Mivel a Tanszékünkön végzett korábbi vizsgálatok során már megállapítást nyert, hogy a K562 sejtek differenciálódása során a szuperoxid dizmutáz (SOD) és a kataláz aktivitása jelentősen megemelkedik (Nagy et al., 1995), ezen enzimek aktivitását nem mértük meg újra, de a teljesség kedvéért bemutatjuk a jellemző, korábbi eredményeket. Fontos kiemelni, hogy mindkét enzim lényegében a $\text{OH}\cdot$ szabadgyök termelésének fontos szabályozója, mivel a SOD-tól függ a H_2O_2 szuperoxid anionokból történő termelődési sebessége, míg a kataláz szabályozza e termék aktuális szintjét a sejtekben és a sejteken kívül. Más szóval, az élettani körülmények között lejátszódó Fenton-reakció intenzitása (Walling, 1979) e két enzim egyensúlyától, illetve egymáshoz viszonyított relatív aktivitási szintjétől függ. A 3. és 4. táblázat e két enzim aktivitás változásait mutatja be Nagy et al. (1995) munkája alapján.

3. táblázat. A K-562 sejtek SOD aktivitásának változása a 2x48 órás tenyésztési periódusok után (legalább 3 kísérlet átlaga $\pm$ SD) (Nagy et al., 1995).

Kezelés fajtája	SOD μg /mg fehérje	SOD ng /10 ⁶ sejt
Normál kontrol	15.42 $\pm$ 1.71	319.7 $\pm$ 35.4
Ara-C	31.16 $\pm$ 2.99	1172.9 $\pm$ 112.6
Fenton-kezelt	58.13 $\pm$ 2.89	2316.5 $\pm$ 201.1

4. táblázat. A K-562 sejtek kataláz aktivitásának változása 2x48 órás tenyésztési periódusok után (legalább 3 kísérlet átlaga $\pm$ SD) (Nagy et al., 1995)

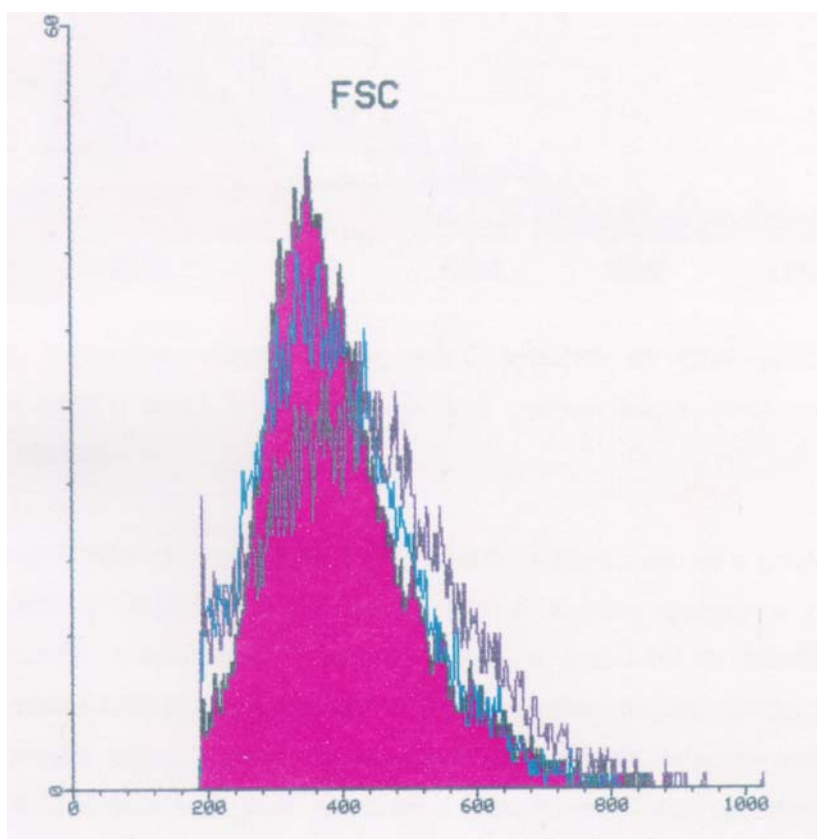
Kezelés fajtája	Unit kataláz/mg fehérje	Unit kataláz/10 ⁶ sejt
Normál kontrol	31.8 $\pm$ 0.9	13.2 $\pm$ 0.4
Ara-C	42.4 $\pm$ 1.7	31.0 $\pm$ 1.2
Fenton-kezelt	17.9 $\pm$ 1.6	7.0 $\pm$ 0.7

A 3. és 4. táblázatokból egyértelműen látható, hogy mind az Ara-C, mind a Fenton kezelés hatására megváltozik mind a SOD, mind a kataláz aktivitása a K652 sejtekben. Míg azonban a SOD jelentősen növekszik mindkét kezelés hatására (3. táblázat), addig a kataláz az Ara-C esetében mérsékelten növekszik, a Fenton kezelés során pedig csökken (4. táblázat). Ezzel együtt a SOD/kataláz arány jelentősen a SOD javára tolódik el, vagyis mindkét differenciálódást előidéző kezelés hatására lényegében a H₂O₂ szintjének jelentős emelkedésével kell számolnunk, ami egyet jelent a OH^{*} szabadgyök fluxus jelentős növekedésével.

Annak bizonyítására, hogy a Fenton kezelés illetve az ehhez kontrollként alkalmazott Ara-C kezelés megváltoztatja a K562 sejtek méretét és a cytoplazma kompaktágát, flow-cytometriás méréseket végeztünk. A flow-cytometer (vagy áramlási citométer) működési elve a következő: A sejtek strukturális és/vagy funkcionális jellemzésére szolgáló készülék, melynek fényforrása valamilyen lézer. A készülék vákuum segítségével szívja be a sejteket az áramlási kamrába, amelyben a köpenyfolyadék cirkulál. A hidrodinamikus fókuszálást biztosító rendszer segítségével a sejtek a megfelelő pH-jú és ionerősségű köpenyfolyadék áramában, megfelelő alakú áramlási kamrában egyesével haladnak el a lézer

fényforrás előtt. A sejtekről vagy a sejtpartikulákról a megvilágító fény kis és nagy szögben szóródik. Az áramlási citométer monokromatikus lézerfénysugarának kis szögben vagy előre szórt része (FSC = forward scatter) a sejtek méretével, a nagy szögben vagy oldalra szórt frakciója (SSC = side scatter) a sejtek fénytörésének inhomogenitásával (amit granularitásnak is nevezhetünk) arányos. Általában 10,000 sejtet gyűjtünk be és a vizsgálni kívánt sejtpopulációt digitalizált "kapuk" felhelyezésével jelöljük ki.

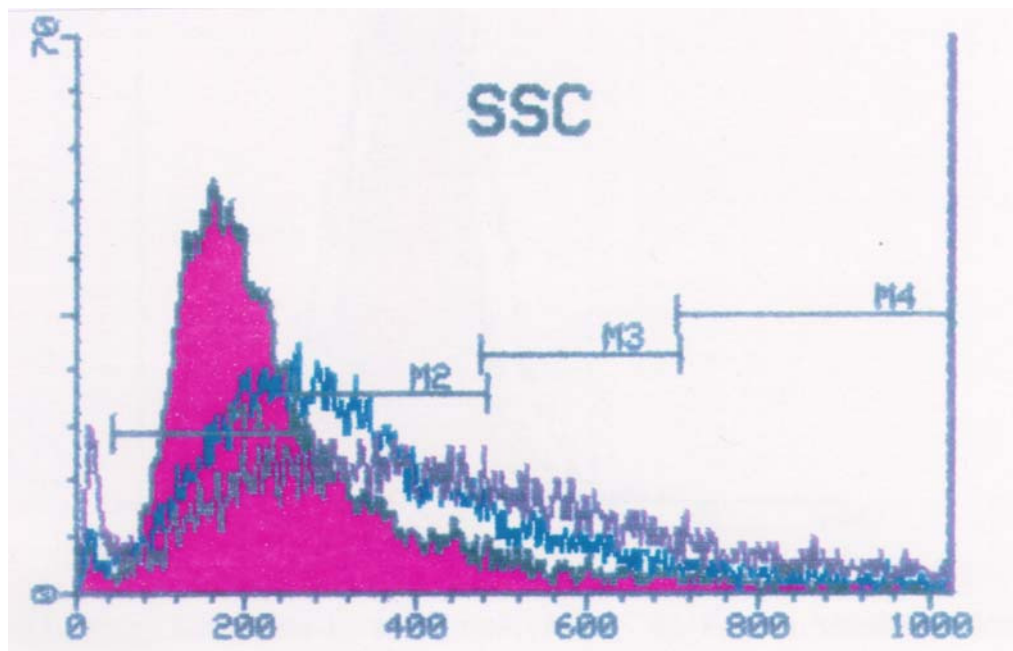
Két teljesen független (március 19-i és április 3-i) kísérletből származó sejteket vizsgáltunk. A műszerrel nyert regisztrátumokon ezen sejtek méretbeli eloszlását (FSC) és granuláltságát (SSC) láthatjuk. Elsőként (9. ábra) a sejtek méretbeli eloszlását mutatjuk be.



9. ábra. Kezeletlen, kontrol sejtek, valamint Ara-C-vel és Fenton reaktánsal kezelték méretbeli eloszlása, márciusi kísérlet.

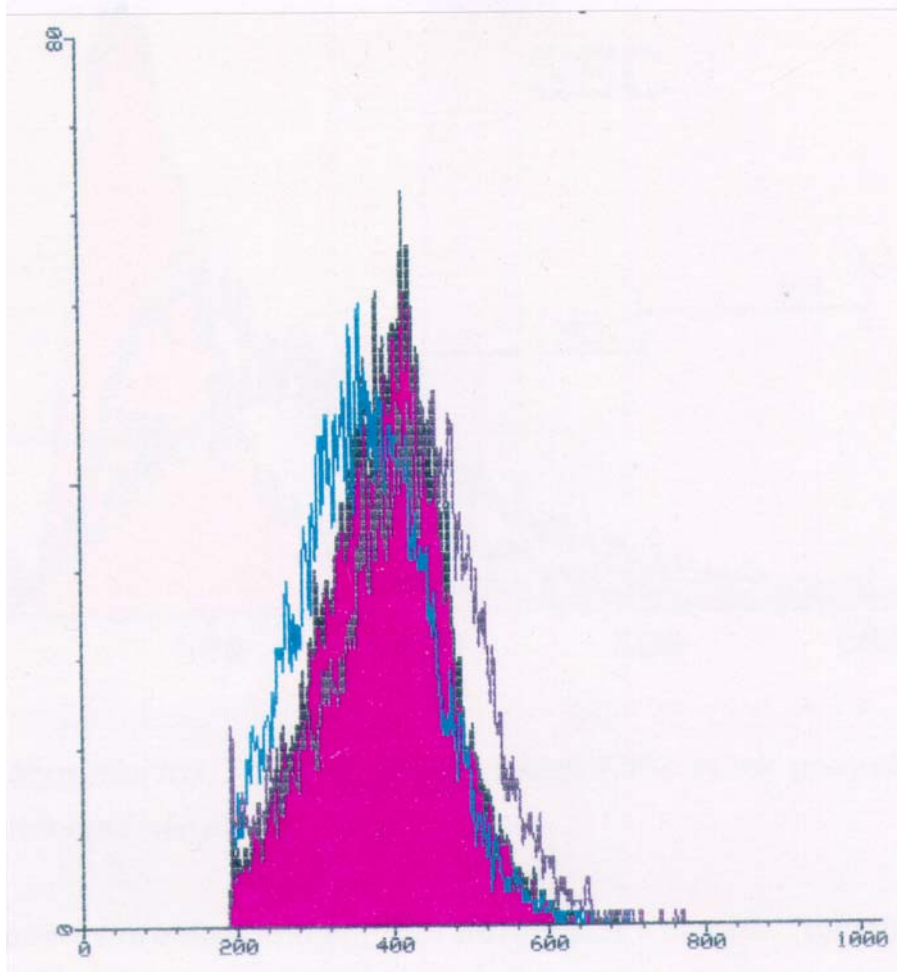
A sejtek méretének növekedése mindkét kezelt csoportban a kontrolhoz képest szembetűnő. A 9-12. ábrákon a kezeletlen sejtek (lilára satírozott görbealatti terület), valamint Ara-C (sötétlila színű görbe) illetve Fenton kezelés (tintakék görbe) hatásait mutatjuk be.

Ugyanezen tenyésztésből származó sejtek SSC grafikonját mutatja be a 10. ábra. Ezt követően ugyanilyen sorrendben a párhuzamos kísérlet eredményei láthatók (11. és 12. ábra).



10. ábra. Kezeletlen kontrol sejtek, Ara-C kezelték és $\text{OH}^\cdot$ szabadgyök fluxusnak kitett (Fenton kezelt) sejtpopuláció granuláltság szerinti eloszlása, márciusi kísérlet.

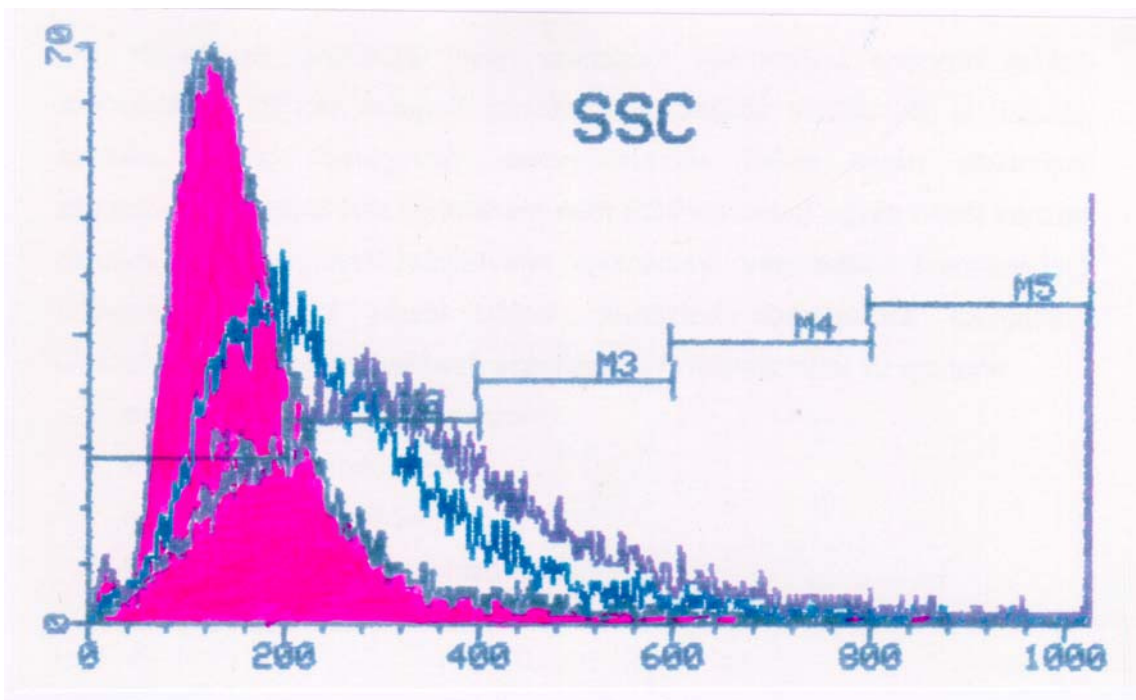
A sejtek belső állományának kompaktabbá válását, vagyis a granularitás növekedését a kezeletlen populációhoz képest szépen igazolja a 8. ábra három görbéje. Lilával itt is a kontrol, késsel a Fenton-kezelt és feketével az Ara-C-vel kezelt sejteket ábrázoltuk. Egyértelműen megállapítható, hogy a cytoplazmában olyan szerkezetbeli változások mentek végbe, melyek a differenciálódás velejárói, jelen esetben a hemoglobin felhalmozódása, ami megváltoztatta a sejtek viselkedését az adott flow-cytometriás üzemmódban.



11. ábra. Kezeletlen kontrol sejtek, Ara-C- és Fenton kezelték méretbeli eloszlása, az áprilisi kísérlet eredményei.

A görbék melyeket a 11. ábrán láthatunk a márciusival azonos módon kivitelezett kísérletek sejteinek méretbeli eloszlását mutatják. Tendenciájában az előző kísérlettel egyező eredményt kaptunk, vagyis mind Ara-C mind Fenton kezelés hatására az átlagos sejtméret növekedett.

A citoplazma kompaktságát mutatják a 12. ábra grafikonjai. Itt is tökéletes egyezésben van a két független kísérlet eredménye, vagyis mind a közismert differenciáltató szer, az Ara-C, mind a $\text{OH}\cdot$ szabadgyök-indukció fehérjeszintézist indukál a sejtekben, más szóval elindítja a differenciálódás folyamatát, ami erythroblastokban hemoglobin-szintézist jelent. Ezek az eredmények is további kísérleti bizonyítékokat képviselnek arra vonatkozóan, hogy a $\text{OH}\cdot$ szabadgyökök indukálni képesek a blaszt-sejtek differenciálódását.



12. ábra. Kontrol, Ara-C és Fenton kezelt K562 sejtek granuláltsága, áprilisi kísérlet eredményei.

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

A daganat típusú sejteken (HL-60, K562) kapott eredményeket más, lehetőleg primér humán sejtenyészetekre is ki kívántuk terjeszteni, azért, hogy általánosíthassuk megfigyeléseinket. Első lépésként egy széles körben tenyésztett és használt sejtre, a fibroblasztra esett a választásunk. Strabizmus műtétek során eltávolított szemizom darabból növesztettünk ki fibroblasztokat. Hamarosan kiderült, hogy ezek a sejtek ellentétben a daganattípusú sejtekkel, rendkívül lassan szaporodnak. Ez az jelenti, hogy a szövetdarab letételétől számítva körülbelül 1 hét múlva jelennek meg az első sejtek, és egy Petri-csészényi konfluens tenyészethez bizony körülbelül 6 hét kell. Ezt követően lehet az első tripszinezés után szétosztani a sejteket tenyésztő flaskskába, és miután ezekben elérték a kellő számot, a kezelésekhez csak akkor lehet hozzákezdeni. Természetesen megfelelő számú sejtekkel benövesztett flaskskára van szükségünk a párhuzamos minták biztosítása céljából.

Következő modellünk olyan szemizom volt melyet endocrin ophtal-mopathiás (EOP-os) betegek korrekciós műtétek során távolítottak el. Ezután szintén EOP-os betegekből dekompressziós műtét során eltávolított zsírszövetet, majd ehhez kontrollként nem EOP-os beteg egyéb okból végzett szemműtété során kivett zsírszövetet használtunk. Végezetül a szem-eredetű szövetek kontroljául alhasi bőrből növesztett fibroblasztok szolgáltak. Összefoglalva tehát a következő származású fibroblasztokat vizsgáltunk:

- nem EOP-os retrobulbáris izom,
- EOP-os retrobulbáris izom,
- nem EOP- os zsírszövet,
- EOP-os retrobulbáris zsírszövet,
- alhasi bőrszövet.

Meg kívánom jegyezni, hogy az "EOP-os szövet" kifejezés endocrin ophtalmopathiás beteg feltehetően autoimmun folyamatai által érintett szöveteit jelenti.

A primér fibroblasztokat a másodiktól a 12. passzázsig használtuk. Kísérleteink során minden kultúrát pontosan meghatározott és azonos sejtszámmal indítottunk. Megfigyeléseink szerint a kezeletlen kultúrákban a sejtszám 2x72 óra múlva elérte az $1,5-3 \times 10^6$ sejt / flaska értéket, míg a Fen-ton reakcióval kezelték mindössze $1-3 \times 10^5$. Ezt a proliferáció lassulást korábban vizsgált sejtvonalaknál is következetesen megfigyeltük. Az enzimaktivitás mérésekhez több párhuzamosan kezelt flaska tartalmát egyesítettük a kívánatos kb. 1×10^6 sejtszám eléréséhez.

Meg kell itt jegyezni, hogy a szaporodás lassulása mellett, jelentkeztek különböző sejtdifferenciálódással együttjáró morfológiai változások, úgymint a sejtek méretének növekedése és az intracelluláris mátrix kompaktabbá válása, mely olyan fokú, hogy normál fénymikroszkóppal is jól látható volt. A jelenséget a K562 sejteknél flow-cytometriás mérésekkel már bemutattuk.

A generált szabadgyököknek a fibroblasztokra kifejtett hatását a gyökfolyamatokban kulcsszerepet játszó két enzim, a kataláz és a SOD (szuperoxid dizmutáz) mennyiségének meghatározásával kezdtük.

A fibroblasztokban mért kataláz enzimaktivitás értékeit kétféle módon fejeztük ki. Úgymint: Unit kataláz/ 10^6 sejt, és Unit kataláz/ μg DNS. A fibroblasztok eredetét követő zárójeles szám a donorok száma.

5. táblázat. 2x72 órás kezelés után mért kataláz aktivitások Unit kataláz/ 10^6 sejt számra kifejezve.

Fibroblasztok származása	Unit kataláz / 10^6 sejt	
	Kontrol	Kezelt
Normál zsírszövet (5)	10.20 ± 0.16	16.10 ± 0.40
EOP zsírszövet (4)	10.75 ± 0.31	12.93 ± 0.29
Normál izom (4)	10.96 ± 0.20	25.32 ± 0.60
EOP izom (3)	17.63 ± 0.44	28.28 ± 0.98
Bőr (3)	11.43 ± 0.19	17.79 ± 0.26

Az 5. táblázatból kitűnik, hogy a különböző eredetű kezeletlen, kontrol fibroblasztok közel azonos kataláz aktivitás értéket mutattak, kivéve az EOP izomból kinőtt sejtek értékeit, melyek sejtszámra vonatkoztatva következetesen magasabbak voltak. A kezelés hatására azonban minden sejtféleségnél szignifikáns kataláz emelkedést találtunk.

6. táblázat. Kataláz aktivitások 2x72 órás kezelés után Unit kataláz/ μg DNS-re vonatkoztatva.

Fibroblasztok származása	Unit kataláz / μg DNS	
	Kontrol	Kezelt
Normál zsírszövet (5)	1.32 ± 0.07	2.10 ± 0.13
EOP zsírszövet (4)	1.37 ± 0.09	3.34 ± 0.29
Normál izom (4)	1.22 ± 0.03	3.04 ± 0.14
EOP izom (3)	1.40 ± 0.23	3.50 ± 0.68
Bőr (3)	1.61 ± 0.15	2.56 ± 0.10

Amikor a kataláz aktivitásokat Unit kataláz / μg DNS-ben fejeztük ki, ezt mutatja a 6. táblázat, a különböző fibroblaszt típusok kataláz értékei közelebb

kerültek egymáshoz. A Fenton kezelt sejtpopulációk szignifikánsan ismét emelkedést mutattak.

7. táblázat. SOD aktivitások 2x72 órás Fenton kezelés után, $\mu\text{g SOD}/10^6$ sejtszámmra vonatkoztatva.

Fibroblasztok származása	$\mu\text{g SOD} / 10^6$ sejt	
	Kontrol	Kezelt
Normál zsírszövet (5)	13.92 ± 0.42	18.83 ± 0.43
EOP zsírszövet (4)	7.84 ± 0.36	9.83 ± 0.21
Normál izom (4)	4.41 ± 0.11	6.24 ± 0.21
EOP izom (3)	18.28 ± 0.77	23.62 ± 0.13
Bőr (3)	2.72 ± 0.07	4.77 ± 0.33

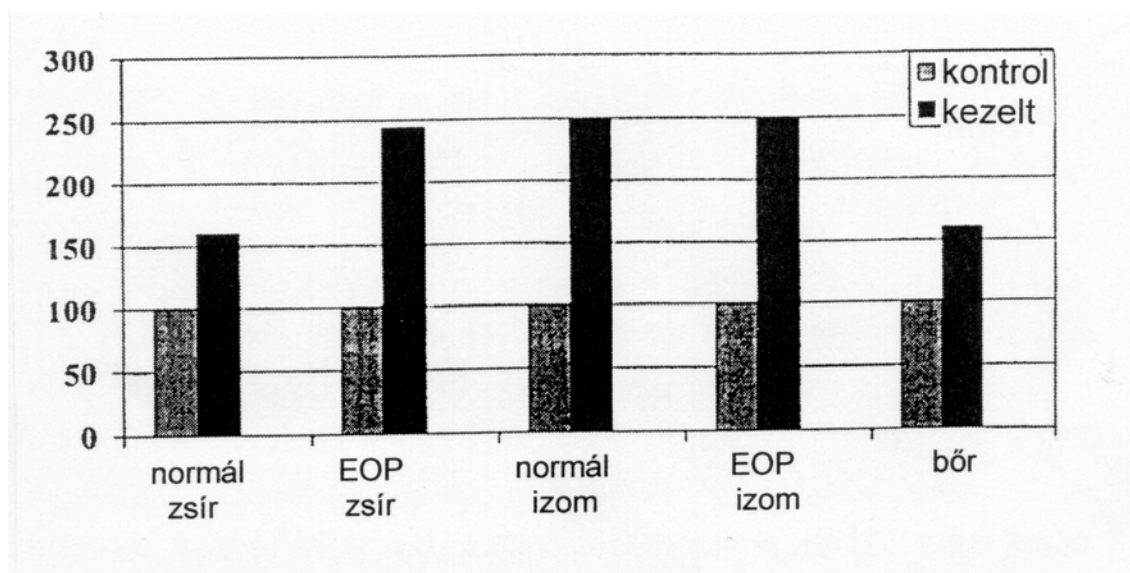
A tenyésztett fibroblasztjaink SOD aktivitásai (7. táblázat) a kontrol csoportban széles tartományban széthúzódtak, aminek a magyarázatát nem ismerjük. Azonban a Fenton kezelt kultúrák, összehasonlítva a kontrolokkal, minden esetben szignifikáns növekedést mutatnak.

8. táblázat. Kontrol és kezelt fibroblasztok SOD aktivitását tüntettük fel $\text{ng SOD}/\text{ng DNS}$ egységben kifejezve.

Fibroblasztok származása	$\text{ng SOD} / \text{ng DNS}$	
	Kontrol	Kezelt
Normál zsírszövet (5)	1.72 ± 0.06	2.31 ± 0.12
EOP zsírszövet (4)	1.00 ± 0.06	2.55 ± 0.24
Normál izom (4)	0.51 ± 0.02	0.73 ± 0.03
EOP izom (3)	1.36 ± 0.14	2.58 ± 0.28
Bőr (3)	0.39 ± 0.04	0.68 ± 0.01

A SOD aktivitások mint azt a 8. táblázat mutatja, ebben az összefüggésben is széles tartományt ölelnek fel a kontrol csoportnál néhány sejttípus esetében A Fenton kezelt csoport ellenben mindegyik sejttípusnál szignifikáns emelkedést mutat a DNS mennyiségére vonatkoztatva.

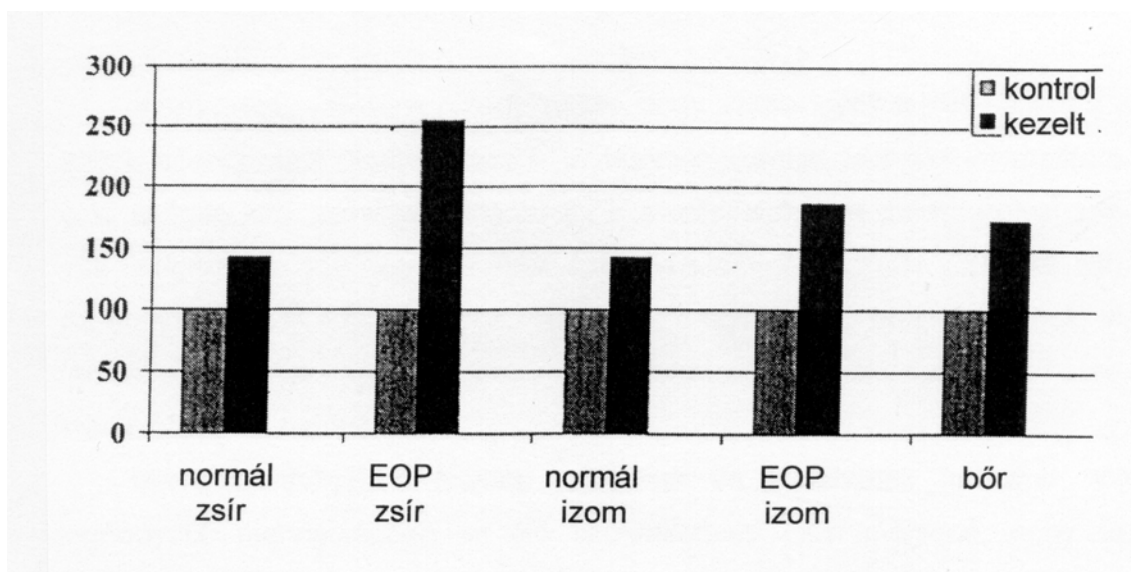
Az enzimszint változások szemléletesebbé tételére, a táblázatokban szereplő adatokból a kataláz enzimaktivitás változását a kezelt csoport esetében DNS-re vonatkoztatva ábrázoltuk úgy, hogy a kontrol csoportot 100%-nak tekintettük, ezt láthatjuk az 13. ábrán.



13. ábra. Kezelt fibroblasztok kataláz aktivitásai a kontrol csoport százalékában kifejezve.

A kataláz enzimaktivitási szintek a kezelések hatására jelentősen megnövekedtek. Ez a növekedés 43.8-150.0 % között változik, s minden esetben statisztikailag erősen szignifikánsnak adódott.

A katalázhoz hasonlóan SOD esetében is készítettünk egy szemléletesebb összehasonlítást a kontrol és kezelt csoport között.



14. ábra. SOD változása a kezelt csoportban, a kontrolokat 100 %-nak tekintve.

A grafikonon, melyet a 14. ábra mutat be, megfigyelhetjük a SOD változásának tendenciáját, amely a katalázéval megegyező.

Összefoglalva a két enzim méréséből származó eredményeket, a SOD és kataláz génexpressziójának növekedését tapasztaltuk gyökkezelések hatására. Korábbiakban csak malignus sejtvonalakon (HL-60, K562, PC-12, stb.) vizsgáltuk a Fenton kezelés hatását, de ezek a humán primér fibro-blasztok kiterjesztik ismereteinket a nem-malignus tulajdonságú sejtekre is, s így lehetőségünk nyílik a gyökökről szerzett megfigyeléseink általánosabbá tételére. Jóllehet a finomabb mechanizmusok feltárása még hátra van, véleményünk szerint azt biztosra vehetjük, hogy ennek a két enzimnek megnövekszik a génexpressziója, ami egyet jelent a gyökök turnover-ének a megnövekedésével, s ez a jelenség alapvető szerepet játszhat a sejt differenciálódás mechanizmusában. Erre egyértelműen utal az a tény, hogy kémiai teljesen különböző differenciálódást indukáló szerek esetében is ugyanezen tendenciák figyelhetők meg.

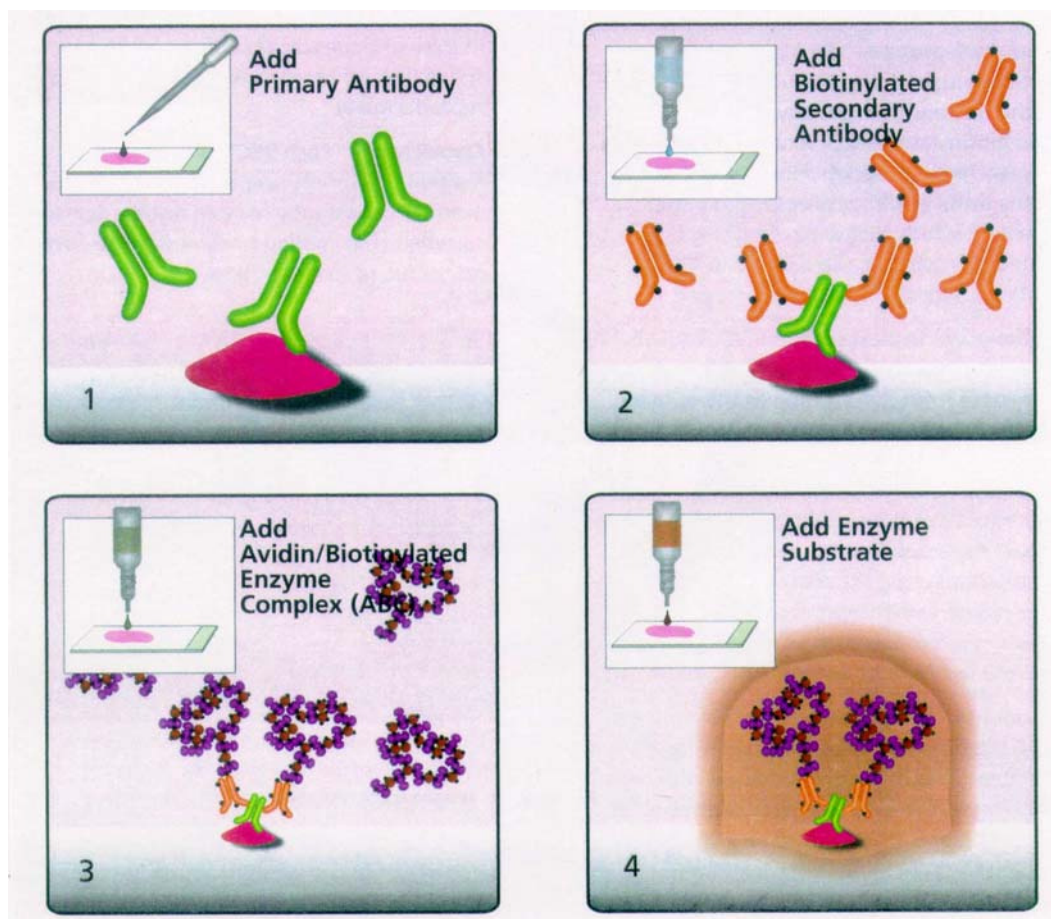
Sejtproliferációs vizsgálat Ki-67 proliferációs magantigén immunhisztokémiai kimutatásával

Azon megfigyelésünk bizonyítására, hogy szabadgyök fluxus hatására a sejtek szaporodási üteme lelassul, immunhisztokémiai technikával proliferációs antigén kimutatást végeztünk. Az immunhisztokémia módszereivel szöveti antigének in situ detektálhatók, specifikus antigén-antitest kötés alapján. Az immunkötődés mikroszkópos vizsgálatát a rendszerbe épített enzimek, ill. fémkolloidok színes terméket eredményező katalitikus reakciója, vagy fluorkrómok teszik lehetővé.

Mivel a fehérjék a legjobb antigének és a fehérjék fordulnak elő legnagyobb mennyiségben az élő szervezetben, nem meglepő, hogy az immunhisztokémia elsősorban a fehérjék és ezek szénhidrátokkal és lipidekkel alkotott molekulái lokalizációjának speciális eszköze. Egy antitest-klón a fehérjemolekulán általában egy 8-15 aminosav szekvenciájával jellemzett un. antigén epitópot ismer fel. A kötés specitását egyenként kisenergiájú, nem-kovalens kötőerők koncentrált megjelenése jellemzi. Egy több száz aminosavból álló fehérje pl. számtalan eltérő epitópján keresztül ismerhető fel.

Az immunhisztokémiai reakciósor első lépésében enyhe koagulációs szövetrögzítést kell alkalmazni, sejt és szövettenyészet esetében erre az acetont a legalkalmasabb. Ezután az endogén peroxidázokat blokkoljuk, meta-nolos, 0.5%-os hidrogénperoxiddal. Az antitest és a metszet között nemcsak antigénspecifikus kapcsolat alakulhat ki, ezért az immunreagensek alkalmazása előtt a metszet nonspecifikus kötőhelyeit nagy koncentrációjú indifferens fehérjével telítenünk kell, erre a célra vagy 1.5%-os BSA-t vagy normál állati szérumot (legtöbbször a második antitestet szolgáltató állatfajból) használunk. Ezzel a metszet készen áll a tényleges antitest-antigén reakcióra. A ma a legelterjedtebb rutin eljárás alapja, az avidin-biotin kötés nagy affinitása és stabilitása. A biotin kis molekulatömegű (244 dal) vitamin (H-vitamin). A streptavidin (~60KD), mely 4 biotinmolekulát képes megkötni a *Streptomyces avidinii* tenyészetből izolálható. A módszer három inkubációs lépésből áll: 1. primér antitest, 2. biotinnal jelölt kapcsolódó antitest 3. S-ABC komplex. Az S-ABC komplexet streptavidin és biotinilált peroxidáz 1:3 arányú keveréke adja. A reakciótermék láthatóvá tételére immunoperoxidáz reakciók esetén H_2O_2 szubsztrátot és DAB barna, vagy AEC vörösbarna

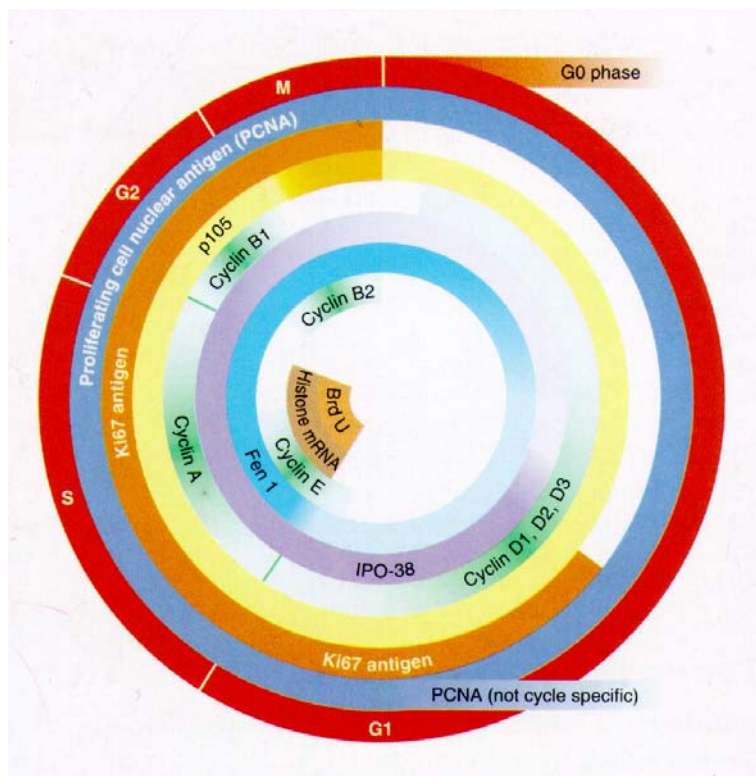
kromogént használunk. A reakcióban elbontott szubsztrát oxidálja az elektrondonor kromogént, melyből rosszul oldódó polimerizált csapadék válik ki, jelezvén a reakció lokalizációját és intenzitását. Befejezésül a metszeteket le kell fedni, a DAB-al festetteket víztelenítés után, míg az AEC-vel festetteket vizes lefedéssel (Krenács, 2000).



15. ábra. Az ABC módszer lényege. A reakció sémáját ábrázoló rajtot a Vector Laboratories 2001/2002 évi katalógusából idézzük.

Tenyésztett és szabadgyök-kezelt szemizomból kinövesztett fibro-blasztjaink vizsgálatára a proliferációs mag-antigének közül azért választottuk a Ki-67 antigént, mert retrobulbaris fibroblasztok szaporodási folyamatának nyomon követésére Heufelder és Bahn (1994) ezen proliferációs antigént már sikerrel alkalmazta. Eredményeiket parallel végzett egyéb proliferációt kimu-tató módszerekkel, úgymint triciált timidin-inkorporáció meghatározás, mono-klonális ellenanyag immunohisztokémiai assay direkt proliferációs sejtmag antigénre, és egy automata kolorimetriás enzim-kötés immunosorbent assay (Promega)

használták össze, és nem találtak szignifikáns eltérést az alkalmazott metodikák között. A Ki-67 antigén kimutatás alapja, hogy ez a proliferációs antigén jelen van minden proliferáló sejtben vagyis a G_1 , S, M és G_2 fázisokban, de az intermitotikus sejtekben vagyis a G_0 fázisban nem található.

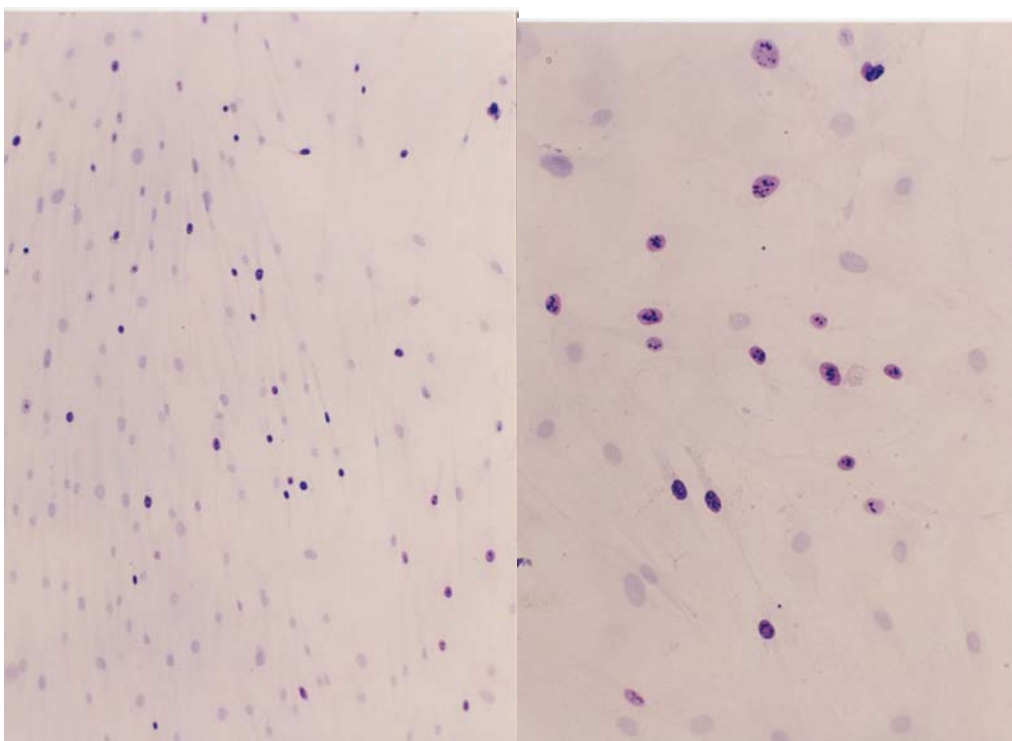


16. ábra. Ki-67 antigén jelenléte a sejtciklus során. Az ábrát a Novocastra Laboratories Ltd. 2001. évi katalógusából idézzük.

Az immunhisztokémiai reakció kivitelezéséhez a fibroblasztjainkat 80 %-os konfluencia eléréséig 10 % FBS tartalmú médiumban növesztettük. Ezt 24 órás 0.1 %-os FBS tartalmú médiumban történő növesztés követte, majd egy 24 órás komplett savó mentes periódus. Ezt az előkészítést szinkronizációnak nevezzük. Az így szinkronizált sejtpopulációt kezeltük Fenton reaktánsal 0.1% savót tartalmazó médiumban. Az egész protokoll egy igen speciális tenyésztő-festő "küvetében" történt, mely egy tárgylemezből és az arra rögzített kétkamrás fedéllel rendelkező tenyésztő edényekből áll, melynek térfogata kb. 2x3 ml.

Ez a konfiguráció lehetővé tette, hogy a tárgylemezre növesztett sejteken egyszerre lehetett kontrol és kezelt sejtcsoportot kialakítani, és a megszokott módon széndioxid termosztátban tenyészteni őket, s a kísérlet végén a kamra-rész leválasztásával, olyan lett, mint egy közösleges tárgylemez. Fantasztikus találmány, csak sajnos számunkra szinte megfizethetetlenül drága.

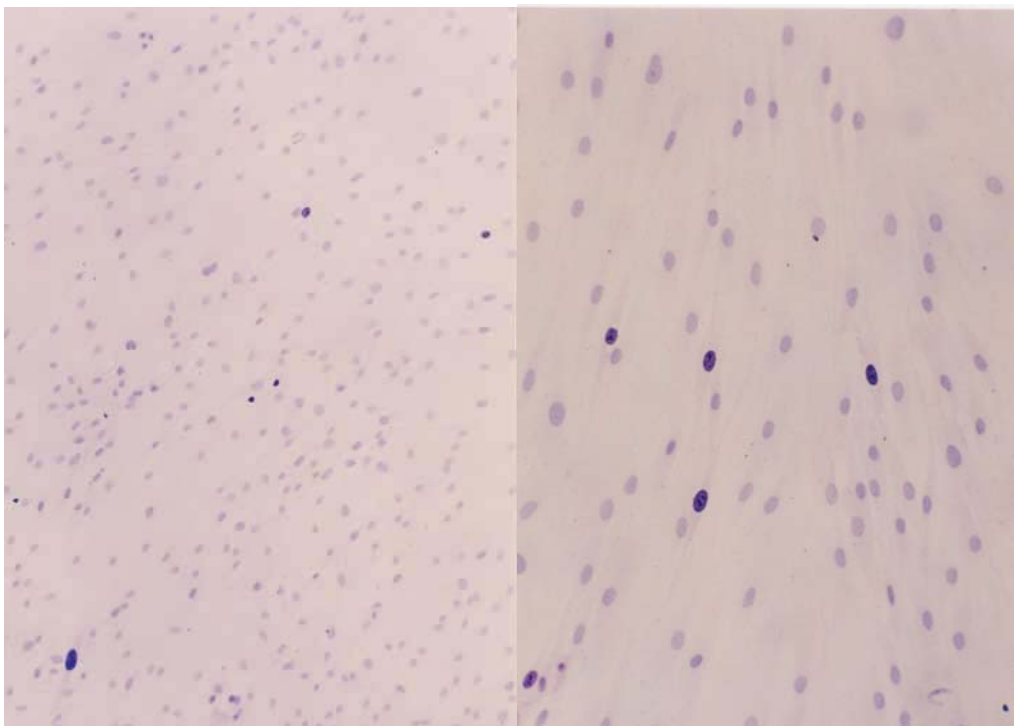
A kezelési periódus végén a sejteket fixáltuk és elvégeztük a Ki-67 proliferációs antigén immunhisztokémiai kimutatását. Az általunk tenyésztett kontrol fibroblasztoknak melyeket a 17. és 18. ábrán mutatunk be kb. 40-50 %-a mutatott pozitivitást.



17. és 18. ábra. Kontrol és kezeletlen sejtek Ki-67 pozitivitása.

A Fenton-kezelt sejteknél a Ki-67 antigén-pozitív sejtek számának csökkenése jól látható, ami a proliferáció lassulásának a jele, s a differenciálódás első lépcsője.

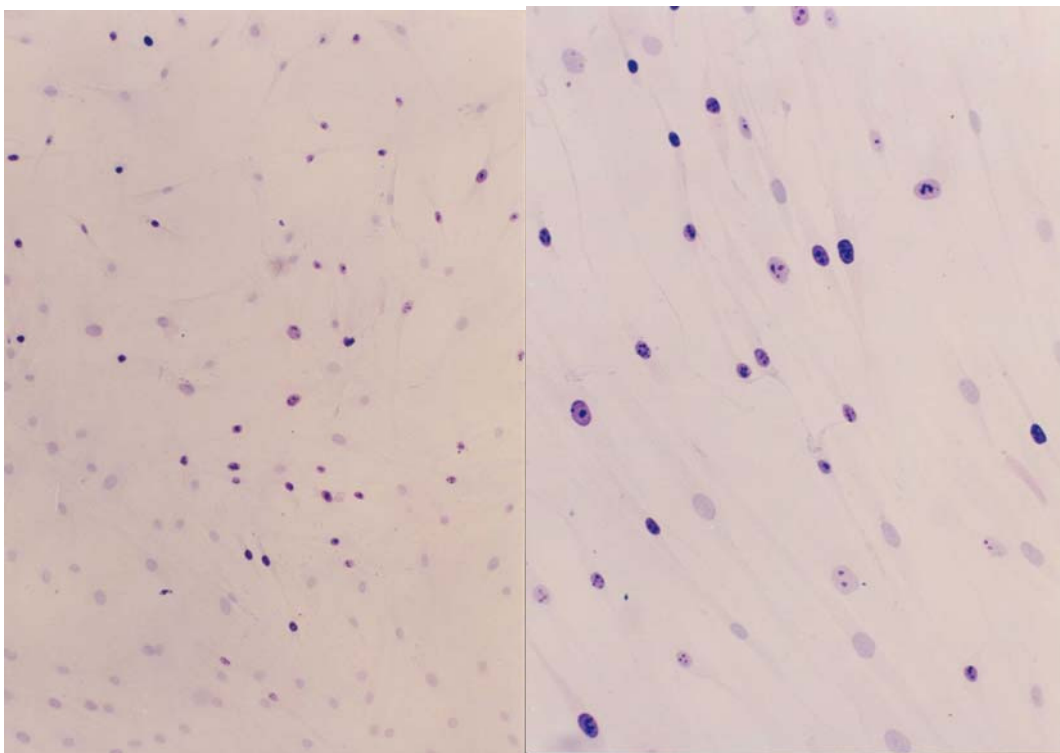
A EOP-os betegből származó kezeletlen fibroblasztok proliferációjukat tekintve, mint azt a 21. és 22. ábrán láthatjuk nem mutattak eltérést a normál, egészséges, kontrolhoz képest.



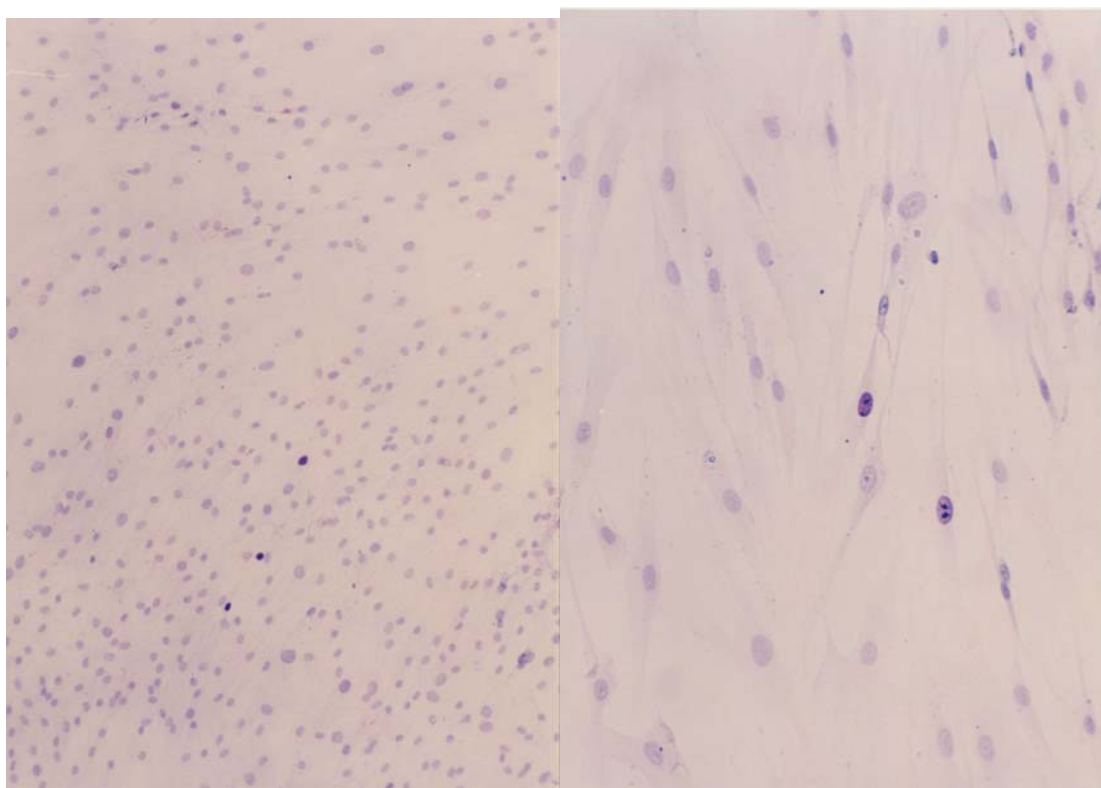
19. és 20. ábra. Kontrol sejtek Ki-67 pozitivitása Fenton kezelés után.

A EOP-os betegből származó fibroblasztok Fenton kezelés után szintén jelentős proliferációs aktivitás-csökkenést mutattak (23. és 24. ábra), ami véleményünk szerint jelen esetben a sejt differenciálódás megindulásának első fázisa.

Meg kell itt jegyezni, hogy a mi sejtjeink Ki-67 pozitivitás értékei sohasem emelkedtek 50 % fölé, míg Heufelder és Bahn (1994) az általuk tenyésztett retrobulbáris fibroblasztoknál szinkronizáció után a sejtek 85%-ban talált Ki-67 pozitivitást. Személyes konzultáció során Prof. Heufelder ennek a különbségnek az okát az általuk használt különleges minőségű, ú.n., Hyclone savó-nak tulajdonította, amihez mi, ugyancsak anyagi okokból nem jutottunk hozzá. Az eltérő számszerűség azonban az általunk megfigyelt tendenciákat nem érinti.



21. és 22. ábra. EOP-os beteg szemizmából származó fibroblasztok Ki-67 pozitivitása kezeletlen állapotban.



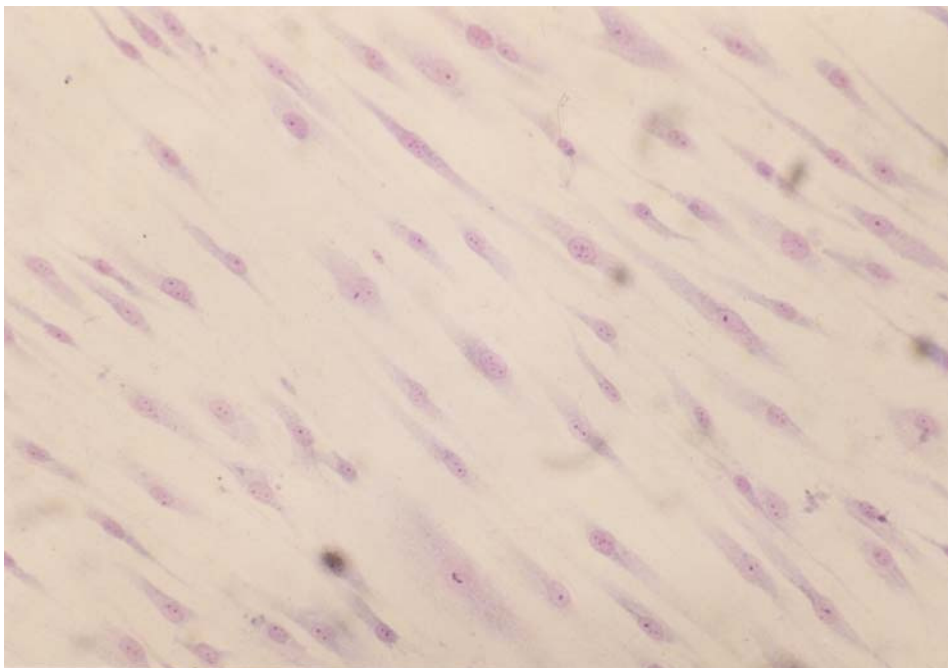
23. és 24. ábra. EOP-os beteg szemizmából származó fibroblasztok Ki-67 pozitivitása Fenton kezelés után.

Ismert tény, hogy a retobulbáris fibroblasztok bizonyos körülmények között nagy mennyiségű GAG produkcióra képesek (Smith et al., 1991). EOP-ban a fokozott GAG termelésének és a GAG-ok rendkívüli vízkötőképességének igen fontos szerepet tulajdonítanak a tünetek (exophthalmus) kialakulásában (Kahaly et al., 1992). Ennek ismertetébe azt kívántuk megvizsgálni, hogy in vitro körülmények között, szabadgyök kezelés hatására a retrobulbáris fibroblasztokban fokozódik-e a GAG-ok produkciója. Ennek tanulmányozására a fibroblasztokat különböző ideig Fenton reaktánsokkal kezeltük s ezután a sejteken GAG-kimutatást végeztünk 1,9-dimetilmetilénkék (DMB) festékkel, amely a GAG-okkal kékeslila metakromáziás színreakciót ad.

Mivel hosszantartó, 3 hónapos kezelések eredményét is szeretnénk volna detektálni, ezt a hisztokémiai reakciót in situ vagyis a tenyésztő flaskában kellett elvégeznünk. A kísérleti periódus lejártakor a sejteket a tenyésztő flaskában (T/75) fixáltuk, és utána a flaska oldallemézét körbevágtuk, majd lebontottuk az egész

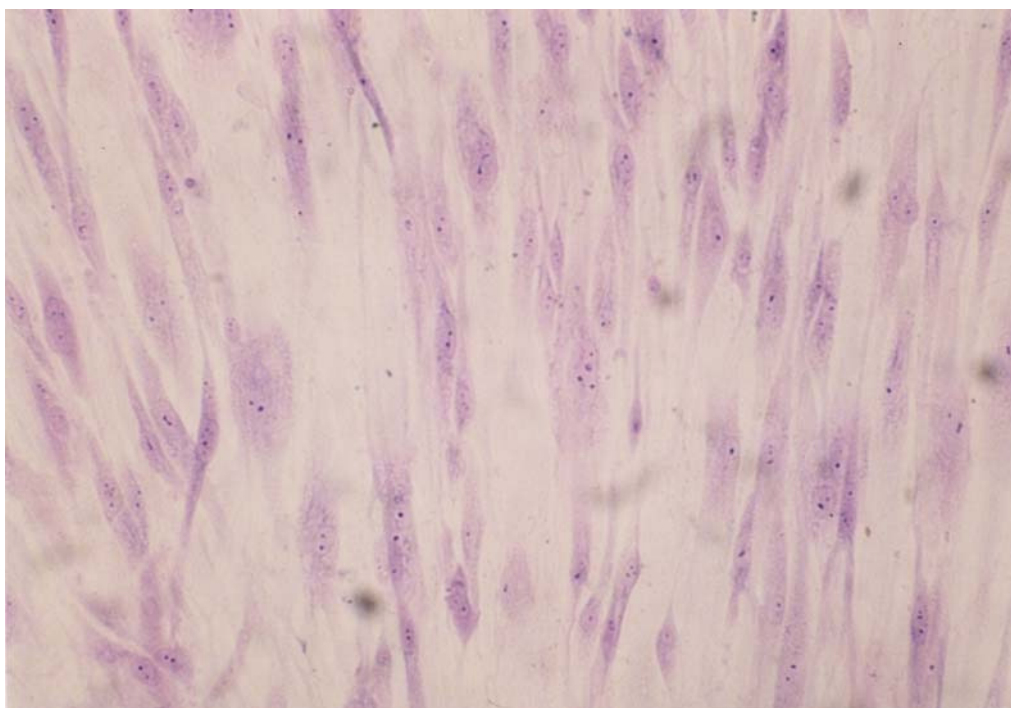
felső részt a nyakkal együtt. Így egy nagy „tárgylemezt” kaptunk melyen a festés könnyedén kivitelezhető volt és utána a lefedést is meg lehetett oldani.

A következő ábrákon EOP-os betegből vett izomból kinőtt fibroblasztok GAG termelését mutatjuk be. A dimetilmetilénkék (DMB) festés az eredeti tenyésztőfelületen történt.

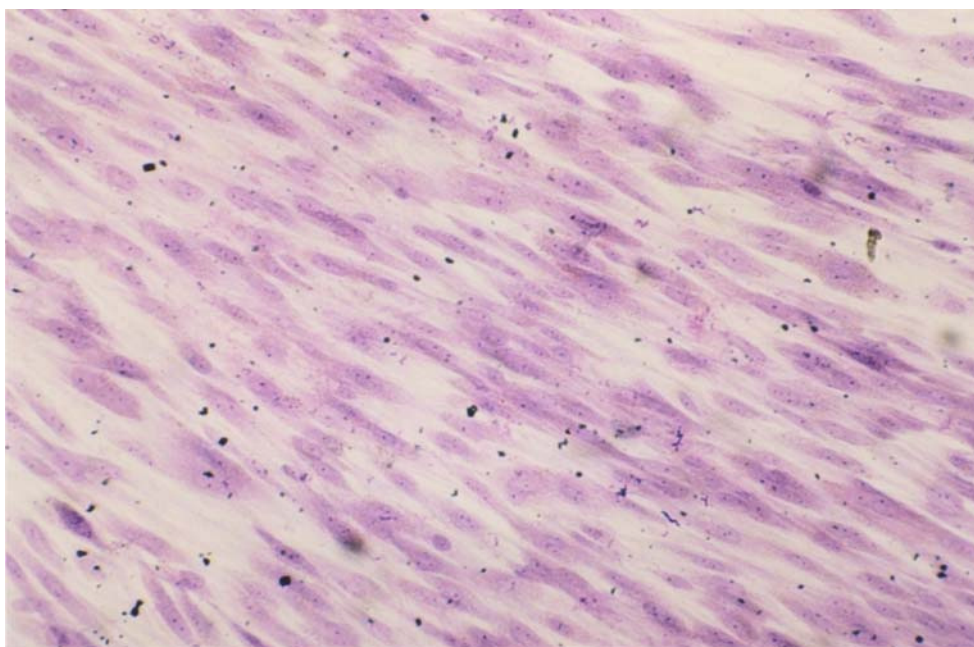


25. ábra. DMB reakció kezeletlen kontrol fibroblaszt tenyészetben.

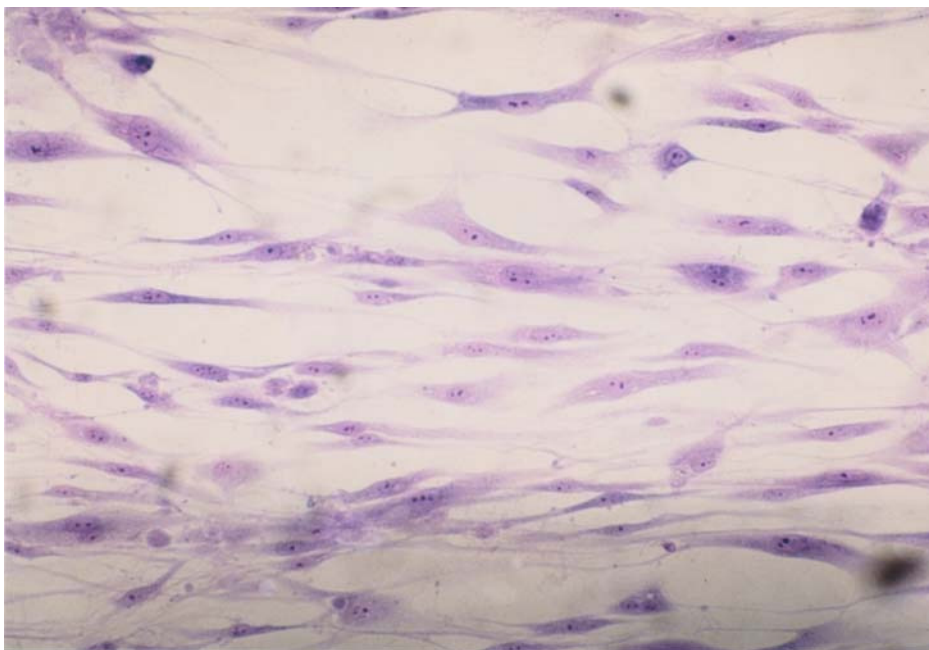
Kezeletlen kontrol fibroblaszt tenyészetekben a DMB festődés csak igen kismértékű metakormáziát mutat, ami arra utal, hogy ebben a fázisban a GAG termelés még igen alacsony szintű (25. ábra). Egy hetes időtartamú OH-szabadgyök fluxus hatására a fibroblasztokban szintetizálódott GAG-ok „mennyiségét” mutatja a 26. ábra, ahol jól látható, hogy a metakromáziás festődés intenzitása lényegesen kifejezettebb, mint a kezeletlen kontrol tenyészetekben. Tovább folytatva a kezelést egy hónapig, ez a tendencia tovább erősödik, s ugyanakkor a sejtek már morfológiai eltéréseket is mutatnak (27. ábra), 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, s ugyanakkor erős GAG-pozitivitással is társul (28. ábra).



26. ábra. Egy hétig Fenton reaktánszal kezelt tenyészet GAG tartalmának DMB reakciója.



27. ábra. Egy hónapos Fenton kezelés hatására a fibroblasztokban termelődött GAG-ok DMB reakciója.



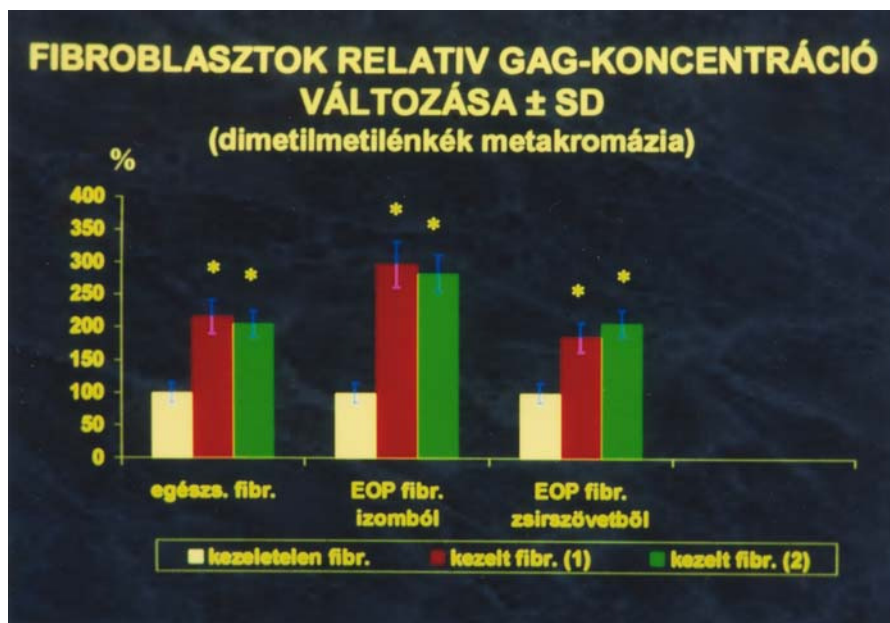
28. ábra. Három hónapig OH⁻ gyökökkel kezelt tenyészet GAG metakro-máziás festése.

Ezek a vizsgálatok jól mutatják a retrobulbáris fibroblasztoknak azt képességét, hogy szabadgyök kezelés hatására, vagyis differenciálódásuk során, még erősebben képesek GAG-okat szintetizálni, mint a differenciálatlan fibroblasztok. Ez a megfigyelés fontos adalék lehet a retrobulbáris térfogatonövekedés pathomechanizmusának megértésében, mivel a GAG-ok egy része az extracelluláris térben is képes jelentős duzzadásra.

A sejtek GAG produkciójának számszerűsítésére kvantitatív spektrofotometriás GAG meghatározást végeztünk. A módszer lényege a következő: szövetekből vagy tenyésztő médiumból papainos feltárással glükózamino-glikán oldatot készítünk. A feltárt mintákból készített aliquotokat összekeverjük a DMB festékkel. A reakció mérhetőségét az abszorpció maximum metakro-matikus shiftje teszi lehetővé, melynek oka a festéknek a szulfatált glükóz-amino-glikánokkal alkotott komplexe. A módszer előnyei a következők: a DMB reagens stabil, a módszer lényegében interferenciamentes és érzékenysége kisebb mint 1 µg/l (Farndale et al., 1982).

Spektrofotometriás méréshez kezeletlen és egy hétig Fenton reaktánsal kezelt két féle fibroblasztot, retrobulbáris izomból származót és szintén retrobulbáris eredetű, de zsírszövetből növesztett sejteket dolgoztunk fel. A

fibroblasztokat papain-acetylcystein segítségével feltártuk. Az így kapott oldat GAG tartalma a hozzáadott dimetilmetilénkéssel liláskék színreakciót ad, melynek intenzitását spektrofotométerrel 535 nm-en mértük. A mért glükózaminoglikán tartalmat sejtszámra vonatkoztatva, relatív egységben adtuk meg, 100 %-nak véve a kezeletlen kontrol sejtek GAG tartalmát.



29. ábra. Kezeletlen kontrol és két különböző eredetű egyhetes Fenton kezelt fibroblaszt GAG tartalma. Ábrázoláskor a kontrolok GAG tartalmát 100 %-nak vettük.

A 29. ábrából 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 endocrin ophtalmopathia (EOP) az orbiták autoimmun betegsége, mely legtöbbször Graves-Basedov kórhoz társul. Az EOP és GB gyakori együttes előfordulása ismeretében kézenfekvő lenne a szemészeti elváltozásokat is ugyanazon autoimmun folyamat következményének tekinteni. A pajzsmirigy funkcionális eltéréseinek hozzájárulása a szemtünetek súlyosságához egyértelmű, az EOP-nak azonban az emelkedett pajzsmirigy hormonszint közvetlenül nem okozója. A GB súlyossága és az EOP prevalenciája közötti kapcsolat nem szoros (Bomberg, et al., 1992). Ugyan-akkor számos vizsgálat rámutatott arra, hogy a thyreostatikus kezelést követő hypothyreosis kapcsolatban van az EOP gyakoribb előfordulásával és/vagy a szemtünetek súlyosbodásával (Bomberg et al., 1992). Ebben feltehetően a hypothyreosis okozta emelkedett TSH szintnek lehet szerepe. Az orbitában zajló autoimmun folyamat az orbita komponenseinek térfogatnövekedését eredményezi. Az exophtalmus tüneteinek létrejöttében különösen fontos szerep jut a retrobulbáris kötőszövet felszaporodásának, ami érinti a perimy-sialis kötőszövetet, valamint az orbitában futó képleteket körülvevő laza rostos kötőszövetet is. Ez utóbbi jelentős mennyiségű zsírsejtet is tartalmaz (Hansen et al., 1993).

Mivel az orbita ürege csontos, a megnövekedett tömegű zsír-szövet komprimálja a hajszálereket, továbbá rontja az autoimmun jellegűnek tartott steril gyulladásos folyamat során kialakult lymphocytás infiltráció miatt egyébként is duzzadt extraocularis izmok vérellátását, vagyis fokozza a perimysealis ödémát. E folyamatok következtében jön létre előbb a proptosis, később az exophtalmus, és a nervus opticus kompressziója is. Ez utóbbinak következménye a kettőslátás és a látásélesség csökkenése. A kórkép különlegessége, hogy az exophtalmus állapota gyakran fennmarad az endokrin alapp probléma (hyperthyreosis) rendezése után is.

Az exophtalmus fenntartásában rendkívüli jelentősége van a retrobulbáris zsír-szövet hyperpláziájának, ami jelen ismereteink szerint megfordíthatatlannak látszik, s ezért nem "múlik el" ez a tünet a későbbiekben sem. Végeredményben az exophtalmust általában sebészi megoldás útján szokták megszüntetni, amikor is eltávolítják a felesleges zsír-szövet jelentős hányadát, decompressió műtét során.

A megnövekedett tömegű zsírszövet eredete és felszaporodásának oka azonban mindmáig ismeretlen. A kérdés vizsgálata megkívánja a zsírsejtek fejlődésére vonatkozó ismereteink rövid áttekintését.

A zsírsejtek eredetét tekintve ellentmondásos felfogások léteznek az irodalomban, amelyeknek két fő formáját lehet megkülönböztetni. Flemming (1870, 1871, 1879) azon a véleményen volt, hogy az összes differenciálatlan kötőszöveti sejt képes zsírt akkumulálni, s ezekből alakul ki a zsírszövet. Ezt a koncepciót többen is vizsgálták kísérletileg a különböző időszakokban, de igazából nem nyert teljes elfogadást (Clark és Clark, 1940; Green és Kehinde, 1974, 1975, 1976; Green és Meuth, 1974).

Az elméleti megközelítések másik csoportja ugyancsak a 19-ik századra nyúlik vissza. E szerint zsírákkumulációra csak a fibroblasztoknak egy specializálódott fajtája képes, s ezen sejtekből fejlődik ki a zsírszövet (Toldt, 1870, 1888). Ezt a felfogást több kísérletes vizsgálati eredmény látszott alátámasztani: Napolitano (1963) elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján, mások pedig biokémiai és sejtenyészési technikák alkalmazásával jutottak hasonló következtetésre (Sidman, 1965; Néhad et al. 1983; Nnodim, 1987; Gamou et al., 1990; Brooks és Perosio, 1997). Ennek megfelelően ma az az általános nézet, hogy fibroblasztoknak zsírsejtté történő differenciálódását csakis speciális sejtvonalakon lehet elérni, s akkor is különleges kezelésekre van szükség ahhoz, hogy ezt elérjük. A következő ágensek inhibitor hatását ismerjük: isobutylmetilxantin (IBMX), dexamethason, inzulin, biotin, (Student et al. 1980), prostaglandin I₂ (PGI₂ vagy prostacyclin), (Catalioto et al. 1991; Vassaux et al. 1992), thyroid hormon (Gharbi-Chihi et al. 1991), nátrium butirát (Toscani et al. 1990), aszcorbinsav (Ono et al. 1990), aldoszteron (Rondinone et al., 1993), progeszteron (Rondinone et al. 1992), arachidonsav (Gaillard et al. 1989), AD4743 (Sparks et al. 1991), bezafibrát (Brandes et al. 1990), pioglitazon (Sandouk et al. 1993), 3-deazaadenozin (Chiang 1981), TNF α (Cornelius et al. 1988; Filipak et al. 1988; Gimble et al. 1989; Pape és Kim 1988) TGF β (Gimble et al. 1989; Sparks et al. 1992) forbol észter (Diamond et al. 1977), retinoic sav (Stone és Bernlohr 1990) endothelin-1 (Tanahashi et al. 1991) dehidroepiandroszteron (Shantz et al. 1989), epidermális növekedési faktor (Serrero 1987; Serrero és Mills 1991) DMSO (Wang

és Scott 1993), interleukin 1α (Gimble et al.1989) 1β és 1γ (Delikat et al. 1993; Gregoire et al. 1992) és PGF2 α (Serrero 1987).

Egy ilyen "zsírsejt-fejlesztő" protokoll szerint a kiválasztott fibroblasztok (pl. 3T3-L1) tenyésztéséhez ezekből az ágensekből összeállított speciális kombinációt (IBMX, dexamethason, inzulin, biotin) szükséges a tenyésztethez adni a triglicerid szintézis elindításához (részleteket lásd: Gamou et al. 1990). Ismét más szerzők a humán orbitális fibroblasztok preadipocita átalakulását IBMX, dexamethason, proszttaglandin és TSH hozzáadásával tartják elérhetőnek (Sorisky et al. 1996).

A preadipocytákban jelen lévő triglicerid cseppecskéket a zsírok kimutatására alkalmazott hisztokémiai reakciókkal lehet kimutatni. Általánosan használt zsírkimutatási módszer, fagyasztott szövettani metszetekre az Oil red O festés. A kimutatás alapja, hogy a piros színű festék izopropanolos oldata megfesti a triglicerideket.

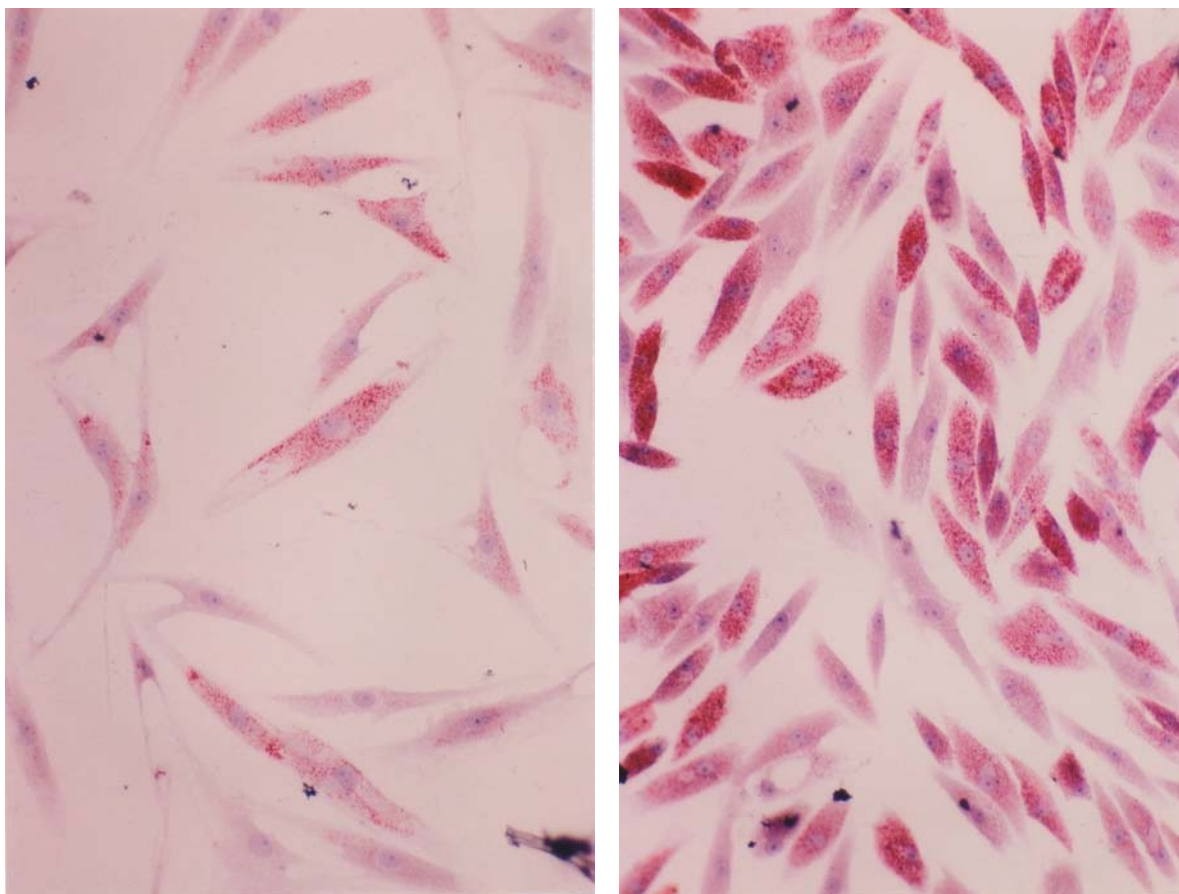
Orbitalis fibroblasztokon Smith et al. (1995) és Sorisky et al. (1996). írtak le speciális zsírdifferenciáltató protokollt, mellyel a fibroblaszt-preadipocita átmenet lehetőségét vizsgálták. Az általuk leírt metodikát kívántuk mi is alkalmazni, amikor első lépésként, zsírdifferenciáltatás nélkül, a szokványos módon tenyésztett retrobulbáris fibroblasztjainkon és bőr eredetű fibroblaszton elkezdtük az Oil red O festés technikai beállítását. Első próbálkozásaink különböző (üveg vagy műanyag) felületeken tenyésztett sejteken magán a tenyésztőfelületen végzett rögzítés után történtek. E kísérletek során két rendkívül érdekes dolgot tapasztaltunk, amelyek a fenti irodalmi adatokkal jelentős ellentmondásba kerültek.

Az egyik megfigyelésünk az volt, hogy **differenciáltató ágensek használata nélkül is jelentős intenzitású zsírfestődést láttunk** a másik, hogy a normál körülmények között tenyésztett sejteinkben **a sejtek zsírfestődése a felülettől függően különbözött**. Mivel ezen ellentmondások tisztázása feltétlenül szükségessé vált, első lépésben azt kívántuk eldönteni, hogy a felülettől függő festődéskor milyen jelenséggel állunk szemben. A rendelkezésünkre álló üveg és műanyag felületek összes változatát megvizsgáltuk. Ezek a következők voltak:

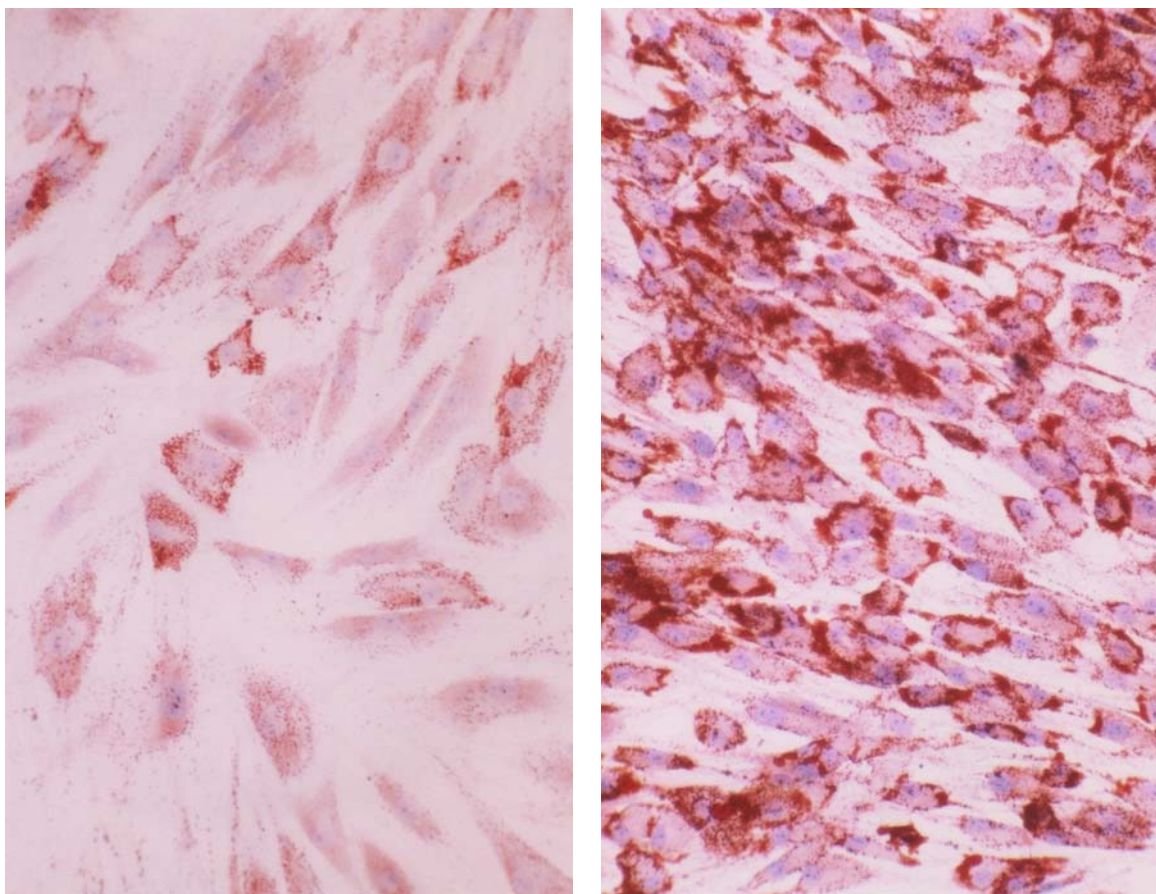
1. Nunc tenyésztő flaska felszíne, polisztirol.
2. Üveg Petri csésze felülete.

3. Super Frost Plus mikroszkópi üveg tárgylemez felülete (egy Petri csészébe helyezett üveg tárgylemezre vittük a sejteket, ott letapadás után a szokásos módon tenyésztethetők voltak.)
4. Műanyag Nunc Petri csésze felülete, polisztirol.
5. Két tenyésztő kamrás speciális műanyag tárgylemez felülete, (anyaga: Permanox®-TPX), Nunc forgalmazású, melyet a Ki-67 meghatározásnál is használtunk.

Ezen az öt féle felületen növesztettük a sejteket, és a későbbiekben itt történtek a festések is.



30. és 31. ábra. Retrobulbáris izomból származó fibroblaszt Oil red O festődése műanyag felületen és üveg felületen.

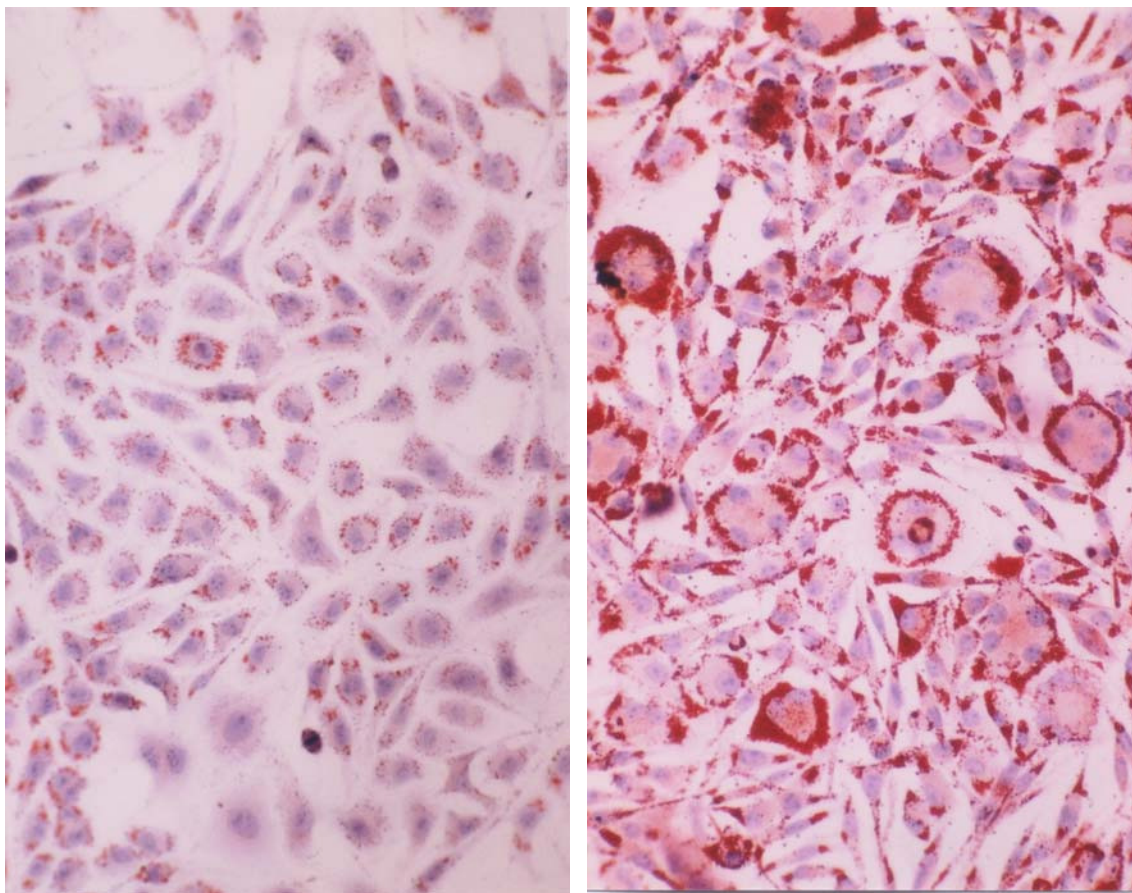


32. és 33. ábra. Retrobulbáris zsírszövetből származó fibroblasztok Oil_red O festődése műanyag felületen és üveg felületen.

Végül vizsgáltuk azt is, hogy maga a festődés intenzitásának különbözősége függ-e attól, hogy milyen felületen tenyésztettük a sejteket. A különböző felületű edényekből származó fibroblasztokat cytocentrifugával üveg tárgylemezre, és Nunc tenyésztő flaskából kivágott műanyag csíkra vittük át, és ott festettük meg azokat.

A kezeletlen primér humán orbitális és bőr eredetű fibroblasztjaink, eddig az irodalomból nem ismert viselkedését, vagyis a spontán preadipocita differenciálódás képességét összehasonlítottuk két fibroblaszt típusú malignus tulajdonságokkal rendelkező sejtvonallal a NIH/3T3-al és az L929-el, melyekről eddig spontán preadipocita differenciálódást nem írtak le, sőt zsírdifferenciáltató protokollokkal sem értek el ilyen irányú elváltozást. Ugyanazon technikával, normál tápfolyadékban, minden egyéb adalék nélkül, mint a humán primér

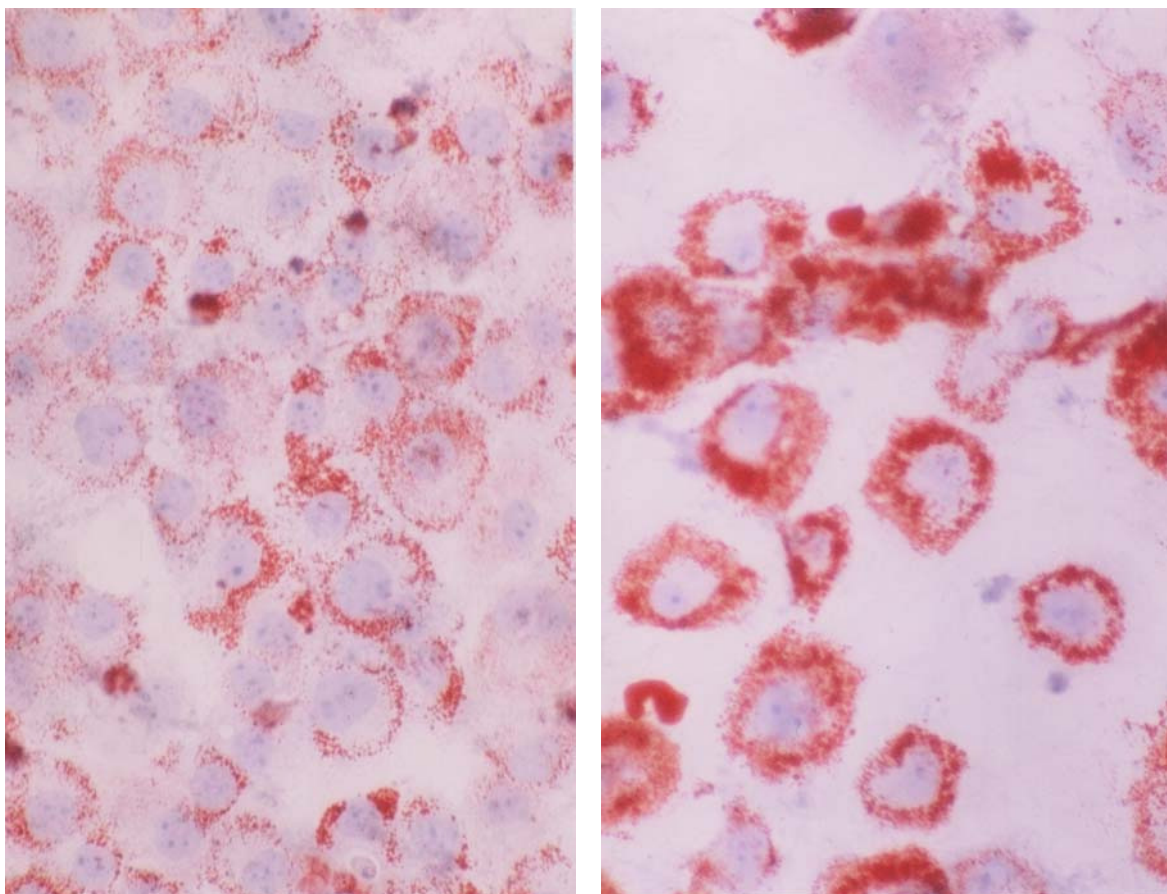
fibroblasztoknál, és különböző felületeken növesztve, festettük meg őket. A zsírfestések itt is mindkét sejtvonalnál különböző intenzitású triglicerid pozitivitást mutattak.



34. és 35. ábra. L929 sejtvonal festődése műanyag felületen és üveg felületen.

Annak eldöntésére, hogy az Oil red O festések pozitív eredményei korrektek, Szudán IV. festékkel is elvégeztük a zsírok kimutatását, bár ismeretes, hogy ez a festés kevésbé intenzív, az eredmény minden esetben meggyőző volt.

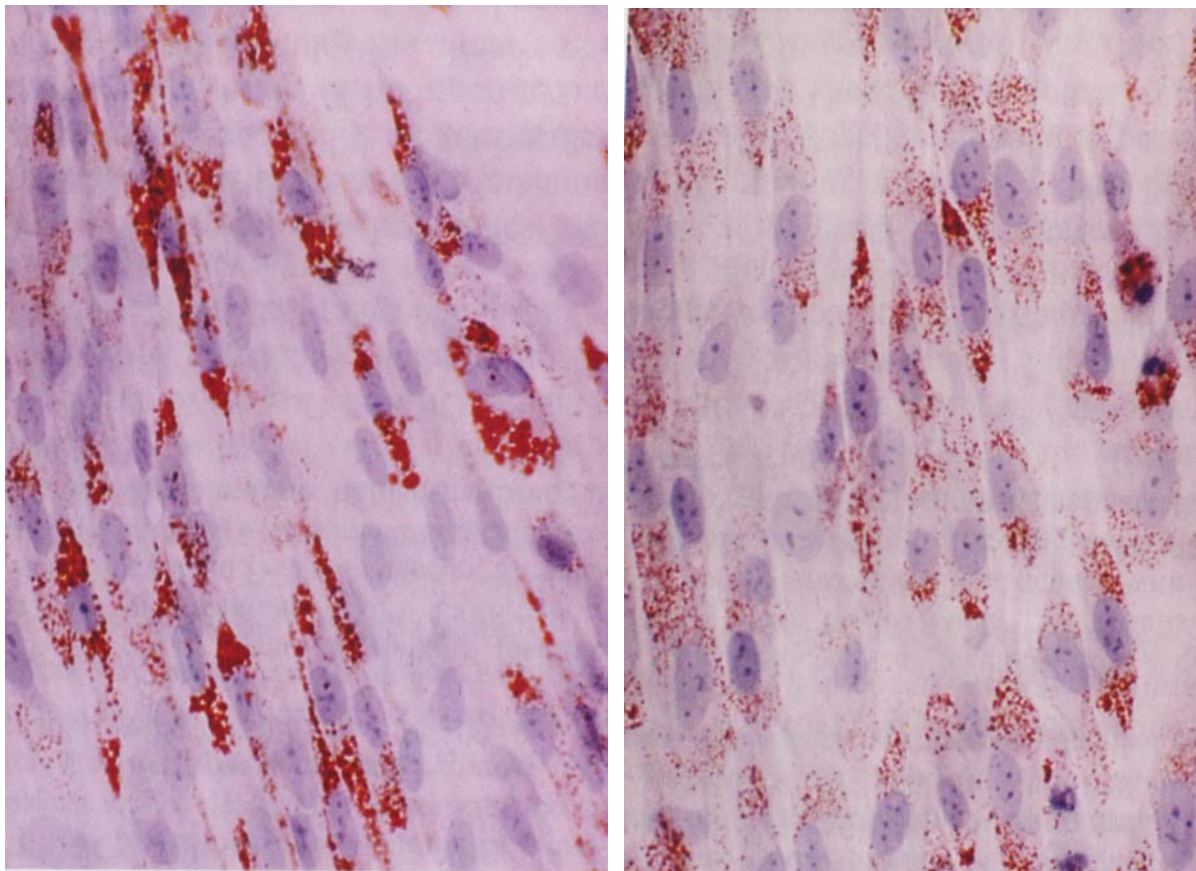
Néhány mikrofotogrammon bemutatjuk azokat a zsírfestődési különbségeket melyeket üveg és műanyag felületeken tapasztaltunk.



36. és 37. ábra. 3T3 sejtvonal festődése műanyag felületen és üveg felületen.

A fenti képekkel illusztrált igen érdekes megfigyeléseink teljességgel ellent mondanak Van és Roncari (1978) valamint Sorisky és munkatársai (1996) közléseinek. Előbbi szerzőpáros leírta, hogy a bőr fibroblasztok nem képesek lipid akkumulációra. Szerintünk ennek oka az lehet, hogy ezeket a sejteket műanyag Falcon tenyésztő edényben növesztették és ezen a műanyag felületen történt a festésük is. Sorisky és munkatársai (1996) arról számoltak be, hogy az orbitális fibroblasztok csak differenciáltató protokollal képesek zsír akkumulációra, és ez is csupán a sejtek 5-10%-ában történik meg, továbbá, hogy a bőr eredetű és a perimysialis fibroblasztok egyáltalán nem stimulálhatók preadipocita differenciálódásra (Sorisky et al., 1996. 1. táblázata). Ellenben Poznansky et al. (1973) Oil red O pozitívást talált bőr fibroblasztoknál speciális protokoll alkalmazása nélkül, csak hogy ők a sejtek tenyésztését és a festést is mikroszkópos üveg fedőlemezen végezték.

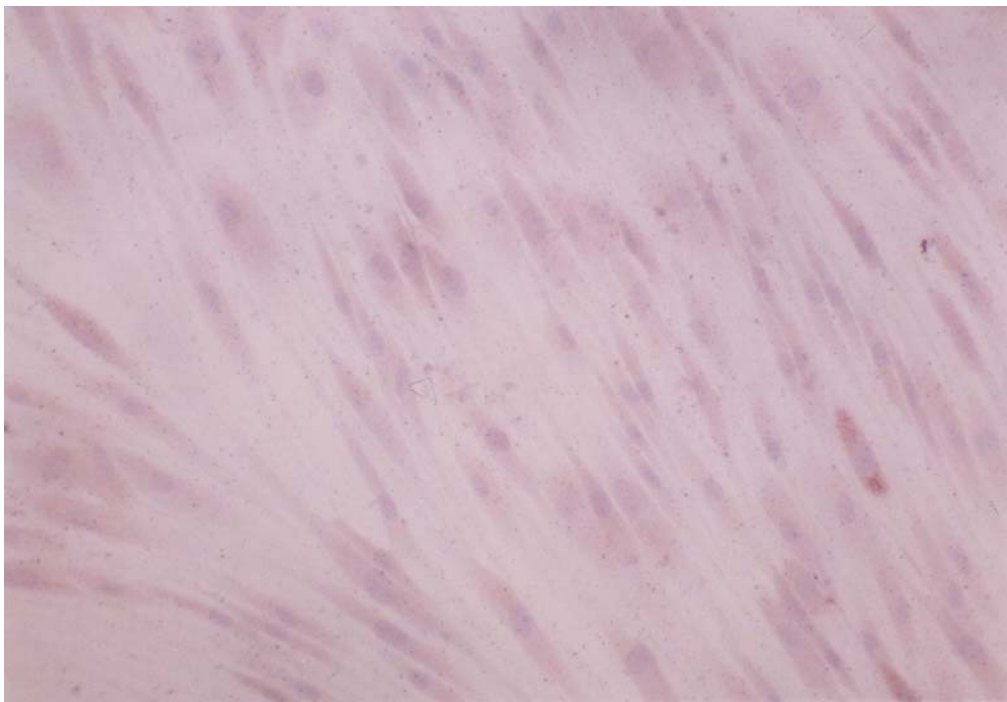
Azt is meg kell jegyezni, hogy Green és Kehinde (1974) először írtak le lipid akkumulációt 3T3-L1 sejteken, de ők is üvegen, közösleges Petri-csésze felületén végezték mind a tenyésztést, mind a festést.



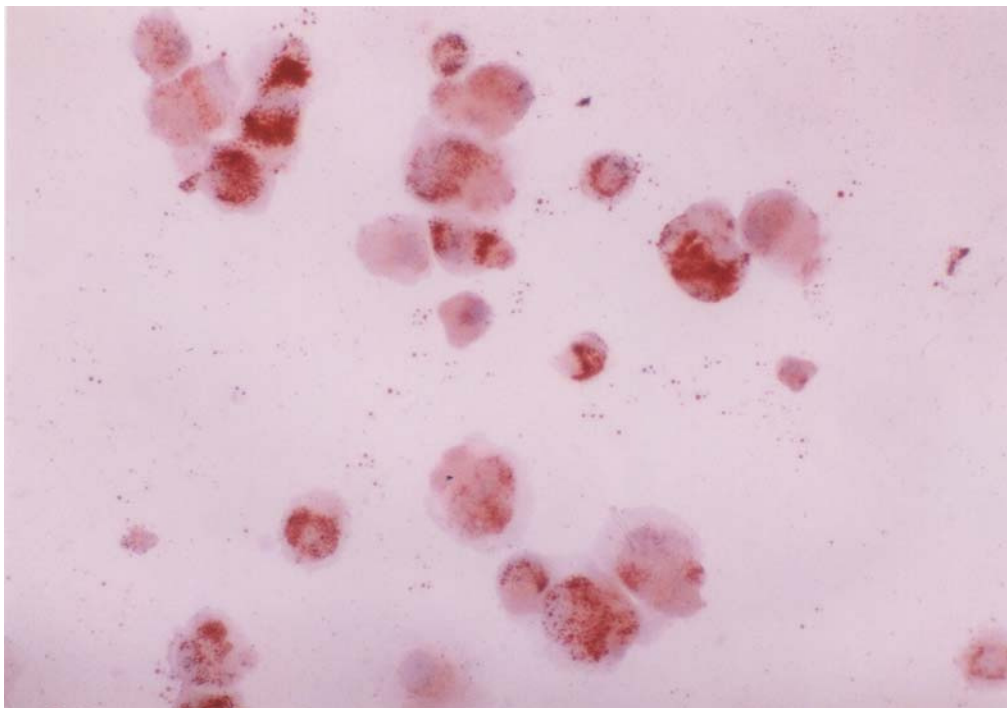
38. és 39. ábra. Bőr fibroblaszt zsírfestődése üveg felületen Oil red O-val és Sudán IV. festéssel.

Retrobulbáris fibroblasztjaink festődését összehasonlítva a Sorisky-ék által tapasztalttal, először alapvető technikai problémákat találtunk. Ők a zsírfestést követően egy éjszakán át Giemsa festékkel 4°C-on magfestést végeztek, s mivel ez a festék 50% metanolt tartalmaz, piros Oil red O festék kioldódott a sejtekből. Megismételtük az ő technikájukat, azzal a különbséggel, hogy másnap reggel nem lefedtük a „metszeteket”, hanem újrifestettük őket Oil red O-val. Ekkor újra pirosan festődött zsírcseppecskéket láttunk, bár az egész festődés intenzitása jóval alatta maradt a mi általunk tapasztalttal. Ennek oka az volt, hogy a sejteket

az eredeti tenyésztő felületen, a műanyag flaskában festettük, a tökéletes reprodukálás végett.



40. ábra. Bőr fibroblaszt zsírfestődése műanyag felületen Oil red O-val.



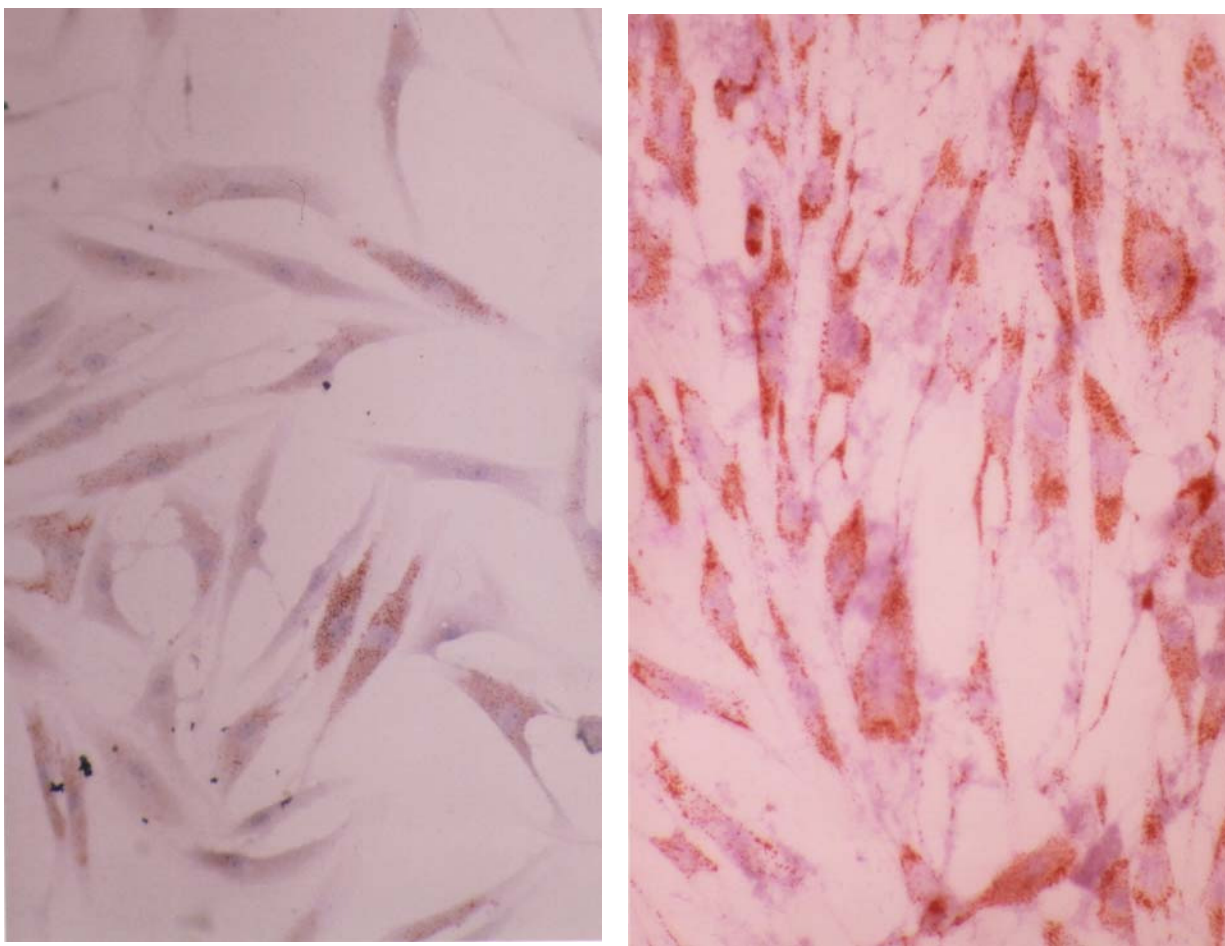
41. ábra. Retrobulbáris izom eredetű fibroblaszt műanyagon növesztve, üvegre cytocentrifugálva és Oil red O-val festve.

Megfigyeléseinkből arra a következtetésre jutottunk, hogy a fibroblaszt-preadipocita vizsgálatok szempontjából, döntő kérdés, hogy hogyan befolyásolja a tenyésztő felület a zsírfestést. Lehet, hogy a felület minősége (pl. elektrosztatikus tulajdonságai) hat a sejtekre és mint lipid akkumuláció inhibitor, gátol speciális folyamatokon keresztül. Azonban, amikor plasztik felületen növesztett sejteket cytocentrifugával üveg felületre vittünk és ott festettük őket a festődés intenzívebb volt mint a műanyagon. További érdekes megfigyelés az is, hogy az üveg és plasztik felületen növesztett sejtek morfológiailag is mutatnak eltérést nem csak a lipid festődésben. Azon feltételezésünk vizsgálatára, hogy az üveg felület stimulálja-e a zsírakku-mulációt, kollagénnel bevont üvegfelületen is tenyésztettünk és festettünk, de az Oil red O festődésben nem volt különbség a tiszta üveg felület és a kollagén-bevonatos között.

Ezekből a tapasztalatokból 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 ezen probléma létezését. Ennek a jelenségnek az ismeretében újra kell értékelni számos kísérleti eredményt melyet a fibroblaszt-preadipocita differenciálódás folyamatáról közöltek. A fenti eredményeinkből talán nem tűnik túlzásnak kimondani, hogy szerintünk **minden fibroblaszt képes spontán zsírakkumulációra**, 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.

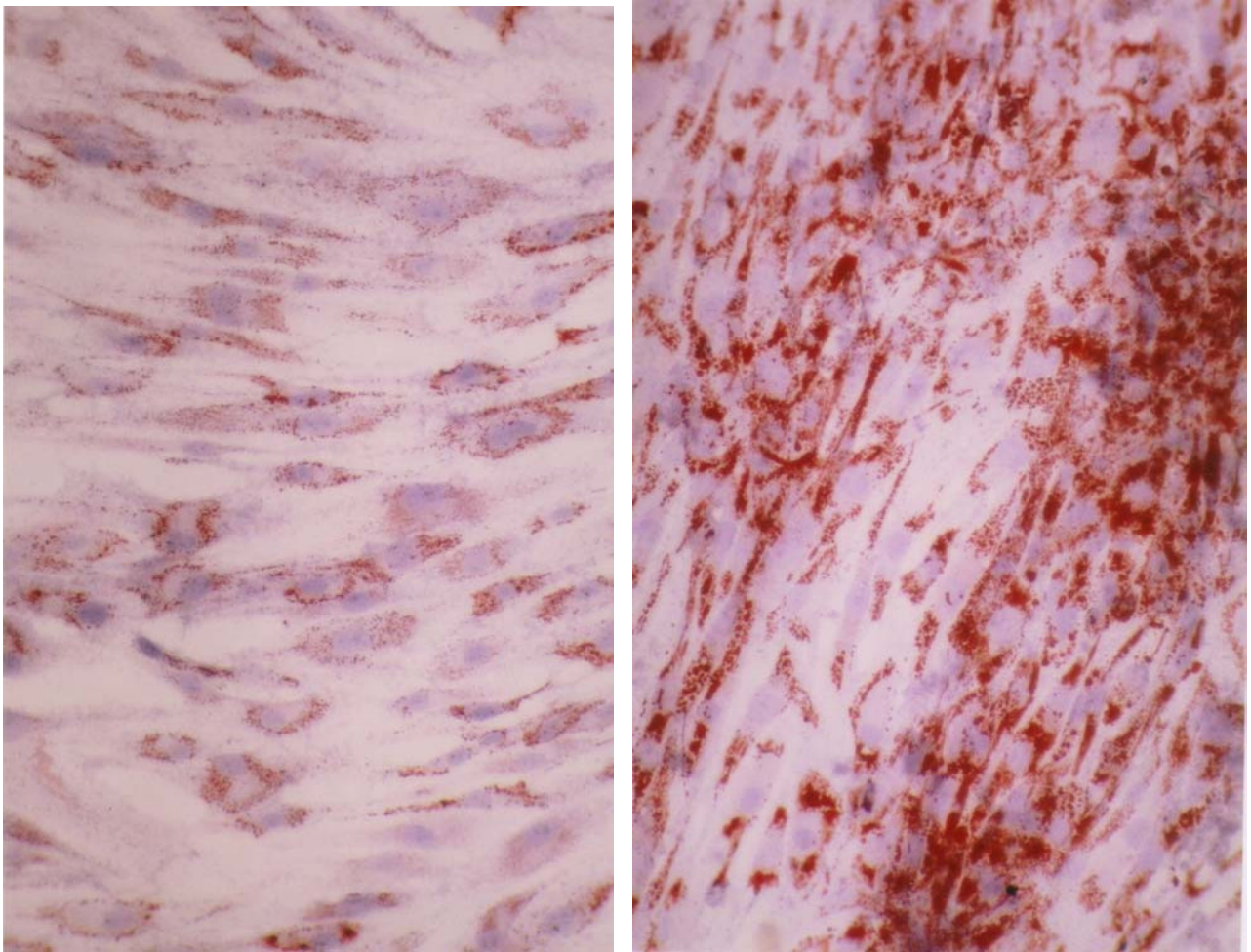
Mivel a zsírakkumuláció is egy differenciálódási marker jelenség, megvizsgáltuk ezt a folyamatot is a OH $\cdot$ szabadgyökök hatása alatt, humán orbitális és bőr eredetű fibroblasztokon. Ezen vizsgálatok során természetesen a fentebb már leírt módszertani tapasztalatokat is figyelembe vettük.

Ennek illusztrálására álljon itt néhány további ábra. Fibroblaszt tenyészteinket hasonló módon kezeltük Fenton reaktánssal, amint azt az enzim meghatározások előtt is végeztük, majd ezt követően Oil red O festéseket alkalmaztunk.



42. és 43. ábra. Retrobulbáris izom eredetű fibroblaszt kezeletlen állapotban és Fenton kezelés után Oil red O-val festve.

Az ábrákból kitűnik, hogy szabadgyökök generálása a tenyészetben tri-glicerid akkumulációt indít el, amelyet megfelelő módon kivitelezett zsírfestésekkel jól ki lehet mutatni. Ez a megfigyelés egybevág azon elvárásunkkal, hogy ezek a szabadgyökök az eddig vizsgált valamennyi sejttypusban differenciálódási folyamatokat indítanak 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 általában csak csekély mértékben van jelen.



44. és 45. ábra. Retrobulbáris zsíreredetű fibroblaszt kezeletlen állapotban és Fenton kezelés után Oil red O-val festve.

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.

Megbeszélés

Azzal, hogy a Gerontológiai tanszék munkatársa lettem, lehetőségem nyílt bekapcsolódni a Zs.-Nagy Imre professzor által irányított munkákba, illetve részt venni annak folytatásában. A kutatási téma az általa kidolgozott MHA vagyis az öregedés membránhipotézise, melynek igazolását különböző modelleken és technikával végeztük kollegáimmal együtt. Ennek első rám bízott lépése volt, egy sejttenyésztő laboratórium létrehozása. Az egyetem anyagi lehetőségeit tekintve nem kevés leleményesség kellett hozzá. Ezután az új sejtlaborban elkezdtük a K562 erythroleukemia sejtek vizsgálatát. Azért ezzel a sejtvonallal dolgoztunk mert az erythroblasztok differenciálódásuk során hemoglobint termelnek, mely hisztokémiai módszerrel jól detektálható, és ezzel a sejtvonallal már tanszékünkön jelentős eredmények születtek. Fenton reakció-val, vagyis $\text{OH}\cdot$ szabadgyökök generálásával differenciálódást indukáltunk K562 sejteken. A hemoglobin detektálására benzidin helyett bevezettük a diaminofluorént (DAF). A benzidin bizonyítottan erős mutagén és karcinogén vegyület, és ennek ellenére a hisztokémiai és toxikológiai laboratóriumokban mindmáig általánosan használatos. A DAF alkalmazásának előnye továbbá, hogy ha a sejtek dehidráció nélkül végzünk hemoglobin meghatározást tenyésztett sejteken, a DAF nem interferál a tápfolyadékkal elsősorban annak savó komponensével. A DAF-hemoglobin fotometriás meghatározás mintegy 80-szor érzékenyebb mint a benzidin-hemoglobin reakció. Ezen két előnyös tulajdonsága miatt lehetőséget teremt több minta gyors szimultán mérésére multiwell platekben. Ara-C differenciáltató szerrel és Fenton reaktánsal kezelt K562 sejteink hemoglobin hisztokémiai preparátumjai igazolják ennek a még kevesek által használt vegyületnek a jó alkalmazhatóságát.

Az erythroleukemia sejtek DAF hisztokémiával hemoglobin termelődést mutattak szabadgyök kezelés hatására. Ennek további bizonyítására flow-cytometriás méréseket végeztünk, melynek eredményei, a sejtek méretbeli eloszlásának eltolódása a nagyobb méret felé és a sejtek granularitásának fokozódása, további bizonyítékul szolgálnak, hogy a szabadgyökök hatására lassuló szaporodási ütem mellett a tenyészetben a sejtek differenciálódási folyamatokat indítanak el, ami ennél a sejttípusnál a hemoglobin szintézis.

A jelenségek további vizsgálatához nem malignus sejtvonalakat tenyésztettünk. Vizsgálatainkhoz olyan kórképet választottunk, az endocrin

ophtalmopathiát (EOP), melynél mind a szemizom, mind a retrobulbáris zsírszövet érintett az ott zajló folyamatokban és belőlük fibroblasztok "nevelhetők". Emellett a zsírszövet felszaporodásának oka máig sem tisztázott, és sok esetben csak sebészi megoldással rendezhető. EOP-os egyének és EOP által nem érintett betegek retrobulbáris zsírszövetéből és szemizmából növesztettünk fibroblasztokat. Elsőként a fibroblasztok glikózaminoglikán (GAG) termelését vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy retrobulbáris fibroblasztokban szabad-gyök kezelés hatására fokozódik a GAG produkció. A kezeléseket 3 hónapig folytatva és 1 hét, 1 hónap és 3 hónap után hisztokémiai GAG kimutatást végezve dimetilmetilénkéssel (DMB) az idő függvényében fokozódó meta-kromázias festődést láttunk. Azt mondtuk, hogy a retrobulbáris fibroblasztok szabadgyökök hatására differenciálódás jeleit mutatják, jelen esetben a GAG szintézis fokozódását. Azt a tény, hogy ezt a jelenséget kísérletes úton, in vitro modellezni tudtuk, igen jelentős, mivel az EOP-ban a fokozott GAG produkció és a GAG-ok rendkívüli vízkötőképessége az exophtalmus egyik oka.

Primér fibroblaszt tenyészteinkben két a $\text{OH}\cdot$ gyökök mennyiségi szabályozásában szerepet játszó enzim a SOD és kataláz aktivitását is megha-tároztuk. Mindkét enzim génexpressziójának növekedését tapasztaltuk gyökke-zelések hatására. Jóllehet a finomabb mechanizmusok feltárása még hátra van, véleményünk szerint azt biztosra vehetjük, hogy e két enzim megnöve-kedett génexpressziója egyet jelent a gyökök turnoverének a megnöveke-désével, s ez a jelenség alapvető szerepet játszhat a sejtdifferenciálódás mechanizmusában.

Szabadgyök fluxus hatására, minden eddig vizsgált sejttípusnál proliferáció lassulást tapasztaltunk. Ennek immunhisztokémiai detektálását Ki-67 proliferációs antigén kimutatásával végeztük. Mind az EOP-os betegből származó, mind a kontrol fibroblasztok Fenton kezelés után szintén jelentős proliferációs aktivitás csökkenést mutattak, ami eddigi tapasztalataink szerint a sejtdifferenciálódás megindulásának első lépése.

Az EOP-os retrobulbáris zsírok felszaporodásában a fibroblaszt-preadi-pocyta átmenet lehetőségének, az adipocyta differenciálódásnak alapvető szerepe van. Ezt a folyamatot követtük nyomon Oil red O és Szudán IV. festéssel. Primér humán retrobulbáris és bőr eredetű fibroblasztokat, s e mellett két fibroblaszt típusú immortalizált sejtvonalat is vizsgáltunk, az L929-et és a 3T3-at.

Az egyik megfigyelésünk az volt, hogy a sejtek zsírfestődése a felülettől függően műanyagon és üvegen különbözött. A másik, hogy spontán módon, differenciáltató ágensek használata nélkül is jelentős intenzitású zsírfestődést láttunk. A jelenségek magyarázatát nem ismerjük, de ezek a tapasztalataink különböznek az irodalomból ismertekkel. Ezek figyelembe vételével, újra kell értékelni számos kísérleti eredményt melyet a fibrolaszt-preadipocytá differenciálódás folyamatáról közöltek, és eredményüket a zsírok festődésével magyarázták. 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.

Szabadgyökök generálásakor, primér sejtjeink tenyésztésében fokozott triglicerid akkumulációt mutattunk ki. Ez a jelenség is a $\text{OH}\cdot$ szabadgyökök azon tulajdonságának a bizonyítéka, hogy differenciálódást indukálnak a sejtekben. A tenyésztett retrobulbáris fibroblasztok preadipocytává differenciálódtak a gyökök fluxusának növekedésekor, ami együtt járt a sejtek szaporodási ütemének lassulásával, amint azt a Ki-67 proliferációs vizsgálataink eredményei is igazolták. Mindkét folyamat ellentétes irányú mint az, amely exophthalmus kialakulásához vezet. Ez a jelenség összekapcsolható azzal a tapasztalati ténnyel, amelyet az EOP-os betegeket gyógyító orvosok jól ismernek, nevezetesen, hogy olyan beavatkozások, amelyek a retrobulbáris tér vérellátását növelni képesek (dekompressziós műtét, lokális Rtg-besugárzás, lokális steroid-kezelések), lényegében a szöveti gyökfluxust is közelebb viszik a normálhoz, jelentős mértékben képesek javítani a klinikai tüneteket.

Azok a megfigyelések, hogy a gyökfluxus növelése mindenfajta eddig vizsgált blaszt-állapotú sejtben beindítja a differenciálódási jelenségeket, arra utal, hogy aligha lehet fenntartani az öregedés szabadgyök elméletét abban az eredetileg megfogalmazott, „klasszikus” formában, amely szerint az oxigén-eredetű szabadgyökök csakis káros melléktermékeknek tekintendők. Sokkal elfogadhatóbbnak tűnik az a felfogás, amelyet laboratóriumunk is képvisel (lásd a bevezetést), hogy a szabadgyökök egy jelentős élettani funkciót teljesítenek, vagyis attribútumai az élő állapotnak. Ez természetesen nem zárja ki azt, hogy helyenként és időnként vannak káros mellékhatásaik is, amelyek azonban éppúgy elkerülhetetlenek az élő rendszerekben, mint ahogy az elektromos áram

esszenciális feltétele az elektronikai eszközök működésének, ugyanakkor pedig helyenként és időnként maga okozza az egyes alkatrészek tönkremenését is. További részleteket ebben az új gondolkörben, valamint ennek viszonyát Szentgyörgyi Albert már 1941-ben megfogalmazott gondolataihoz részletesen tárgyalja egy a közelmúltban megjelent összefoglalás (Zs.-Nagy, 2001).

Munkánk további célkitűzései között szerepel a fibroblasztok proliferációját közvetítő faktor megismerése, ami lehetséges utat nyithatna meg a klinikai kép kialakulásáért felelős orbita folyamatok egyik alapvető komponensének befolyásolására. Arra keresnénk a választ, hogy az orbitális preadipocyták szekretálnak-e PAI-1-et in vitro, mivel a PAI-1 szabályozza az urokináz típusú plasminogén aktivátor receptor mediálta sejtadhéziót (Loskutoff et al. 1999), és hogy szekréciójuk függ-e a sejt denzitástól, továbbá vizsgálni kívánjuk az IGF-1 szerepét is.

Ezen kívül tisztázni szeretnénk a hypoxia jelentőségét a preadipocyta-adipocyta átalakulásban, mely vizsgálathoz speciális, zárt, oxigénmérő elektróddal ellátott sejtenyésztő kamrát készítettünk, melyben a különböző gázokkal történő átöblítés is megoldható. Mindkét vizsgálati irányban folytatni kívánjuk kísérleteinket.

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 méret-beli 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 szabad-gyökfluxus 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 fibro-blasztok 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 fibro-blaszt 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 sejten 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.

Summary

The differentiation inducing effect of $\text{OH}\cdot$ free radicals has been investigated using various models and techniques. Differentiation was induced in K562 erythroleukemia cells by Fenton reaction, generating $\text{OH}\cdot$ free radicals. To detect hemoglobin, the benzidine has been replaced by diaminofluorene (DAF). These cells displayed an intense hemoglobin synthesis under the free radical treatment by DAF staining, and in addition, applying flow cytometry, we observed an increase of cell size and compactness of the cytoplasm. In the fibroblasts grown from retrobulbar muscle and fat tissues of EOP patients, 1-week, 1- and 3-month-long treatments with $\text{OH}\cdot$ free radicals induced an increased GAG production. This is an important observation, because the increased GAG production, and the high water-binding ability of these compounds are one of the main reasons for the exophthalmus in EOP. SOD and catalase activities of these primary fibroblasts were also determined under the effect of free radical flux. The gene expression of both enzymes proved to be stimulated by the free radicals, indicating an intensified radical turnover, which may play an important general role in the cell differentiation mechanisms. Applying the histochemical demonstration of the Ki-67 proliferation antigen, a significant decrease of the proliferative activity was observed in both the EOP and control fibroblasts after Fenton treatment, which is the first step of cell differentiation. Regarding the causes of retrobulbar fat accumulation in EOP, we obtained information by studying the fibroblast-preadipocyte transition, since the adipocyte differentiation may play an important role in this process. Oil red O and Sudan IV fat stainings were performed on primary human retrobulbar and skin fibroblasts, as well as on 2 fibroblast-type, immortalized cell lines, L929 and 3T3. It has been observed that the fat stainings depend on the quality of culture surface, being different on glass and plastic surfaces. On glass surfaces one could see very intense fat-stainings without using any fat-differentiating agents. Our results show that all kinds of fibroblasts are able to spontaneous fat accumulation, and if proper signals are present, they may become fat cells. An increase of the radical flux induced differentiation phenomena in all so far studied blast-type cells, showing that it is hardly possible to maintain the free radical theory of aging in its original form, according to which the oxygen free radicals are only harmful byproducts.

Irodalomjegyzék

- Andersson, L.C., Nilsson, K., Gahmberg, C.G. (1979): K562 - a human erythro-leukemic cell line. *Int. J. Cancer*, 23, 143-147.
- Árvay, S. (1976): Reproduction and aging, In: Hypothalamus, pituitary and aging. Everitt, A.V. and Burgess, J.A. (ed.) Thomas, Springfield, Illinois, 362-366.
- Bahn, R.S., Gorman, C.A., Woloschak, G.E., David, C.S., Johnson, P.M., Johnson, C.M. (1987): Human retroocular fibroblasts in vitro: A model for the study of Graves' ophtalmopathy. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 65, 665-670.
- Baird, M.B., Samis, H.V., Massie, H.R., Zimmerman, J.A. (1975): A brief argument in opposition to the Orgel hypothesis. *Gerontologia*, 21, 57-63.
- Balin, A.K. (1982): Testing the free radical theory of aging, in *Testing the Theories of Aging*. R.C. Adelman and G.S. Roth., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 137-182.
- Balin, A.K. (1985): Oxygen modulates the growth and lifespan of human cells at physiological partial pressure. Abstracts of the presentation on Workshop on Oxygen Radicals. Pathology and Aging, February 16, 1985, San Diego, CA, 1-2.
- Banga, I., Baló, J., és Szabó, D. (1956a): Metacollagen as the apperent elastin. *J. Gerontol.*, 11, 242-250.
- Banga, I., Baló, J., és Szabó, D. (1956b): The structure, ageing and rejuvenation of collagen fibres. *Experientia Suppl.* 4, 28-33.
- Bazsó-Dombi, E. Oravecz, K., Jeney, F., Nagy, K. és Zs.-Nagy, I. (2000): On the useful role of OH· free radicals in differentiation of cultured human fibroblasts. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 31, 233-242.
- Bellamy, D. (1968): Long term action of prednisolone phosphate on a strain of short-lived mice, *Exp. Geront.*, 3, 327-333.
- Berg, B.N. (1976): Pathology and aging, In: Hypothalamus, Pituitary and Aging. Everitt, A.V. and Burges, J.A. (ed.) Thomas, Springfield, 43- 49.
- Bianchi Scarrá, G., Fiorentini, P., Gambari, R., Nastruzzi, C., Barbieri, R., Sessa-rego, M., Ravazzolo, R., Garré, C. (1989): Isolation and characterization of a K562 cell line resistant to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-mediated erythroid induction. *Exp. Hemat.* 17, 859-864.
- Björkstén, J. (1941): Recent developments in protein chemistry. *Chem. Industries*, 48, 746-752.
- Björkstén, J. (1942): Chemistry of duplication, *Chem. Industries*, 50, 69-72.
- Björkstén, J. (1951): Crosslinkages in protein chemistry. In: *Advances in protein chemistry*, Anson, N.L., Edsall, J.T., Bailey, K. (ed.) Academic Press, New York, 6, 342-350.
- Björkstén, J. (1968): The crosslinkage theory of aging. *J. Amer. Geriatr. Soc.*, 16, 408-427.
- Björkstén, J. (1969): Theories. In: *Aging Life Processes*. Bakerman, S. (ed.), Thomas, Springfield, Illinois, 147-151.
- Björkstén, J. (1977): Crosslinkage and the aging process. In: *Theoretical Aspects of Aging*, Rockstein, M. (ed.) Academic Press, New York, 43- 48.
- Blackburn, E.H. (1994): Telomeres: No and insight. *Cell*, 77, 621-623.
- Bomberg, N., Romaldini, J.H., Werner, R.S., Sgarbi, J.A., Werner, M.C. (1992): The evolution of Graves' ophtalmopathy during treatment with

- antithyroid drug alone and combined with triiodothyronine. *J. Endocrinol. Invest.* 15, 191-195.
- Boveris, A., Cadenas, E., Stoppani, A.O.M. (1976): Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide, *Biochem. J.*, 156, 435-444.
- Brandes, R., Arad, R., Benvenisty, N., Weil, S., Bar-Tana, J. (1990): The induction of adipose conversion by bezafibrate in 3T3-L1 cells. Synergism with dibutyl-cAMP. *Biochim. Biophys. Acta* 1054, 219-224.
- Burnet, F.N. (1976): A szomatikus sejtek genetikai hibái és kapcsolataik az immunpatológiával és öregedéssel. *Orvostudomány*, 27, 251-256.
- Cadenas, E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity, *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 79-110.
- Campisi, J., Kim, S.H., Lim, C.S., Rubio, M., (2001): Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp. Gerontol.*, 36, 1619-1637.
- Carpenter, D.G. (1965): Diffusion theory of aging. *J. Gerontol.*, 20, 191-198.
- Catalioto, R-M., Gaillard, D., Maclouf, J., Ailhaud, G., Negrel, R. (1991): Autocrine control of adipose cell differentiation by prostacyclin and $\text{PGF}_{2\alpha}$. *Biochim. Biophys. Acta* 1091, 364-369.
- Chiang, P.K. (1981): Conversion of 3T3-L1 fibroblasts to fat cells by an inhibitor of methylation: effect of 3-deazaadenosine. *Science*, 211, 1164-1166.
- Chio, K.S. és Tappel, A.L. (1969a): Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids. *Biochemistry*, 8, 2821-2827.
- Chio, K.S. és Tappel, A.L. (1969b): Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and by malonaldehyde. *Biochemistry*, 8, 2827- 2832.
- Chvapil, M. and Hruza, Z. (1959): The influence of aging and undernutrition on chemical contractility and relaxation of collagen fibres in rats. *Gerontologia*, 3, 241-252.
- Comfort, A. (1964): *Aging: the Biology of Senescence*. Holt, Rinehart and Winston, New York.
- Comfort, A. (1970): Biological theories of aging. *Hum. Dev.*, 13, 127-139.
- Comfort, A. és Youhotsky-Gore, I., Pathmanathan, K. (1971): Effect of ethoxyquin on the longevity of C3H mice. *Nature*, 229, 254-255.
- Comoe, L., Jeanesson, P., Trentesaux, C., Desoize, B., Jardillier, J.-C. (1987): The antileukemic alkaloid fagaronine and the human. *Leukemia. Res.* 11, 445-451.
- Cornelius, P., Enerback, S., Bjursell, G., Olivecrona, T., Pekala, P.H. (1988): Regulation of lipoprotein lipase mRNA content in 3T3-L1 cells. *Science*, 141, 68-94.
- Curtis, H.J. (1964): Cellular processes involved in aging. *Fed. Proc.*, 23, 662-667.
- Curtis, H.J., Tilley, J., Crowley, C., Fuller, M. (1966): The role of genetic factors in the aging process. *J. Gerontol.*, 21, 365-368.
- Czapski, G. (1971): Radiation chemistry of oxygenated aqueous solution. *Ann. Res. Phys. Chem.*, 22, 171- 180.
- Damjanovich, S. és Somogyi, B. (1973): A molecular enzyme model based on oriented energy transfer. *J. Theor. Biol.*, 41, 567-569.
- Damjanovich, S., Zs.-Nagy, I. és Somogyi B. (1989): Application of a molecular enzyme kinetic model for aging cells and tissues. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 8, 37-45.

- Delikat, S., Harris R.J., Galvani, D.V.(1993): IL-1 β inhibits adipocyte formation in human long-term bone marrow culture. *Exp. Hematol.* 21, 31-37.
- Diamond, L., O'Brien, T.G., Rovera, G. (1977): Inhibition of adipose conversion of 3T3 fibroblasts by tumor promoters. *Nature*, 269, 247-249.
- Donato, A. és Sohal, R.S. (1981): Relationship of lipofuscin accumulation to aging. in *CRC Handbook of Biochemistry in Aging* J.R. Florini, R.C. Adelman, and G.S. Roth, Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 221-227.
- Dormandy, T.L. (1983): An approach to free radicals. *The Lancet*, ii: 1010-1014.
- Dubovich, M.L. (1991): Melatonin receptors in the retina, brain and pituitary. in: Földes, A., Reiter. R.J. Eds. *Advances in Pineal Research*, Vol. 6. Jon Libbey Ltd. London, 131-139.
- Earle, W.R. (1943): *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)*, 4, 165-172.
- Esposito, J.L. (1983): Conceptual problems in theoretical gerontology. *Perspect. Biol. Med.*, 26, 522-546.
- Farndale, R.W., Sayers, C.A., Barrett, A.J. (1982): A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect. Tissue Res.* 9, 247-248.
- Fenton, H.J.H. (1894) Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc.* 65- 899-910.
- Feriotto, G., Nastruzzi, C., Barbieri, R., Gambari, R. (1988): Induction of erythroid differentiation of K562 cells by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine is inhibited by iron chelators: reversion by treatment with hemin. *Blut* 57, 25-30.
- Filipak, M., Sparks, R.L., Tzen, C-Y., Scott, R.E. (1988): Tumor necrosis factor inhibits the terminal event in mesechymal stem cell differentiation. *J. Cell Physiol.* 137, 367-373.
- Flohé, L. és Ötting, F. (1984): Superoxide Dismutase Assays. *Methods in Enzymology*, Vol. 105, 93-104.
- Floyd, R.A. és I. Zs.-Nagy, (1984): Formation of long-lived. *Biochim. Biophys. Acta*, 790, 94-97.
- Floyd, R.A. és Lewis, C.A. (1983): Hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide by ferrous iron-nucleotide complexes. *Biochemistry*, 22, 2645-2649.
- Folkers, K. (1973): Relationships between coenzyme Q and vitamin E. *Vitamin E: Biochemistry, Nutritional Requirements and Clinical Studies. International Symposium Mineapolis, Minnesota*, Sept. 27-28.
- Forbes, W.F. (1975): The effect of prednisolone phosphate on life span of DBA/2J mice. *Exp. Geront.*, 10, 27-29.
- Forman, H.J. és Boveris, A. (1982): Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria. in *Free Radicals in Biology*, Vol. 5, W.A. Pryor, Ed., Academic Press, New York, 65-90.
- Frank, I. és Massaro, D. (1980): Oxygen toxicity. *Amer. J. Med.*, 69, 117-126.
- Freeman, B.A. és Crapo, J.D. (1982): Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47, 412-426.
- Fridovich, I. (1976): Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. in *Free Radicals in Biology*, Vol. I, W.A. Pryor Ed., Academic Press, New York, 239-277.
- Fulks, R.M. és Stadtman, E.R. (1985): Regulation of glutamine synthetase, aspartokinase, and total protein turnover in *Klebsiella aerogenes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 843, 214-229.

- Gaillard, D., Negrel, R., Lagarde, M., Ailhaud, G. (1989): Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells. *Biochem. J.* 257, 389-397.
- Gaunt, G.L. és de Duve, C. (1976): Subcellular distribution of D-amino acid oxidase and catalase in rat brain. *J. Neurochem.*, 26, 749-759.
- Gharbi-Chihi, J., Facchinetti, T., Berge-LeFranc, J.L., Bonne, J., Torresani, J. (1991): Triiodothyronine control of ATP-citrate lyase and malic enzyme during differentiation of murine preadipocyte cell line. *Horm. Metab. Res.* 23, 423-427.
- Giles, J.S. and Everitt, A.V. (1967): The role of thyroid and food intake in the ageing of collagen fibres. *Gerontologia*, 13, 65-69.
- Gimble, J.M., Dorheim, M-A., Cheng, Q., Pekala, P., Enerback, S. et al. (1989): Response of bone marrow stromal cells to adipogenic antagonists. *Mol. Cell. Biol.* 57, 4587-4595.
- Goldschmidt, R. (1970): "In vivo" degradation of nonsense fragments in E.coli. *Nature*, 228, 1151-1154., *Anal. Biochem.* 24, 431-437.
- Goscin, S. A., Fridovich, I. (1973): Superoxid dismutase and the oxygen effect. *Rad. Res.*, 56, 565-569.
- Gregoire, F., De Broux, N., Hauser, N., Heremans, H., Van Damme, J., Remacle, C. (1992): Interferon- γ and interleukin-1 β inhibit adipoconversion in cultured rodent preadipocytes. *J. Cell Physiol.* 151, 300-309.
- Greider, C.W. (1998): Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 90-92.
- Greider, C.W. és Blackburn, E.H. (1996): Telomeres, telomerase and cancer. *Sci. Amer.* Feb/1996. 80-85.
- Gunderson, E.K. és Rahe, R.H. (1974): *Life Stress and Illness*. Thomas, Springfield, Illinois.
- Halliwell, B. és Gutteridge, J.M.C. (1985): *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford.
- Hansen, C., Heussel, C.P., Otto, H., Weckauf, H., Stover, C., Koeppel, T.A., Beyer, J., Kahaly, G. (1993): Adipose tissue in endocrine ophtalmopathy. In: *Endocrine Ophtalmopathy. Molecular, Immunological and Clinical Aspects*. Dev. Ophtalmol. Basel, 68-76.
- Hao, Y.-h és Tan, Z. (2001): Telomeres at the chromosome X_p might be critical in limiting the proliferative potential of human cells. *Exp. Gerontol.*, 36, 1639-1647.
- Harman, D. (1956): Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 11, 298-300.
- Harman, D. (1957): Prolongation of the normal life span by radiation protection chemicals. *J. Gerontol.*, 12, 257-263.
- Harman, D. (1961a): Mutation, cancer and aging. *Lancet*, 1, 200-201.
- Harman, D. (1961b): Prolongation of the normal life span and inhibition of spontaneous cancer by antioxidants. *J. Gerontol.*, 16, 146-154.
- Harman, D. (1962): Role of free radicals in mutation, cancer, aging and the maintenance of life. *Radiat. Res.*, 16, 753-763.
- Harman, D. (1968): Free radical theory of aging: effect of free radical inhibitors on the mortality rate of LAF₁ mice. *J. Gerontol.*, 23, 476-482.
- Harman, D. (1981): The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78, 7124-7128.

- Harman, D. (1988): Free radical theory of aging: current status. in Lipofuscin-1987: State of the Art, I.Zs.-Nagy, Ed., Akadémiai Kiadó, Budapest és Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 3-21.
- Harman, D. (2001): Aging: Overview. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 928, 1-21.
- Hayflick, L. (1965): Cell culture and the aging phenomenon. In: *Topics in the Biology of Aging*, Krohn, P.L. (ed.) Wiley, New York, 83-100.
- Hayflick, L. (1970): Aging under glass. *Exp. Gerontol*, 5, 291-303.
- Hayflick, L. (1973): The biology of human aging. *Amer. J. Med. Sci.* 265, 432-445.
- Hayflick, L. (1975): Current theories of biological aging. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 34, 9-13.
- Holliday, R. és Tarrant, G.M. (1972): Altered enzymes in aging human fibroblasts. *Nature*, 238, 26-30.
- Hornsby, P.J. és Crivello, J.F. (1983). The role of lipidperoxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part. 1: A background review. *Molec. Cell. Endocrinol.*, 30, 1-20.
- Hornsby, P.J. és Crivello, J.F. (1983). The role of lipidperoxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part. 2: *Molec. Cell. Endocrinol.*, 30, 123-147.
- Jainchill, J.L., Aaronson, S.A., Todaro, G.J. (1969): Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol.*, 4, 549-553.
- Jamieson, D., Chance, B., Cadenas, E., és Boveris, A. (1986): The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu. Rev. Physiol*, 48, 703-719.
- Jeney, F., Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Szabó, J. és Zs.-Nagy, I. (2000): Cytochemical studies on the fibroblast-preadipocyte relationship in cultured fibroblast cell lines. *Acta Histochem.*, 102, 381-389.
- Johnson, H.D., Kintner, J.D., Kibler, H.H. (1963): Effect of 48°F (8.9°C) and 83°F (28.4°C) on longevity and pathology of male rats. *J. Gerontol.*, 18, 29-38.
- Kahaly, G., Schuler, M., Sewell, A.C., Bernhard, G., Beyer, J., Krause, U. (1990): Urinary glycosaminoglycans in Graves' opthalmopathy. *Clin. Endocrinol.* 33, 35-44.
- Kaiho, S.-I. és Mizuno, K. (1985): Sensitive assay systems for detection of haemoglobin with 2,7-Diaminofluorene: histochemistry and colorimetry for erythrodifferentiation, *Anal. Biochem.*, 149, 117-120.
- Kasugai, I. és Yamada, M. (1992): High production of catalase in hydrogen peroxide-resistant human leukemia HL-60 cell lines. *Leukemia Res.*, 16, 173-179.
- Kohn, R.R. (1971): Effect of antioxidants on life-span of C57BL mice. *J. Gerontol.* 26, 378-380.
- Krenács, T. (2000): A fénymikroszkópos immunhisztokémia módszertana. II. Magyar Sejtanalitikai Konferencia kiadványa, Budapest, 25-36 old.
- Levine, R.L. (1983a): Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J. Biol. Chem.*, 258, 11823-11827.
- Levine, R.L. (1983b): Oxidative modification of glutamine synthetase. II. Characterization of the ascorbate modell system. *J. Biol. Chem.*, 258, 11828-11833.
- Little, J.B. (1976): Relationship between DNA repair capacity and cellular aging. *Gerontologia*, 22, 28-55.
- Loskutoff, D.J., Curride, S.A., Hu, G., Deng, G. (1999): Regulation of cell adhesion by PAI-1. *APMIS*, 107, 54-61.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Lozzio, B.B., és Lozzio, C.B. (1979): Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell-line. *Leuk. Res.* 3, 363-370.
- Lozzio, B.B., Lozzio, C.B., Bamberger, E.G., Feliu, A.S. (1981): A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 166, 546-550.
- Lozzio, C.B., és Lozzio, B.B. (1975): Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45, 321-334.
- Lucy, J.A. (1972): Functional and structural aspects of biological membranes: A suggested role for vitamin E in the control of membrane permeability and stability. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 203, 4-11.
- McCay, C.M., Crowell, M.F., Maynard, L.A. (1935): The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon ultimate body size. *J. Nutr.*, 10, 63-79.
- McCord, J.M. és Fridovich, I. (1969a): Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055.
- McCord, J.M. és Fridovich, I. (1969b): The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I., *J. Biol. Chem.*, 244, 6056-6063.
- Medvedev, Zh.A. (1972): Repetition of molecular genetic information as a possible factor in evolutionary changes of life span. *Exp. Gerontol.* 7, 227-238.
- Miller, R.A. (1996): The aging immune system: Pimer and prospectus. *Science*, 273, 70-74.
- Mishra, H.P. és Fridovich, I. (1972): The univalent reduction of oxygen by reduced flavins ad quinones. *J. Biol. Chem.*, 247, 188-192.
- Mizuhashi, F., Murata, K., Katagaki, T., Nezu, M., Sano, M., Tomita, I. (1990): Antitumor activities of IKP104, a 4 (1 H)-pyrizonone derivative on cultured and implanted tumors. *Jpn. J. Cancer. Res.* 81, 1300-1306.
- Montano, R.F. és Morrison, S.L. (1999): A colorimetric-enzymatic microassay for the quantitation of antibody-dependent complement activation. *J. Immunol. Methods* 222, 73-82.
- Moore, D.C., Carter, D.L., Bhandal, A.K., Studzinski, G.P. (1991): Inhibition by 1,25 dihydroxyvitamin D3 of chemically induced erythroid differentiation of K562 leukemia cells. *Blood* 77, 1452-1461.
- Nagy, K., Pásti, G. Bene, L., 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 Radicals Res. Commun.*, 19, 1-15.
- Nagy, K., Pásti, G. Bene, L., Zs.-Nagy, I. (1995): Involvement of Fenton reaction products in differentiation induction of K562 human leukemia cells. *Leukemia Res.*, 19, 203-212.
- Niki, E., Saito, T., Kamya, Y. (1983): The role of vitamin C as an antioxidant. *Chemistry Letters*, 631-632.
- Oláh, E., Natsumeda, Y., Ikegami, T., Kote, Z., Horányi, M., Szelényi, J., Paulik, E., Kremmer, T., Hollán, S.R., Sugár, J., Weber, G. (1988): Induction of erythroid differentiation and modulation of gene expression by thiazofurine in K562 leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6533-6537.
- Ono, M., Aratani, Y., Kitagawa, I., Kitagawa, Y. (1990): Ascorbic acid phosphate stimulates Type IV collagen synthesis and accelerates adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Exp. Cell Res.* 187, 309-314.

- Oravecz, K. Bazsó-Dombi, E., Jeney, F., Nagy, K. Gecse, M. és Zs.-Nagy, I. (2001): The involvement of hydroxyl free radicals in differentiation of the PC-12 rat pheocromacytoma cell line. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 33, 64-69.
- Oravecz, K., Kalka, D., Jeney, F., M. Cantz, Zs.-Nagy, I. (2002): Hydroxyl free radicals induce cell differentiation in SK-N-MC neuroblastoma cells. *Tissue and Cell*, 34, 33-38.
- Orgel, L.E. (1963): The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)*, 49, 517-521.
- Orgel, L.E. (1970): The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67, 1476-1488.
- Orgel, L.E. (1973): Ageing of clones of mammalian cells, *Nature*, 243, 441-445.
- Ortaldo, J.R., Oldham, R.K., Cannon, G.C., Herberman, R.B. (1977): Specificity of natural cytotoxic reactivity of normal human lymphocytes against a myeloid leukemia cell line. *J. Natl. Cancer Inst.* 59, 77-82.
- Pape, M.E., Kim, K-H. (1988): Effect of tumor necrosis factor on acetyl-coen-zyme A carboxylase gene expression and preadipocyte differentiation. *Mol. Endocrinol.* 2, 395-403.
- Paré, W.P. (1965): The effect of chronic environmental stress on premature aging in the rat. *J. Gerontol.* 20, 78-85.
- Pawelec, G. és Solana, (1997): Immunosenescence. *Immunol. Today*, 18, 514-518.
- Pearl, L. (1928): *The Rate of Living*. Knopf A.A. Publisher, New York.
- Pelicci, P.G., Testa, U., Thomopoulos, P., Tabilio, A., Vainchenka, W., Titeux, M., Gourdin, M.F., Rochant, H. (1984): Inhibition of transferrin binding and iron uptake of hematopoietic cell lines by phorbol esters. *Leukemia. Res.* 8, 597-609.
- Pénzes, L. Boross, M. és Gergely, I. (1984): Az öregedés okai és a késleltetés biológiai lehetőségei. *Az öregedés*, szerk: Beregi Edit, Akadémiai Kiadó, Budapest, 18-37.
- Piez, K. (1968): Cross-linking of collagen and elastin. *Annu. Rev. Biochem.*, 37, 547-570.
- Porter, N.A. (1980): Prostaglandin endoperoxides in: *Free Radicals in Biology* Ed. Prior. W.A. Vol. IV. Academic. Press, New York, 261-294.
- Price, W.J., (1977): *Atomabszorpciós spektrometria*. Műszaki Könyvkiadó, Budapest.
- Pryor, W.A. (1976): *Free Radicals in Biology*. Vol. I, Academic Press, New York.
- Reiter, R.J. (1994a): Pineal function during aging: attenuation of melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol.*, 54, 31-39.
- Reiter, R.J. (1995a): The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of theories and of a data, *Exp. Gerontol.*, 30, 199-212.
- Reiter, R.J. (1995b): Intracellular actions of melatonin with a summary of interaction with reactive oxygen species. in: Frascini, F., Reiter, R.J. (1995) *The Pineal Gland and its Hormones*. Plenum Press, New York, 21-32.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Poeggeler, B., Menedez-Pelaez, A., Chen, L.D., Saarela, S., (1994b): Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Annal. N.Y. Acad. Sci.*, 719, 1-12.
- Ritchie, J.M. (1973): Energetic aspects of nerve conduction: the relationships between heat production, electrical activity and metabolism. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 26, 149-187.

- Rondinone, C.M., Baker, M.E., Rodhard, D. (1992): Progestins stimulate the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42, 795-802.
- Rondinone, C.M., Rodhard, D., Baker, M.E. (1993): Aldosterone stimulated differentiation of mouse 3T3-L1 cells into adipocytes. *Endocrinology* 132, 2421-2426.
- Rowley, P.T., Ohlsson-Wilhelm, B.M., Farley, B.A., LaBella, S. (1981): Inducers of erythroid differentiation in K562 human leukemia cells. *Exp. Hemat.* 9, 32-37.
- Rubin, H. (2002): Promise and problems in relating cellular senescence in vitro to aging in vivo. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 34, 275-286.
- Russell, P.J., Hicks, J.D., Burnet, F.M., (1966): Cyclophosphamide treatment of kidney disease in (NZB x NZW) F₁ mice. *Lancet*, 1, 1280-1284.
- Sagone, A.L.Jr., Greenwald, J., Kraut, F., Bianchine, J., Singh, D. (1983): Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems. *J. Lab. Clin. Med.*, 101, 97-104.
- Sandouk, T., Reda, D., Hofman, C. (1993): Antidiabetic agent pioglitazone enhances adipocyte differentiation of 3T3-F442A cells. *Am. J. Physiol.* 264, C1600-1608.
- Sanford, K.K., Earle, W.R. és Likely, G.D. (1948): *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)*, 9, 229-238.
- Selye, H. (1956): *The Stress of Life*, McGraw-Hill, New York.
- Selye, H. és Prioreshi, P. (1960): Stress theory of aging, In: *Aging; Some Social and Biological Aspects*. Shock, N.W. (ed.), Published by the American Association for Advancement of the Science. Washington, D.C., 261-272.
- Selye, H. és Tuchweber, B. (1976): Stress in relation to aging and disease. In: *Hypothalamus, pituitary and aging*. Everitt, A.V. and Burgess, J.A. (ed.) Thomas Springfield, 553-561.
- Serrero, G., Lepak, N.M., Goodrich, S.P. (1992): Paracrin regulation of adipose differentiation by arachidonate metabolites: prostaglandin F₂ α inhibits early and late markers of differentiation in the adipogenic cell line 1246. *Endocrinology* 131, 2545-2551.
- Serrero, G., Mills, D. (1991): Physiological role of epidermal growth factor on adipose tissue development in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3912-3916.
- Serrero, G. (1987): EGF inhibits the differentiation of adipocyte precursors in primary cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146, 194-202.
- Shantz, L.M., Talalay, P., Gordon, G.B. (1989): Mechanism of inhibition of growth of 3T3-L1 fibroblasts and their differentiation to adipocytes by dehydroepiandrosterone and related steroids: role of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A.* 86, 3852-3856.
- Smith, J.R. és Pereira-Smith, O.M. (1996): Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression, *Science*, 273, 63-67.
- Smith, R.C. és Lawing, L. (1983): Antioxidant activity of uric acid and 3-N-ribosyluric acid with unsaturated fatty acids and erythrocyte membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 223, 166-172.
- Smith, T.J., Bahn, R.S., Gorman, C.A., Cheavens, M. (1991): Stimulation of glycosaminoglycan accumulation by interferon gamma in cultured human retroocular fibroblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72, 1169-1171.

- Somogyi, B. és Damjanovich, S. (1975): Relationship between the lifetime of an ES-complex and properties of molecular environment. *J. Theor. Biol.*, 51, 393-401.
- Sparks, R.L., Allen, B.J., Strauss, E.E. (1992): TGF- β blocks early but not late differentiation-specific gene expression and morphologic differentiation of 3T3 T preadipocytes. *J. Cell Physiol.* 150, 568-577.
- Sparks, R.L., Strauss, E.E., Zygmunt, A.I., Phelan, T.E. (1991): Antidiabetic AD4743 enhances adipocyte differentiation of 3T3 T mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol.* 146, 101-109.
- Stadtman, E.R. (1986): Oxidation of proteins by mixed function oxidation systems: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem. Sci.*, 11, 11-12.
- Stone, R.L., Bernlohr, D.A. (1990): The molecular basis for inhibition of adipose conversion of murine 3T3-L1 cells by retinoic acid. *Differentiation* 45, 119-127.
- Strehler, B.L. (1959): Origin and comparison of the effects of time and high energy radiations on living systems. *Q. Rev. Biol.*, 34, 117-142.
- Strehler, B.L. (1960): Fluctuating energy demands as determinants of the death process. (A parsimonious theory of the Gompertz function) in *The Biology of Aging*. Strehler, B.L., Ebert, J.D., Glass, H.B. és Shock, N.W., Eds. Publ. No. 6, American Institute of Biological Science, Washington, DC, 309-314.
- Student, A.K., Hsu, R.Y., Lane, M.D. (1980): Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 255, 4745-4750.
- Szabó, J., Jeney, F., Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Nagy, K., Zs.-Nagy, I. (1999): Szabad gyökök lehetséges szerepe az endocrin ophtalmopathia kialakulásában. (Előzetes tanulmány). *Magy. Belorv. Arch.*, 52, 277-280.
- Szilárd, L. (1959a): A theory of aging, *Nature*, 184, 956-958.
- Szilárd, L. (1959b): On the nature of the aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 45, 30-40.
- Tanahashi, T., Yamaguchi, K., Ishikawa, S., Kusuhara, M., Adachi, I., Abe, O. (1991): Endothelin-1 inhibits adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 854-860.
- Tanka, D. és Keller, M. (1974): *Hisztotechnikai és hisztokémiai laboratóriumi praktikum*, Budapest, 193. és 195. old.
- Tappel, A.L. (1980): Measurement of and protection from in vivo lipid peroxidation. in *Free Radicals in Biology*. Vol. 4, W. A. Prior, Ed., Academic Press, New York 1-47.
- Tauber, R. és Reutter, W. (1981): Turnover of plasma membrane proteins and glycoproteins in normal and regenerating liver and Morris hepatoma 7777, *Eur. J. Cell Biol.*, 26, 35-42.
- Teixeira, C.C., Hatori, M., Leboy, P.S., Pacifici, M. Shapiro, I.M. (1995): A rapid and ultrasensitive method for measurement of DNA, calcium and protein content, and alkaline phosphatase activity of chondrocyte cultures. *Calcif. Tissue Int.*, 56, 252-256.
- Todaro, G., és Green, H. (1963): *J. Cell. Biol.* 17, 299-313.
- Toscani, A., Soprano, D.R., Soprano, K.J. (1990): Sodium butyrate in combination with insulin or dexamethasone can terminally differentiate actively proliferating Swiss 3T3 cells into adipocytes. *J. Biol. Chem.* 265, 5722-5730.

- Turek, F.W. (1995): Effects of age on the circadian system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 19, 53-58.
- Turrens, J.F. és Boveris, A. (1980): Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.*, 191, 421-427.
- Van Gool, W.A. és Mirmiran M. (1986): Aging and circadian rhythms. in *Progress in Brain Research* Vol. 7. Elsevier, Amsterdam, 255-277.
- Vassaux, G., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R. (1992): Prostacyclin is a specific effector of adipose cell differentiation. Its dual role as a cAMP- and Ca^{2+} - elevating agent. *J. Biol. Chem.* 267, 11092-11097.
- Verzár, F. (1955): Veränderungen der thermoelastischen Kontraktion von Sehnenfasern im Alter. *Helv. Physiol. Acta*, 13, C64-C67.
- Verzár, F. (1956): Altern des Collagens. *Helv. Physiol. Acta*, 14, 207-202.
- Verzár, F. (1958): Problems of general biology of aging. *J. Gerontol.*, 13, (Suppl. 1.), 6-15.
- Verzár, F. (1960): Demonstration of the increase of the binding of hydroxy-proline in the collagen of the skin with age, *Gerontologia*, 4, 104-111.
- Von Hahn, H.P. (1963): Age-dependent thermal denaturation and viscosity of crude and purified DNA prepared from bovine thymus. *Gerontologia*, 8, 123-131.
- Von Hahn, H.P. (1964): Age-related alterations in the structure of DNA. II. The role of histones, *Gerontologia*, 10, 174-182.
- Von Hahn, H.P. (1966): A model of regulatory aging of the cell at the gene level, *J. Gerontol.* 21, 291-294.
- Von Hahn, H.P. (1970): Structural and functional changes in nucleoprotein during the aging of the cell. *Gerontologia*, 16, 116-128.
- Von Hahn, H.P. és Verzár, F. (1963): Age-dependent thermal denaturation of DNA from bovine thymus. *Gerontologia*, 7, 105-108.
- Walford, R.L. (1969): *The Immunologic Theory of Aging*. Munksgaard, Copenhagen.
- Walling, C. (1975): Fenton's reagent revisited, *Acc. Chem. Res.*, 8, 125-131.
- Wang, H., Scott, R.E. (1993): Inhibition of distinct steps in the adipocyte differentiation pathway in 3T3 T mesenchymal stem cells by dimethyl sulphoxide (DMSO). *Cell. Prolif.* 26, 55-66.
- Worthington, R.E., Bossie-Condreanu, J., Van Zant, G. (1987): Quantitation of erythroid differentiation in vitro using a sensitive colorimetric assay for haemoglobin. *Exp. Haematol.*, 15, 85-92.
- Zucchetti, M., Catapano, C.V., Filippeschi, S., Erba, E., D'Incalci, M. (1989): Temozolomide induced differentiation of K562 leukemia cells is not mediated by gene hypomethylation. *Biochem. Pharmac.* 38, 2069-2075.
- Zs.-Nagy, I., (1978). A membrane hypothesis of aging. *J. theor. Biol.*, 75, 189-195.
- Zs.-Nagy, I., 1979. The role of membrane structure and function in cellular aging: a review. *Mech. Ageing Dev.* 9, 237-246.
- Zs.-Nagy, I. (1987): An attempt to answer the questions of theoretical gerontology on the basis of the membrane hypothesis of aging. *Advances in the Biosciences*, Vol. 64, 393-413, Pergamon, London, Oxford .
- Zs.-Nagy, I. (1988): The theoretical background and cellular autoregulation of biological waste product formation. In: I. Zs.-Nagy (ed), *Lipofuscin - 1987: State of the Art*, pp.: 23-50, Akadémiai Kiadó, Budapest, and Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

- Zs.-Nagy, I. (1989): Functional consequences of free radical damage to cell membranes. In: Miquel, J., Quintanilha, A. T., Weber, H. (eds.) CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, Vol. I. pp.: 199-207. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Zs. -Nagy, I. (1992): A proposal for reconsideration of the role of oxygen free radicals in cell differentiation and aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 673, 142-148.
- Zs.-Nagy, I. (1994): The Membrane Hypothesis of Aging. p. 207, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Zs.-Nagy, I. (1995): Semiconduction of proteins as an attribute of the living state: The ideas of Albert Szent-Györgyi revisited in light of the recent knowledge regarding oxygen free radicals. *Exp. Gerontol.* 30, 327-335.
- Zs.-Nagy, I. (1997): The membrane hypothesis of aging: Its relevance to recent progress in genetic research. *J. Mol. Med.* 75, 703-714.
- Zs.-Nagy, I. (2000): Membranes, aging and genome. In: C. Bertoni-Freddari, H. Niedermüller (eds): Vienna Aging Series, Vol. 6, 3-14.
- Zs.-Nagy, I. (2001): On the true role of oxygen free radicals in the living state, aging and degenerative disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 928, 187-199.
- Zs.-Nagy, I. (2002): The biological waste product formation in the light of the membrane hypothesis of aging. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 34, 329-341.
- Zs.-Nagy, I. és Floyd, R.A. (1984): Hydroxyl free radical reactions with amino acids and proteins studied by electron spin resonance spectroscopy and spin trapping. *Biochim. Biophys. Acta* 790, 238-250.
- Zs.-Nagy, I. és Floyd, R.A. (1991): The effect of the molecular environment on the kinetics of catalase reaction and its relevance to cell aging. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 13, 187-200.
- Zs.-Nagy, I. és Nagy, K. (1980): On the role of cross-linking of cellular proteins in aging. *Mech. Ageing Dev.*, 14, 245-251.
- Zsupán, I., Hadházy, Cs., Zs.-Nagy, V., Jeney, F. és Zs.-Nagy, I. (1987): The effect of OH· radicals generated by Fenton reaction on the growth and cartilage differentiation in limb bud cell culture. *J. Submicrosc. Cytol.*, 19, 445-455.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani a Gerontológiai Tanszéken dolgozó kollegáimnak disszertációm elkészítésében nyújtott segítségükért.

Dr. Zs.-Nagy Imre egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, korábbi tanszékvezetőmnek, akinek szakmai és emberi támogatása nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.

Dr. Imre Sándor egyetemi docensnek, jelenlegi tanszékvezetőmnek, aki segítőkész szakmai tanácsokkal látott el és őszintén lelkesített.

Dr. Bazsó-Dombi Enikő és Oravecz Katalin Ph.D. hallgatóknak, akik a laboratóriumi munkákban sokszor segítségemre voltak, és akikkel a kísérleti munkák egy részét együtt végeztük.

Csigéné Láber Katalin asszisztensnőnek, aki munkájával, türelmével, barátságával mellettem állt.

Köszönetemet fejezem ki a Tanszéken kívüli alábbi kollégáknak is:

Dr. Szabó Jenő egyetemi docensnek, szakmai és emberi segítségéért.

Dr. Schlammadinger József, és Dr. Nagy Endre egyetemi docenseknek, továbbá **Dr. Balázs Erzsébet, Dr. Teichmann Farkas és Dr. Jónás Zoltán** egyetemi adjunktusoknak a vizsgálati anyagok rendelkezésemre bocsátásáért, és szakmai-metodikai segítségükért.

Bessenyei Mária, Deák Györgyné, Harangi Istvánné, Kissné Sziráki Valéria, Kovács Ildikó, Szöllősi Lászlóné kolleganőknak, azért hogy szakmai tapasztalataikat megosztották velem és ezzel segítették munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban családomnak, gyermekeimnek köszönök mindent.