

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

- Egyetemi Doktori (Ph.D.) értekezés -

Írta:

ORAVECZ KATALIN

Témavezető:

Prof. Dr. Zs.-Nagy Imre

Biol. tud. doktora

Debreceni Egyetem

Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Általános Orvostudományi Kar

III. sz. Belgyógyászati Klinika, Geriátriai Tanszék

(volt Gerontológiai Tanszék)

DEBRECEN, 2003

FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AchE (acetilkolin-észteráz)

BrdU (5-bróm-2'-dezoxi-uridin)

CA (kataláz)

GPx (glutation-peroxidáz)

GS (gangliozid-szialidáz)

MHA (membran hypothesis of aging = az öregedés membrán hipotézise)

NGF (nerve growth factor = ideg növekedési faktor)

O₂^{-·} (szuperoxid anion)

OH[·] (hidroxil szabadgyök)

SOD (szuperoxid-dizmutáz)

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	7
2.	CÉLKITŰZÉSEK	10
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
3.1	Öregedési elméletek	11
3.1.1	Kauzális öregedési elméletek	11
3.1.2	Szisztematikus öregedési elméletek	15
3.1.3	Evolúciós öregedési elméletek	17
3.1.4	Öregedési elméletek ma	18
3.2	Az öregedés membrán hipotézise	20
3.2.1	A fiziko-kémiai körülmények szerepe az öregedésben	20
3.2.2	Az oxigéneredetű szabadgyökök keletkezése és biológiai szerepe	22
3.2.2.1	<i>A szuperoxid anion gyökök és a szuperoxid-dizmutáz</i>	23
3.2.2.2	<i>A hidrogén-peroxid, a kataláz és a glutation-peroxidáz</i>	24
3.2.2.3	<i>A Fenton reakció</i>	26
3.2.2.4	<i>A hidroxil szabadgyök</i>	26
3.2.3	Az öregedés membrán hipotézise	27
3.2.3.1	<i>Az öregedés membrán hipotézise főbb pontjai</i>	28
3.3	Az acetilkolin-észteráz és a gangliozid-szialidáz	32
3.3.1	Az acetilkolin észteráz	32
3.3.2	A gangliozidok és a gangliozid szialidáz	32
3.4	Közvetlen kísérleti előzmények, kérdésfelvetés	35
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	37
4.1	Anyagok	37
4.1.1	Sejtvonalak	37
4.1.1.1	<i>PC-12 sejtvonal</i>	37
4.1.1.2	<i>SK-N-MC sejtvonal</i>	38
4.1.2	Vegyszerek és reagensek	38
4.1.3	Radioaktív reagensek	39

4.1.4	Tápfolyadékok és alkotórészeik	39
4.1.5	Műszerek	40
4.1.6	Eszközök	40
4.2	Módszerek	41
4.2.1	Tenyésztési módszerek	41
4.2.2	Kezelések	41
4.2.3	Sejtszám meghatározás	42
4.2.4	Életképesség vizsgálat	43
4.2.5	Fénymikroszkópos vizsgálatok és fotózás az SK-N-MC sejteknél	43
4.2.6	Szolubilizálás (SOD, CA és GPx enzimekhez)	43
4.2.7	Szuperoxid-dizmutáz aktivitás meghatározás	44
4.2.8	Kataláz aktivitás meghatározás	45
4.2.9	Glutation-peroxidáz aktivitás meghatározás	46
4.2.10	Acetilkolin-észteráz aktivitás meghatározás	48
4.2.11	Gangliozid-szialidáz aktivitás meghatározás	50
4.2.12	Fehérje és DNS mérések	51
4.2.12.1	<i>Fehérje mérés</i>	<i>51</i>
4.2.12.2	<i>DNS mérés/1</i>	<i>52</i>
4.2.12.3	<i>DNS mérés/2</i>	<i>54</i>
4.2.13	Statisztikai elemzés	55
5.	EREDMÉNYEK	56
5.1	A PC-12 sejtvonalon végzett mérések eredményei	56
5.2	AZ SK-N-MC sejtvonalon végzett mérések eredményei	61
6.	MEGBESZÉLÉS	73
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	77
8.	IRODALOMJEGYZÉK	78
9.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	96
10.	FÜGGELÉK	97

1. BEVEZETÉS

Az öregedés membrán hipotézise (membran hypothesis of aging = MHA) megfogalmazza, hogy az élő szervezetekben egy állandó hidroxil szabadgyök (OH^\bullet) termelődés folyik (Zs.-Nagy, 1994). Ez az állandó szabadgyök áram – úgy tűnik – jelentős biológiai szereppel bír. Az elmélet kitér a differenciálódás és az öregedés jelenségeinek értelmezésére, valamint a OH^\bullet -szabadgyökök szerepére ebben a folyamatban. Az MHA szerint az öregedés a differenciálódás "túlfutása", így ezek mozgatórugója is közös. Tudjuk, hogy a génexpresszió sebessége az életkorral párhuzamosan csökken, az öregedés ebből a szempontból való megközelítése általánosan elfogadott. Ennek lehetséges okait Strehler (1962, 1977, 1982) fogalmazta meg, szerinte a génexpresszió öregedéssel párhuzamos csökkenése három féle okra vezethető vissza, ezek (1) a genetikai kód elvesztése, (2) a genetikai kód kiolvasó-rendszerének elvesztése, valamint (3) a kiolvasó rendszer működési feltételeinek megváltozása.

Az MHA a harmadik csoportra helyezi a hangsúlyt, miszerint a differenciálódás és az öregedés során a OH^\bullet -szabadgyökök folyamatos jelenléte (és más paraméterek, pl. az akciós potenciálok reziduális hője) a sejtek fiziko-kémiai tulajdonságait változtatják meg lépésről-lépésre oly módon, hogy az végül is az öregedéshez vezet, és amelyből az öregedés összes jelensége levezethető. Úgy tartjuk tehát, hogy a szervezetünkben folyamatosan termelődő szabadgyökök -mivel kémiai természetük adott-hasonló funkciót töltenek be egy fejlődő és egy öregedő szervezetben. De hatásuk mégis kettéválasztható abból a szempontból, hogy míg egy fejlődő szervezetben vagy differenciálódó sejtben éppen az érési folyamat hajtóereje a szabadgyökök közvetlen és a fiziko-kémiai paramétereken keresztül közvetett hatása, addig a teljes maturációs állapotot elért szervezetben éppen a megszerzett funkciók elvesztése, lassúbbá válása következik be hatásukra. Továbbá, amikor a szabadgyökök károsító hatásairól és így azok eliminálásának lehetőségéről beszélünk, érdemes különbséget tenni az egyes kóros folyamatokhoz kapcsolódó szabadgyök hatások és az állandó, fiziológias szabadgyök fluxus között.

A fenti elméletekhez kapcsolódva kezdtem vizsgálni a szabadgyökök lehetséges indukáló szerepét a sejt differenciálódási folyamatokban. Munkámhoz két neuroblasztóma sejt vonalat választottam. Miért? Tudjuk, hogy az idegrendszer központi jelentőséggel bír az érési és az öregedési folyamatok során. Ha elfogadjuk továbbá azt a tényt is, hogy a nagyobb oxigén fogyasztás több szabadgyök termelődésével jár együtt, akkor fontos figyelembe venni, hogy a központi idegrendszer sokkal több oxigént fogyaszt, mint más szövetek, így sokkal több szabadgyököt is termel, mint más szövetek, ami szintén indokolja, hogy kísérleteinkben neuroblasztóma modellekre esett a választás. További érdekes kísérleti tény, hogy az emlősökben az idegrendszer oxigénfogyasztása a születés után jelentős mértékben megemelkedik, amikor is viszonylag rövid idő alatt az idegsejtek differenciálódása végbemegy (Jones et al., 1982) éppen a magasabb oxigén koncentráció mellett. A fiatal egyedek több oxigént fogyasztanak, mint az idősebbek, így bennük ezzel párhuzamosan több szabadgyök termelődik, a fiatal organizmusok mégis képesek nőni és differenciálódni, míg az idősebbek az alacsonyabb oxigénfogyasztás (=alacsonyabb gyöktermelés) ellenére is elvesztik megszerzett funkcióikat. Ezt a jelenséget a Harman-féle „öregedés szabadgyökös elmélete” (Harman, 1956, 1960, 1988) paradoxonjaként is emlegetik (Zs.-Nagy, 1994). Tudjuk azt is, hogy a megemelt oxigén nyomás in vitro számos sejt vonal proliferációs rátáját csökkenti (Grant et al., 1992; Absher et al., 1994), így neuroblasztóma sejt vonalakét (PC-12) is, ahol a differenciáltabb fenotípus kialakulását is elindítja (Kato et al., 1997). Mindezek alapján felmerül a kérdés, hogy a szabadgyökök részt vesznek-e, és ha igen, akkor hogyan és milyen hatással a differenciálódási folyamatok indukálásában.

Érdekes új megvilágításba és újra az érdeklődés középpontjába helyezte a szabadgyököket annak felfedezése is, hogy egyes oxigén eredetű szabadgyökök másodlagos hírvivő szerepet töltenek be szignáltranszdukciós folyamatokban (Schreck és Bauerle, 1991), mint például nagyon érdekes módon az ideg növekedési faktor (nerve growth factor=NGF) differenciálódást indukáló hatása során (Suzukawa et al., 2000).

Tehát a fenti tények, a laboratóriumunkban más sejt vonalokon végzett korábbi hasonló kísérletek eredményei (Nagy et al., 1993, 1995), valamint az

általánosíthatóság igényéből kiindulva méréseimet két modellen, a PC-12 és az SK-N-MC neuroblasztóma sejtvonalakon végeztem. A vizsgálatok konkrétan arra vonatkoztak, hogy egyszeri és ismételt OH^\bullet fluxus indukáló hatással bír-e a fenti sejtvonalak differenciálódására, illetve annak elindítására. A vizsgálatok két kérdéskörben történtek.

Először a PC-12 sejtvonalon azt vizsgáltuk, hogy az oxigénből származó gyököket átalakító és elimináló enzimek -a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a kataláz (CA) és a glutation-peroxidáz (GPx)- aktivitása hogyan változik a Fenton reakcióval való kezelésekre hatására. Másodsorban arra voltunk kíváncsiak, hogy a kezelésekre hatására megjelennek-e differenciálódási markerek a sejtekben. Ebben a kérdéskörben az SK-N-MC sejtvonalon vizsgáltuk az acetilkolin-észteráz (AChE) és a gangliozid-szialidáz (GS) enzimek aktivitásbeli különbségeit a Fenton reakcióval való kezelésekre előtt és után.

Dolgozatom további része először a konkrét célkitűzéseket fogalmazza meg. Ezután, az irodalmi áttekintés fejezetben, az öregedési elméletek kerülnek röviden ismertetésre, majd az MHA, amelyhez kapcsolódóan részletesebben bemutatásra kerülnek a vizsgált enzimek közül a SOD, a CA és a GPx. Ezek után a további mért paraméterek, az AChE és a GS biológiai szerepének ismertetése, majd a fejezet végén a közvetlen kísérleti előzmények bemutatása, és a kérdésselvetés következik. A módszertani ismertető után következik az eredmények felsorolása és értékelése (megbeszélés), majd az összefoglalás. Dolgozatomat az irodalomjegyzék, és a köszönetnyilvánítás zárja.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérletes munkám ahhoz a tágabb kutatási koncepcióhoz kapcsolódik, miszerint a szervezetünkben folyamatosan termelődő OH^\bullet -szabadgyökök nemcsak káros hatásokkal bírnak az élő szervezetre nézve, hanem bizonyos koncentrációban való jelenlétük esszenciális az élő állapot fenntartásában, ezenkívül részt vesznek a sejt differenciálódási folyamatokban is, mint indukáló tényezők. A következő fejezetben részletesen ismertetésre kerül ennek értelmezése, itt röviden a konkrét célkitűzéseket ismertetem. Ezek a következők:

(1) A OH^\bullet -szabadgyökök differenciálódást indukáló hatásának bizonyítása tenyésztett neuroblasztóma sejtvonalakon.

(2) Az oxigénből származó reaktív gyököket átalakító és elimináló enzimek, a SOD, a CA és a GPx aktivitásbeli változásainak vizsgálata a Fenton reakcióval való kezelések hatására a PC-12 sejtvonalon.

(3) Differenciálódási markerek, az AchE és a GS enzimek aktivitásbeli változásainak vizsgálata a Fenton reakcióval való kezelések hatására az SK-N-MC sejtvonalon.

(4) Az öregedéssel kapcsolatos elméletek – különös tekintettel az MHA-ra –, valamint az oxigén eredetű szabadgyökök biológiai szerepének mélyebb megismerése.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Öregedési elméletek

Az öregedéssel kapcsolatos elméletek szakirodalma igen bőséges, egyes szerzők több mint 300 öregedési elméletet említenek. Sok ezek közül már csak tudománytörténeti érdekesség, mert az újabb kutatási eredmények tükrében nem állják meg a helyüket. A meglévő elméletek közül jó néhány átfedi egymást, mint például a „keresztkötődések” elmélete (Björksten, 1942; King, 1946), a „kollagén-öregedés” elmélet (Verzár, 1955, 1956, 1965) vagy a Harman-féle „szabadgyökös” öregedési teória, melyek mindegyike ugyanazon jelenséget járja körül, nevezetesen, hogy a OH^\bullet -szabadgyökök mindenfajta molekula – úgymint fehérjék, lipidek – kovalens keresztkötéseit hozzák létre. Sok szerző rendszerezte az öregedési elméleteket (Platt, 1976; Strehler, 1976; Esposito, 1983; Harrison, 1985; Hayflick, 1985). Esposito például megkülönböztet kauzális (1), szisztematikus (2) és evolúciós (3) megközelítésben felállított öregedési teóriákat. Meg kell említeni, hogy néhány elméletet több csoportba is be lehetne sorolni, valamint nem adható meg egy teljes mértékű történeti (tudománytörténeti) áttekintés, mivel az elméletek egy részét egy-mással egy időben, párhuzamosan írták le.

3.1.1 Kauzális öregedési elméletek

Az ide sorolható elméletek közös jellemzője, hogy az öregedés okaként kis, nemszignifikáns, sporadikus és stochasztikus folyamatok akkumulációját írják le a komplex biológiai rendszerekben.

A szomatikus mutációk elmélete szerint környezeti hatásokra (mint kemikáliák, ionizáló sugárzás) a posztmitotikus sejtekben kromoszóma elváltozások jönnek létre. A '30-as, '40-es évekre nyúlik vissza ennek kísérleti háttere (Russ és Scott, 1939; Henshaw et al., 1947), majd az elméletet Szilárd Leó (Szilárd, 1959a, 1959b) fogalmazta meg. Az elmélet megszületésekor még nem volt ismert a DNS repair mechanizmus, miszerint 20-

szorosan vagyunk túlbiztosítva a szomatikus mutációk ellen, így a DNS állomány stabil (Ames et al., 1985).

A genetikus mutációk elmélete az előző továbbfejlesztett változata, miszerint az előbbiekhöz hasonló mutációk a premitotikus (stem) sejteket érintik (Strehler és Freeman, 1980), így a hibák azok DNS állományában, valamint a DNS polimerázok funkciójában, s így a repair rendszer hatékonyságában következnek be, ami végső soron tökéletlen fehérjeszintézist eredményez. Ezt az elképzelést Medvedev publikálta először 1961-ben, majd továbbfejlesztve Orgel 1963-ban, akinek munkája révén vált széles körben ismertté, ő használta először a hibakatasztrófa kifejezést is, mely elmélet már egyértelműen a hibás fehérjéket, azok felhalmozódását tekinti az öregedés okának, s mivel az enzimek maguk is fehérjék, ez a felhalmozódás logaritmusos, mintegy robbanásszerű. A szerző később módosította, majd visszavonta ezt az elméletet (Orgel, 1970, 1973).

A kopási jelenségek elmélete egy mechanisztikus elképzelés, miszerint a szervek működés közben ugyanúgy elhasználódnak, mint a mechanikusan működő gépek. Mivel az élettani funkciók elvesztése az öregedés során már a régi időkben is ismert volt, így ez az elmélet évszázadokra nyúlik vissza. 1795-ben Erasmus Darwin (Charles Darwin orvos nagyapja) leírta, hogy az öregedés során az élő szervezetek elvesztik ingerlékenységüket. Nagyon sok szerző foglalkozott ezzel a kérdéssel a múlt században (Weismann, 1882) és ebben a században is (Lorand, 1904; Selye, 1946). Sokan úgy gondolták, hogy a kopási jelenségeket külső tényezők okozzák (Darányi, 1930), mint például a kozmikus sugárzás (Kunze, 1933). Kunze elmélete része volt a szomatikus mutációk teóriájának is, így ez is egy jó példa arra, hogy az elméletek átfedik egymást. A kopási jelenségekkel kapcsolatos leírások főként makroszkopikus megfigyelésekre hagytak és az ennek megfelelő terminológiával írták le azokat, hiszen akkoriban a mai molekuláris biológiai tudás csaknem teljesen hiányzott.

Az ún. „rate of living” elmélet is a kauzális elméletek csoportjába sorolható (Pearl, 1928), mely annak az elképzelésnek a továbbfejlesztése, miszerint a metabolikus ráta és az élettartam között összefüggés van (Rubner, 1908), és minden élő szervezetben létezik egy genetikusan meghatározott metabolikus potenciál, amennyiben ez fokozottabb, akkor rövidebb élettartam

társul hozzá. Számos szerző csatlakozott ezen teóriakörhöz, igen nagy mennyiségű és jól használható kísérleti munkával, melyek közül azok, melyek intrinsic faktorokat tesznek felelőssé az öregedési folyamatokban, és ezek közül főként biokémiai paramétereket említenek (mint a szabadgyökök okozta DNS károsodás, a hőszabályozás zavara, vagy például az enzimaktivitásokban bekövetkezett változások), beilleszthetők – legalábbis részben – a mai felfogásba (Sohal, 1985, 1988; Sohal és Allen, 1985, 1990).

Bizonyos tekintetben az élő szervezetek mechanikus gépeknek tekinthetők, melyek a környezetből érkező anyag, energia és információ feldolgozása során autodesztrukciós károsodásokat szenvednek, melyekkel szemben a különböző fajok eltérő hatékonyságú autoreparációs képességeket fejlesztettek ki az evolúció során. A kopási jelenségek elméletkörének igen erős hatása volt a későbbi elméletek kialakulására, hiszen felveti a kérdést, hogy miért következik be változás az életkor során az autoreparációs mechanizmusok hatékonyságában.

A keresztkötések elmélete szerint az öregedés során kovalens kötések jönnek létre a molekulákon belül és a molekulák között, ennek hatására a molekulák szerkezete fokozatosan megváltozik, és egy bizonyos határ elérése után funkcióvesztés következik be. Ez a teória tulajdonképpen a kopási jelenségek elmélet precízebb megfogalmazása. Az elmélet első sugallói Björkstein (1942) és King (1946) voltak, majd igen fontos felfedezést jelentett az, hogy az élet folyamán megnövekszik a kollagén kovalens keresztkötéseinek száma (Verzár, 1955, 1956, 1957, 1958, 1963, 1964). Ezekkel a kísérleteivel Verzár a kísérletes gerontológia megalapítójává vált Európában. Fő kérdése az volt, hogy vajon miért nő meg az életkorral a kollagén keresztkötéseinek száma.

A Harman-féle elmélet, az öregedés szabadgyökös elmélete (Harman, 1956, 1960, 1988) ugyanezen időben született, ő azt hangsúlyozta, hogy az oxigén anyagcseréjéből származó, és ezért oxigén eredetűnek nevezett szabadgyökök szerepet játszanak a molekuláris funkciók életkorral való elvesztésében. A szabadgyököket az oxidatív anyagcsere káros melléktermékeinek tekinti. Fontos hangsúlyozni, hogy ez az elmélet felhasználta az akkoriban igen jelentős tudásanyagot és kísérleti eredményeket felhalmozó

polimer kémia egyik megfigyelését, nevezetesen, hogy a szabadgyökök polimerképző képességgel rendelkeznek (Pryor, 1976).

Mérföldkő volt az öregedési elméletek fejlődésében a keresztkötéses és a szabadgyökös elméletek ötvözése, úgy is, mint azok ok-okozati kapcsolatának felismerése, mindamellet igen lényeges kérdések maradtak válasz nélkül, melyeket az öregedés szabadgyökös elmélete paradoxonjaként emlegetnek (Zs.-Nagy, 1986). Ez a paradoxon röviden a következő. Ha elfogadjuk a szabadgyökök szerepét az öregedési folyamatban, szükséges elsőként megemlíteni, hogy a gyökök agresszivitása, és kémiai természete nem változik az életkorral, a fiatal szervezetek mégis nőnek és differenciálódnak, míg az idősök strukturális és funkcionális megjelenésükben egy hanyatló tendenciát mutatnak. Ráadásul a fiatal szervezetek sokkal több oxigént fogyasztanak, így bennük nagyobb mennyiségű szabadgyök termelődik. Ezekre magyarázatot, és egyben a paradoxon feloldását az *MHA* adja meg (Zs.-Nagy, 1994), melyet a következő fejezetben részletesebben ismertetek.

Az akkumulációs teóriák szerint az öregedés oka bizonyos anyagok felhalmozódása a sejtekben, ami egy bizonyos szint után a sejtfunkció megszűnésével jár. A legismertebb ezek közül a lipofuszcín, vagy más néven „öregedési pigment”, de említhetnénk a kollagént (Verzár, 1956), a neurofibrillumok számának megnövekedését az agyban (Terry és Gershon, 1976) vagy akár funkcióvesztett enzimek felhalmozódását a sejtekben (Gershon és Gershon, 1970, 1973; Reiss és Rothstein, 1974). A lipofuszcín először az idegsejtekben, a májsejtekben, szívizomsejtekben jelenik meg és sokan ezeket az öregedés fő „biomarkerének” tekintik (Glees és Hasan, 1976; Donato és Sohal, 1981). A lipofuszcín kémiai értelemben extrémén keresztkötött, inszolubilis makromolekulák halmaza. Megjelenésének oka a nem megfelelő enzimműködés a lizozómában. Jelenléte valóban káros a sejtműködést illetően, mert jelentős térfogatot képvisel a sejtben (Glees és Hasan, 1976).

Jelenleg a lipofuszcín kutatás más irányt vett, hiszen bizonyított, hogy a folyamat reverzibilis, lizozóma stimuláció hatására a lipofuszcín eltűnik; valamint termelődése fiatal egyedek sejtjeiben is folyik, a különbség az, hogy itt nem halmozódik fel, azonban a felhalmozódás itt is előidézhető a

lizoszómális enzimek gátlásával. A leupeptin egy lizoszómális tiol-proteáz inhibitor, fiatal patkányok agyába juttatva, a Purkinje-sejtek és más agysejtek is „öregedési pigment” felhalmozásba kezdenek (Ivy et al., 1984, 1986). Ugyanezt kimutatták a májban (Ivy et al., 1986), a retina pigment epitheliumban (Smith és Ivy, 1989), a hasnyálmirigyben, a vesében (Ivy et al., 1991), valamint tenyésztett fibroblasztokon (Wolfe et al., 1988). Mindezek a kísérletek igen jelentős elméleti áttörést hoztak, miszerint a lipofuszcín felhalmozódás nem kizárólag öregkori jelenség. A valóság az, hogy a különbség onnan adódik, hogy a fiatal szervezetek nagy sebességgel bontják le a lipofuszcint, az idősebb szervezetek sejtjeiben lassúbb ez a lebontási folyamat, mint minden más egyéb funkció is.

3.1.2 Szisztematikus öregedési elméletek

Ezek az elméletek, az előző csoporttal ellentétben, nem specifikus faktorok okozataként értelmezik az öregedési folyamatot, hanem az organizmusok számára életfontosságú szervek közötti nem megfelelő interakciók következményének tartják.

Az öregedési program elmélete szerint számos gén irányítja az öregedési folyamatot, melyek pozitív vagy negatív önszabályozási ellenőrzés alatt állnak, és akkor aktiválódnak, amikor a szervezet eléri a teljes maturációs állapotát. Az első és fő verziója ezen teóriáknak a Hayflick-féle hipotézis (Hayflick, 1965, 1982), amely szerint a lehetséges sejtosztódások száma genetikusan meghatározott, és ez a korlát vezet az öregedéshez. Elméletét arra alapozta, hogy az általa vizsgált humán fibroblasztok 50 osztódásra voltak képesek in vitro, ha embrionális eredetűek voltak, és 20-ra, ha felnőtt szervezetből származtak. Tudjuk, hogy az in vitro állapotok igen messze vannak az in vivo körülményektől. Egy későbbi kísérletből az derült ki, hogy ha ugyanezeket a sejteket alacsonyabb oxigén tartalom mellett tenyésztették (a Hayflick kísérletek 95% O₂ tartalom mellett történtek), 3-szor nagyobb osztódási számot kaptak (Packer és Fuehr, 1977; Balin, 1982, 1985). Az is világossá vált, hogy ezek a sejtek nem elpusztulnak, hanem posztmitotikussá válnak, így más körülményekre lenne szükségük, melyek viszont in vitro nem biztosítottak (Holliday, 1990; Bayreuther et al., 1992).

Hayflick és sok más szerző öregedésről alkotott program teóriái közös pontja, hogy egyfajta „biológiai óra” létezését feltételezik, mely jelzi, „tudja” az eltelt időt és következőképp diktálja az öregedés ütemét. Ezt a biológiai órát számos külső és belső faktoral próbálták azonosítani anélkül, hogy az általánosíthatóság igényét fenntartották volna.

A fejlődési program szétesése elmélet szerint, rendelkezünk egy programmal, ami a növekedés és érés idejére érvényes, majd amikor ez már nem működik, megkezdődik az öregedési folyamat (Van Heukelem, 1978). Könnyű belátni, hogy ez az elmélet tulajdonképpen a genetikai mutációk elméletének egy változata.

Egy másik nézet szerint, melynek diszifferenciálódási hipotézis (DHAC) a neve (Cutler, 1982a, 1982b, 1985a, 1985b), és az öregedésre, valamint a tumorképződésre vonatkozik, az öregedés a nem megfelelő gén-szabályozás eredménye, melyet az oxigén eredetű szabadgyökök közvetlenül a génekre gyakorolt hatása okoz (Macieira-Coelho, 1990), továbbá e folyamatok beindulását a teljes maturációs állapot eléréséhez köti, így, hasonlóan a fenti elméletekhez, egy kitüntetett időponthoz kapcsolja („biológiai óra”) az öregedési jelenségek kezdetét. A diszifferenciálódási hipotézis a transzkripciós és translációs apparátus, tehát a genetikai kód kiolvasó-rendszerének hibájáról is beszél, amivel nagyban kiegészíti az MHA-t, amely azonban egyrészt fiziko-kémiai szemléletével hoz újat ezen elméletek sorában (Zs.-Nagy et al., 1988), továbbá -a DHAC-val ellentétben- nem tagolja szakaszokra a maturációs folyamatot, azaz az öregedést, az öregedés "kezdetét" nem köti egy kitüntetett időponthoz, ezenkívül a géneket nem tekinti kitüntetett szabadgyök célpontnak.

Az autoimmun elmélet szerint az öregedés abban nyilvánul meg, hogy az egyed egyre kevésbé tud különbséget tenni a „saját” és a „nem-saját” között. Tudjuk, hogy ez sem általánosítható, mivel az alacsonyabban fejlett élőlényeknek nincs az emlősökével összehasonlítható immunrendszere. Logikailag ez az elmélet rokon a szomatikus mutációk elméletével, hiszen mindkettő nem megfelelően működő molekulák felhalmozódását véli az öregedés okának. Nehezen elfogadható, hogy a szervezetben kitüntetett szervre vagy sejtcsoportra, nevezetesen az immunrendszerre vonatkozna az

öregedési folyamat. A hetvenes években igen népszerű teória mára elvesztette jelentőségét.

A szervi kölcsönhatások zavara elmélet is domináns szereppel tüntet ki egyes szerveket, különösképpen az ideg- és hormonrendszert, így evolúciós szempontból ez sem általánosítható. Ide sorolható a kalória restriktió elmélete is, mely a táplálkozást helyezi előtérbe, mivel az hatással van minden másra. Rágcsálóknál leírták és használják a diétát, mint eszközt, az élettartam meghosszabbítására (Osborne és Mendel, 1915; Weindruck és Walford, 1988), ennek oka nem teljesen tisztázott, viszont igen lényeges azt hangsúlyozni, hogy mindezeket a jelenségeket nem vad típusú, hanem imbred törzseken írták le laboratóriumi körülmények között. Ezek a kísérletek már főemlősökön is folynak (Cutler et al., 1992; Weindruck, 1996; Wanagat et al., 1999). Úgy gondoljuk, hogy az öregedési folyamat okaként egy evolúciósan és a szervezeten belül is általánosítható folyamatot kell leírnunk.

3.1.3 Evolúciós öregedési elméletek

Kirkwood (1985) írt egy összehasonlító munkát, melyben részletesen leírja az evolúciós öregedési elméleteket. Kirkwood és Cremer (1982), valamint Esposito (1983) úgy gondolják, hogy az ilyen irányú kutatások nem fognak áttörő eredményt hozni, éppen a kísérleti adatok hiánya miatt. Az ide sorolható teóriák tehát jellegükből adódóan inkább spekulatívak, kiindulópontjuk az, hogy az élettartam minden létező faj számára pleiotróp gének által meghatározott. Mások szerint ehhez járulhat még a külső környezet hatása, ide sorolván a fehérjéket is, melyek valamilyen szelekciós nyomás alatt állnak.

A kalória restriktió elmélet napjainkban egy igen érdekes, új megvilágításba került. Magyarázattal eddig senki nem szolgált arra vonatkozóan, hogy hogyan okoz a kalória megvonás élettartam hosszabbodást, valamint lassúbb öregedési folyamatot. Shanley és Kirkwood (2000) viszont azt a feltevést teszik – éppen evolúciós nézőpontból, egy matematikai modell segítségével levezetve –, hogy a fent említett tapasztalatok, egy adaptációs mechanizmust jelentenek, azaz az állatnak, az általában rövid periódusokban fennálló éhezés esetén, több esélye van a túlélésre, amennyiben a reproduk-

cióról az élettartam meghosszabbítására „koncentrál”, így van esélye megélni az éhezéssel időszerűségét, majd visszatérni az utódok nemzésére. Tehát az élettartam hosszabbodása a reprodukciós időtartam hosszabbodását jelenti így, és ez az adaptációs képesség egy evolúciós előnyt jelent. A fenti szerzőpáros és mások is (Hart és Turturro, 1998) felvetik, hogy e hipotézis mégis értelmezhető evolúciós kontextusban, továbbviszik ezzel az evolúciós öregedési elméletek létjogosultságát is.

3.1.4 Öregedési elméletek ma

Napjainkban sincs még kiforrott, egységes állásfoglalás az irodalomban az öregedés folyamatáról és az azt kiváltó oki tényezőkről. Az irodalom fő irányvonalait keresve, először is az tűnik szembe, hogy sok kutatócsoport csatlakozik a fentebb ismertetett valamelyik elmélethez, és építi arra kísérletes munkáját, igen sok jól használható, érdekes és az adott szempontból jól értelmezhető adatot szolgáltatva. Ezenkívül megfigyelhető a régebbi elméletek továbbfejlesztése, illetve leszűkítése egy vagy néhány paraméter irányába, vagy mások – épp ellenkezőleg – az öregedési folyamat multifaktorialitását hangsúlyozzák. Néhány példát emelnék csak ki röviden.

Morley (1998) szerint például a szomatikus mutációk elmélete egyre inkább igazolódni látszik, hiszen, mint írja, mind több kísérleti adat bizonyítja, hogy a random mutációk száma és az élettartam között párhuzam van, valamint ezen mutációk akkumulációja figyelhető meg az életkorral.

Az öregedés szabadgyökös elmélete, amely, mint már említettem, Harmantól származik, a mai napig igen népszerű (ennek megfelelően publikáltsága igen széles és szerteágazó) a hozzá kapcsolódó oxidatív stressz hatások vizsgálatával együtt. Az erre épülő kísérletek a szabadgyökök kémiai természetével és károsító hatásaival foglalkoznak, valamint a károsító hatásokat kivédő antioxidánsok szerepével (Sohal et al, 1986; Harman, 1998; Ashok és Ali, 1999). A szabadgyökök szerepét széles körben vizsgálják a különböző patológiás folyamatokban is (Ames et al., 1993; Sohal és Orr, 1995; Halliwell, 1996; Yu és Yang, 1996; Knight, 1998).

A fenti elmélet egyik specializációja a mitokondriális mutációs elmélet, mely a mitokondriumot kitüntetett szabadgyök támadási pontnak tekinti.

Másrészről ez az elmélet a szomatikus mutációk teória egyik változatának tekinthető, mivel extranukleáris szomatikus génmutációkról beszél. Az elmélet alapja az, hogy a reaktív szabadgyökök képződésének fő helye a mitokondrium belső membránjának közelében történik, ahová a mitokondriális DNS szintézise is kapcsolódik. A mitokondriális DNS ráadásul nem védett a szabadgyökök mutagén hatásával szemben (ellentétben a nukleáris genommal) mivel nincs "repair" rendszere (Miquel, 1998). Így a szabadgyökök folyamatos károsító hatása miatt a mitokondriális funkció egyre romlik, ami a sejt csökkenő bioenergetikai működése által az élettani funkciók lassabb működését vonja maga után az öregedés során (Lenaz, 1998; Gershon, 1999; Kowald, 1999; Cadenas és Davies, 2000). Az öregedés mitokondriális elméletét többen is kifogásolják, elsősorban azért, mert in vitro eddig nem mutatták ki a mutáns DNS-t tartalmazó mitokondriumok felhalmozódását (De Grey, 2000). Ahlert (1999) is felveti, hogy a szabadgyökös elméletek általában és specifikusan (mitokondrium) nem veszik figyelembe a szervezetben végbemenő igen gyors turnover sebességet, ami a mitokondriumok esetében néhány napos időintervallumtól maximum hetekig terjed (Korr et al., 1998). Ezenkívül nem adnak választ arra sem, hogy miért marad károsodásmentes a stemsejtek mitokondriális rendszere osztódások ezerein át.

A szabadgyökös és az evolúciós elméletek "összekapcsolásának" egy igen érdekes példája szintén Ahlert (1999) felvetése, amelyben ő a fenti elméleteket (szabadgyökök és oxidatív károsodások) evolúciós nézőpontból is kritizálja. Evolúciós szemlélete szerint, az atmoszféra oxigéntartalmához, mint a fajok által elfoglalt *ökológiai nis* (környezeti paraméterek összessége) egyik paraméteréhez a fajok már evolúciósan úgy hozzáidomultak a természetes szelekció során, hogy ez a paraméter nem vehet részt, mint limitáló tényező, sem a fejlődéshez, sem a reprodukcióhoz szükséges élettartam alakulásában. Ha ez nem így lenne, a faj vagy kihalna, vagy evolúciósan hozzáidomulna az adott ökológiai nis-hez (Ahlert, 1995, 1996a, 1996b).

A Hayflick kísérlet ötletéből kiindulva Olovnikov (1971, 1973, 1996) megalkotta *az öregedés telomer-telomeráz elméletét*. Feltételezte, hogy a sejtosztódások véges száma, az ún. "Hayflick-limit", onnan ered, hogy a kromoszómális végek, a telomerek a sejtosztódások során "elhasználódnak".

Az inkomplett DNS szintézis az oka, hogy a szomatikus sejtek minden egyes mitózisa során a kromoszómavég rövidülést szenved (Harley et al., 1994), és ezt a folyamatot úgyis emlegetik a 90-es évek elejétől, mint mitotikus-órát (Allsopp et al, 1992). Az elmélet nem ad viszont magyarázatot arra vonatkozóan, hogy miért öregednek a szervezet már születéskor posztmitotikus sejtjei (ideg-, izomsejtek, etc). Rubin (2002) számos példával él arra nézve, hogy a sejtek in vivo és in vitro mennyire eltérő viselkedést produkálnak, beleértve a sejtosztódások számát is; továbbá arra nézve is, hogy a telomerek hossza és ennek változása mennyire nem általánosítható, az egyes sejtípusokra nézve más és más.

Semsei a multifaktorialitást hangsúlyozza, amikor az öregedési folyamatról beszél, mely többfaktoros jelenség elsősorban a szervezet információs szintjén meghatározott, illetve ott megy végbe. Ez a szint önmagában is változáson megy át az öregedés folyamatával párhuzamosan. Az elméleti maximális élettartamot egy faj adott genetikai apparátusa határozza meg, amelynek lerövidüléséért (aktuális élettartam) belső (génkészlet, etc.) és külső (anyag, energia és információ, etc.) faktorok együtt felelősek, hatásaik összegződnek, melyek tehát az információs szint fenntartásában támogató (optimalizáló) és ezzel ellentétes, tehát az öregedési folyamatot gyorsító hatással bírnak (Semsei, 2000).

3.2 Az öregedés membrán hipotézise

3.2.1 A fiziko-kémiai körülmények szerepe az öregedésben

Az előző fejezetben ismertetett öregedési elméletek alapján nyilvánvaló, hogy a kísérletes gerontológia feladata egy olyan mechanizmus feltárása, amely az öregedés jelenségét minden élő egyedre általános érvénnyel írja le. Logikus abból a közismert tényből kiindulni, hogy minden faj "öregedési mintázata" genetikusan meghatározott. Ez a tény, valamint az, hogy a génexpresszió sebessége az életkorral párhuzamosan csökken, azt sugallja, hogy az öregedés okának feltárását a génexpresszió irányából kell megközeleltíteni. Strehler összefoglalta ennek a megközelítésnek a lehetséges szintjeit (Strehler, 1962, 1977, 1982), miszerint a génexpresszió öregedéssel párhuzamosan csökken.

zamos csökkenése három lehetséges okra vezethető vissza: (1) a genetikai kód elvesztése, (2) a kiolvasórendszer elvesztése (3) valamint a kiolvasó rendszer működési körülményeinek megváltozása.

Az MHA szerint ez a három jelenség természetesen összefügg egymással, de a jelenlegi ismeretek alapján az első két megállapítást, mint az öregedés elsődleges oki tényezőjét, kizárhatjuk a további elmékedések sorából. Ha végiggondoljuk, az első oki tényező nem más, mint az előző témakörben említett genetikai és szomatikus mutációs, valamint hibakatasztrófa elméletek, melyek nem nyertek bizonyítást, és mára csak tudománytörténeti jelentőséggel bírnak. A második oki tényező sem állja meg a helyét, mivel tudjuk, hogy az öreg egyedekben is történik génkifejeződés, a fiatal egyedekkel összevetve nincs minőségi különbség a kétféle funkció között, a tényleges eltérés a génexpresszió sebességében van. Tehát úgy tűnik, hogy a harmadik feltevésben érdemes keresni az öregedés okát, vagyis a szervezetek fiziko-kémiai paraméterei változnak meg oly módon, hogy ezáltal csökkentik a génexpresszió sebességét, hatékonyságát, és ezáltal minden, az életkorral csökkenő funkció háttérében állnak.

Az életfunkciók a következő paraméterek optimalizált tartományában működnek: hőmérséklet, pH, ionerősség és ioneloszlás. Az enzimfehérjék hőszenszítivek, és csak egy igen szűk tartományban működnek, amely viszont a testhőmérséklet szabályozásával az egész élet során biztosított, így ez a paraméter nem járul hozzá az enzimfunkciók életkorral való lassulásához.

Az enzimfunkciók pH függése és annak igen szűk tartományban való optimalizáltsága szintén kísérleti tény, ez a paraméter is igen jól szabályozott, tehát ez sem járulhat hozzá az enzimfunkciók sebességének életkorral való csökkenéséhez.

A szervetlen ionok az élő sejtek esszenciális komponensei, összetételük mennyiségileg és minőségileg is igen jól szabályozott. Elfogadott, hogy a kolloid rendszerek sűrűsége nagyban függ a rendszer pH és ionerősségi értékeitől. Tehát ezek a paraméterek meghatározzák, illetve befolyásolják a kolloid rendszerek kondenzáltsági fokát. Már régről ismert az ún. polielektrolit elmélet (Maurel és Douzou, 1976), mely különös tekintettel a DNS-függő RNS polimerázokra (melyek a génexpresszió kulcsenzimeik) megállapítja, hogy igen érzékenyek az ionerősségre. 300 meq/kg víz koncentráció értékénél

már nagymértékben lecsökken transzkripciós aktivitásuk, 400 meq/kg fölött pedig egyáltalán nem működnek (Jones és Berg, 1966).

Egy sokkal általánosabb interpretációja az ionerősség hatásának a molekuláris enzim kinetika modell (MEKM) (Damjanovich és Somogyi, 1973; Somogyi és Damjanovich, 1975), mely szerint a megnövekedett mikroviszkozitás a sejtben (ami az ionok által okozott megnövekedett molekuláris aggregáció eredménye lehet) egy olyan paraméter, mely az enzimek aktivitásának csökkenését okozza, az enzim-szubsztrát komplex életidejének a megnövelésével.

Fontos volt annak felismerése is, hogy patkányoknál az agyban és a májban az öregedés során az intracelluláris K^+ tartalom jelentős mértékben megemelkedik (Zs.-Nagy et al., 1977; Pieri et al., 1977). Az intracelluláris ionerősség a mitotikus aktivitásra is hatással van, mind a normál, mind a tumorsejtekben. Ezen sejtek eltérő intracelluláris Na^+ tartalmának felismerése sejtette, hogy ez az "ionmintázat változás" egy általános trigger szignál lehet a sejtosztódásban (Cone, 1971).

Tehát az ionerősség szerepének vizsgálata és figyelembevétele a maturációs és öregedési folyamatok során, igen megalapozottnak tűnik. Mivel az intracelluláris monovalens ioneloszlást mindenekelőtt a membránrendszerek alakítják ki, így azok vizsgálata és ismerete elengedhetetlen az experimentális gerontológiai vizsgálatokban (Zs.-Nagy, 1997) A membránokban bekövetkező változások szerepet játszanak az intracelluláris szárazanyag tartalom megnövekedésében az élet során, mely folyamat essenenciális a sejtfejlődési és maturációs folyamatokban, ugyanakkor az öregedési folyamat során ugyanezek a folyamatok a sejt kolloidális rendszere denzitásának növelésével a hanyatló funkciók egyik fő okozójává, limitáló tényezőjévé is válnak.

3.2.2 Az oxigéneredetű szabadgyökök keletkezése és biológiai szerepe

Szabadgyöknek nevezünk minden olyan kémiai ágenszt, amely páratlan számú (spinű) elektront tartalmaz (Pryor, 1976). A szabadgyökök kétféle úton keletkeznek a szervezetben, enzimatis és nenzimatis folyamatok révén. Enzimatis folyamatok például a NADPH-oxidáz által katalizált

reakciók (fagocitózis, B-limfociták), ahol szuperoxid anion ($O_2^{\cdot-}$) gyök termelődik, vagy a xantin-oxidáz és a flavin-oxidázok által katalizált reakciókban is $O_2^{\cdot-}$ gyök jön létre, továbbá a mikroszómális légzési láncban, valamint az aldehid-oxidázok, a különböző dehidrogenázok és a P-450 is képes $O_2^{\cdot-}$ gyök létrehozására. A redukált flavinok, hidrokinonok, redukált ferredoxin és glutation, redukált hemproteinek és katekolaminok autooxidációja során is képződik a $O_2^{\cdot-}$ gyök (Fridovich, 1976; Forman és Boveris, 1982; Halliwell és Gutteridge, 1985; Jamieson et al., 1986; Cadenas, 1989; Ádám, 1996). Nemenzimikus folyamatok során is keletkezhetnek szabadgyökök, mint például a Fe(II)-komplexek és az oxigén reakciója során, a részlegesen redukált O_2 származékok.

A szabadgyökök eliminálása szintén történhet enzimatikus és nemenzimatikus úton. Az elsőre példa a CA, a SOD és a GPx enzimek, valamint más, antioxidáns hatású enzimek, mint a glutation-S-transzferáz, a NADPH-kinon-oxido-reduktáz és a glutation-reduktáz. Nemenzimikus gyökfogók az antioxidáns hatású anyagok, mint a C és E vitaminok, és a redukált glutation, ezenkívül a természetes antioxidánsok közé sorolhatók még a bilirubin, a retinol, az A-vitamin és az ubiquinon, stb, is (Ádám, 1996).

3.2.2.1 A szuperoxid anion gyökök és a szuperoxid-dizmutáz

A szabadgyökök keletkezésének és elbontásának legfontosabb helyszíne és egyben mennyiségileg is a legnagyobb része a mitokondriumhoz kötődik, de a fentiekből kiderül, hogy számos más sejt-komponens is képes létrehozni $O_2^{\cdot-}$ gyököket. Külön ki kell emelni a mitokondriális ubiquinont, amely az e^- transzportlánc tagjaként az elfogyasztott O_2 nagy részét $O_2^{\cdot-}$ gyökké alakítja (Misra és Fridovich, 1972).

A $O_2^{\cdot-}$ gyök redukáló hatású, elektron donor, viszonylag hosszú élettartamú, diffúzióval jelentős távolságba eljuthat keletkezési helyétől. Spontán dizmutációra is hajlamos, amikor is H_2O_2 -dá alakul. Ez a reakció a SOD enzim jelenlétében 10^4 -szer gyorsabb. A SOD különböző sejt-komponensekben megtalálható -mitokondrium, sejt-plazma- és különböző fémionokat tartalmazhat -mint Cu, Zn, Mn, Fe- (Pryor, 1976). Igen nagy hatékonyságú a dizmutációs reakcióban a SOD, tehát igen gyors a $O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2$ átalakulás.

Így a SOD-ot védőenzimnek tartják a $O_2^{\cdot-}$ gyökökkel szemben, felfedezése óta különös "tiszteletnek" örvend (Fridovich, 1976), azt viszont nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a terméke a H_2O_2 . Igen sok tanulmány született a SOD-ról, mint terápiás lehetőségről, az enzimet (valamint a CA-t is) próbálták is alkalmazni néhány betegségben, mely módszert ma viszont igen kritikusan elutasítanak (Greenwald, 1990).

Egyes szerzők véleménye szerint számos ellentmondás van abban, hogy a SOD-ot kizárólag védőenzimként emlegessük. Először is egy terminológiai probléma. Az irodalomban a SOD-ot széles körben antioxidánsnak nevezik, de mivel a redukív $O_2^{\cdot-}$ gyököket eliminálja, szerencsésebb lenne antireduktánsnak hívni (Zs-Nagy, 1994), vagy használják még a gyökfogó elnevezést, ami mindkét típusú gyökelimináló ágensre vonatkoztatható.

3.2.2.2 A hidrogén-peroxid, a kataláz és a glutation-peroxidáz

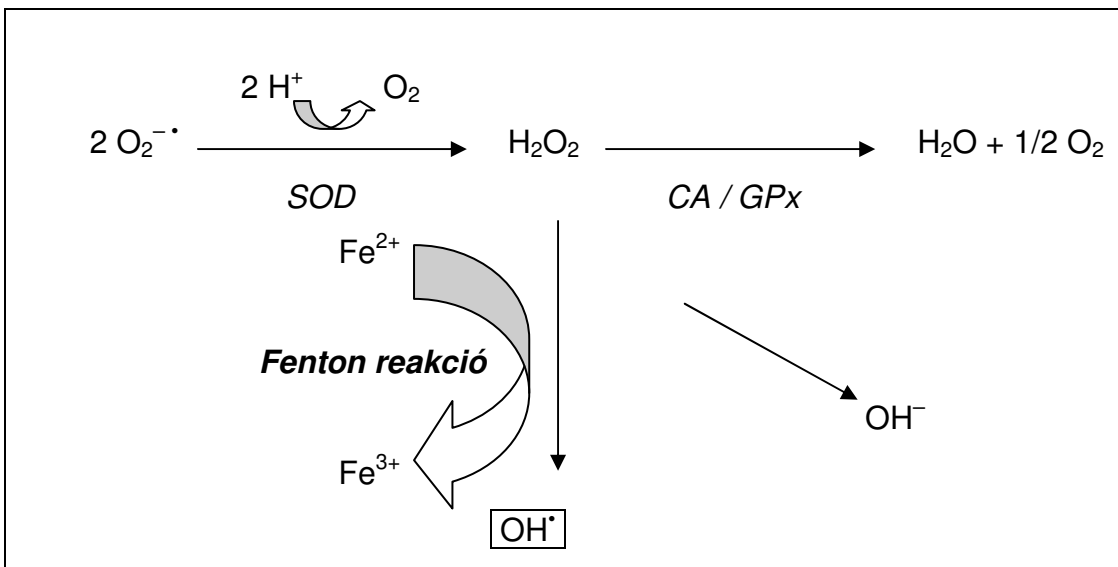
A keletkezett H_2O_2 stabilabb és kevésbé reakcióképes, mint az $O_2^{\cdot-}$, de jelenléte a szövetekben nem elhanyagolható. Kis molekula, apoláros karakterrel, képes arra, hogy átdiffundáljon barrieréken, mint amilyen a sejtmembrán, és így nagy távolságra is képes eljutni a keletkezési helyétől. In vivo csak ritkán lép reakcióba, beleértve a könnyen oxidálható molekulákat is, mint a kéntartalmú aminosavak, amikkel pedig in vitro körülmények között viszonylag könnyen reakcióba lép. A H_2O_2 mégis veszélyes az élő szervezet makromolekuláinak integritására, mivel átmeneti fémionok (Fe^{2+} , Cu^{2+}) jelenlétében ún. heterolízisen esik át, melynek egyik terméke a OH^{\cdot} . Ez a folyamat a Fenton reakció (Fenton, 1894). Két enzim jelenléte a sejtekben megakadályozza a keletkezett H_2O_2 akkumulációját, ezek a CA és a GPx. (1. ábra)

A CA az egyik leggyorsabb ismert enzim, a H_2O_2 -ből az enzim által létrehozott végtermékek (H_2O és O_2) nem károsak az élő szervezetekre. A CA többnyire a peroxisómákban található, de szabad változata is van (pl. a vvt-kben). Egy publikációban összehasonlították különböző szövetek -a máj és az agy- CA aktivitásait. A májban nagyon magas, az agyban pedig nagyon alacsony CA aktivitás mérhető, ami sehogyan sem egyeztethető össze azzal a szintén ismert ténnyel, hogy az elfogyasztott oxigén igen

jelentős hányadát az agy használja el, tehát a gyökfluxus kiemelkedően magas ebben a szövetben. Unit/mg fehérjében kifejezve a máj/agy CA arány 2165/14, azaz 155 körül van (Nagy és Zs-Nagy, 1990). Érdekes megemlíteni, hogy egyes emberekben előfordul genetikusan meghatározott CA hiány a vvt-kben, mely betegséget akatalázémiának nevezünk (Mehlhorn és Cole, 1985). Tudjuk azt is, visszatérve az előző problémához, hogy a CA nem képes eliminálni az összes H_2O_2 -t, mert K_m értéke viszonylag magas (Goldstein, 1968).

A GPx a másik fontos enzim a peroxidok -főként az organikus peroxidok- eliminálásában. Szubsztrátként glutationra van szüksége (Fridovich, 1976), amely anyag számos más anyagcsere út fontos kiindulási anyaga is, így jelenléte sok más folyamat által limitált. A CA-hoz hasonlóképpen a GPx esetében is érdekes a máj/agy arány, 69.5/2.1, azaz 33 körüli, így az agyban, de más szövetekben is a GPx aligha helyettesítheti a hiányzó CA mennyiséget (Nagy és Zs.-Nagy, 1990).

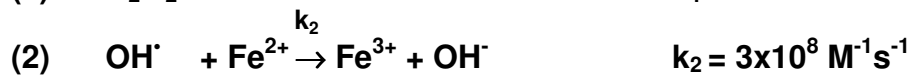
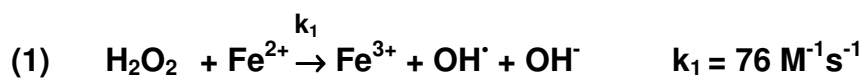
Mindezek után jól megalapozottnak tűnik, hogy a H_2O_2 egy bizonyos koncentrációban folyamatosan jelen van a sejtekben és a szövetekben. Ennek kísérletes bizonyítéka is van. Ismert tény, hogy a kilégzéskor mérhető a H_2O_2 tartalom (Chance et al., 1979). További érdekes kísérleti tény, hogy a szöveti homogenizátumok CA tartalma éppen fordítottan arányos egyes fajok élettartamával (Cutler, 1985c).



1. ábra. A OH^\bullet -szabadgyökök keletkezése *in vivo*

3.2.2.3 A Fenton reakció

A H_2O_2 azon frakciójának további sorsa, melyet sem a CA, sem a GPx nem bontanak el, adja kezünkbe a kulcsot a szabadgyökök tényleges szerepének megértéséhez. A H_2O_2 szabadon diffundál, állandóan jelen van in vivo, és így részt vehet bizonyos reakciókban. A H_2O_2 jelenlétének hatása a közvetlen lipidperoxidáció (Tappel, 1975; Donato és Sohal, 1981), amire a jelen keretek között nem szeretnék kitérni. A számunkra ennél sokkal érdekesebb reakció a H_2O_2 átmeneti fémionokkal (pl. vassal) történő reakciója, a Fenton reakció (Fenton, 1894).



A (2) reakció igen gyorsan játszódik le akkor, ha nincs más reaktív molekula a környezetben, ami viszont igen ritka. Ha bármilyen szerves molekula (RH) jelen van, a következő reakciók is le fognak játszódni (3), (Walling, 1975). Tehát a OH^\cdot bármely szomszéd molekulától el tud rabolni egy elektront extrém nagy sebességgel.



Floyd és Lewis (1983) bizonyították, hogy a Fe^{2+} mindig elegendő mennyiségben rendelkezésre áll a Fenton reakció számára in vivo, továbbá az is kiderült, hogy az így létrejövő OH^\cdot -szabadgyökök nemcsak a lipideket, hanem a fehérjéket és az aminosavakat is megtámadják (Zs-Nagy és Nagy, 1980; Zs-Nagy és Floyd, 1984). Ezenkívül a létrejövő organikus gyökök (R^\cdot) is képesek további reakciókra.

3.2.2.4 A hidroxil szabadgyök

A OH^\cdot igen reakcióképes, így elektron hiánya gyorsan betöltődik valamely szomszédos e^- forrásból, miáltal egyrészt kovalens keresztköteket hoz létre szomszédos molekulák között -vagy akár egy molekulán belül,- s így dimereket, polimereket képez. Semmilyen enzimatis vagy más jellegű

védőrendszer nem definiálható a OH[•]-szabadgyökök polimerizációs hatása ellen, kivéve egyet, ami nem más, mint amit az evolúció nyújt, vagyis a károsodott molekulák gyors, egyre hatékonyabb cseréjét a szervezetben.

3.2.3 Az öregedés membrán hipotézise

Az MHA szerint tehát az életünk során egy folyamatos OH[•] termelődés folyik, a keletkező szabadgyökök (2 tonna mennyiség összesen az élet során) a sejt struktúrájának felépítéséhez (érés és differenciálódás) szükségesek, "jól hasznosíthatók" a fehérjeszintézis primer termékeiben, az ezek között létrejövő kovalens keresztkötések bizonyos mennyiségi szintjének fenntartásával. Az MHA másik lényeges megállapítása, hogy a OH[•]-szabadgyökök polimerizációs képessége és hatása nagyban függ a rendszer anyagsűrűségétől. Minél nagyobb ez a sűrűség, annál nagyobb a molekulák közötti keresztkötések kialakulásának valószínűsége is.

Mindezeket két szempont miatt is érdemes hangsúlyozni. Először is tudjuk, hogy az egyes sejt-komponensek sűrűsége különbözik, a membránok jelentik a sejtben a legkompaktabb struktúrát, így ez a frakció van kitéve leginkább a szabadgyökök hatásának, másrészt az MHA és mások (Shock et al., 1963) is leírják, hogy az öregedéssel párhuzamosan az intracelluláris víztartalom csökken, ebből következik, hogy a szárazanyag tartalom arányosan emelkedik, tehát megfigyelhető a kolloid rendszerek sűrűbbé válása. Így idős korban ugyanannyi, vagy kevesebb szabadgyök termelődése fokozottabb károsító hatást jelent.

Ha elfogadjuk a szabadgyökök szerepét az öregedési folyamatokban, akkor -mint már említettem- figyelembe kell venni azt a tényt, hogy a gyökök agresszivitása és kémiai természete nem változik az életkorral. Ami tehát az élet során folyamatosan és fokozatosan megváltozik, azt a fiziko-kémiai paraméterek között kell keresnünk. Az öregedés nem egy adott időpillanatban kezdődik, hanem a megtermékenyítéskor, és amit tulajdonképpen öregedésnek nevezünk nem más, mint a maturáció "túlfutása". Így a szabadgyökök ugyanazt a szerepet töltik be az életkor bármely szakaszában, tehát ugyanazt a fiatal és az idős szervezetekben. Ennek érvényességét vizsgálva

kezdtek el a szabadgyökök differenciálódást indukáló hatásának vizsgálatát differenciálatlan sejtekből álló sejt kultúrákban.

A Harman által megfogalmazott (Harman, 1956, 1960, 1988) és azóta széles körben elterjedt nézet szerint az oxigéneredetű szabadgyökök az aerob anyagcsere káros melléktermékei, és az öregedés, valamint számos betegség közvetlen okozói. Az ellen, hogy a szabadgyökök biológiai szereppel, és egyáltalán valamilyen szereppel bírjanak, az a biokémikusok egyik fő érve, hogy az élő szervezetekben az aktuális koncentrációjuk nagyon alacsony. Mivel reakciókészségük igen magas, ezért nem akkumulálódhatnak a szövetekben. Feltételezik továbbá a szabadgyökök igen magas turnover sebességét is.

Az 1976-77-ben felállított munkahipotézis két publikációban került ismertetésre (Zs.-Nagy, 1978, 1979), majd 1994-ben könyv formájában (Zs.-Nagy, 1994) is megjelent.

3.2.3.1 Az öregedés membrán hipotézise főbb pontjai

(1) A OH^\bullet -szabadgyökök folyamatos termelődése következtében, valamint az akcióspotenciálok maradék hője miatt károsodott komponenseket folyamatosan újra kell termelniük a sejteknek. A fő támadási pontok a sejtmembránok, mert a gyökök -kémiai természetüknél fogva- a legkondenzáltabb struktúrákban képesek legkönnyebben kifejteni hatásukat. Ezt támasztja alá az a kísérleti tény is, hogy a membránfehérjék életideje a legrövidebb a sejtekben (Tauber és Reutter, 1981). A másik paraméter az akciós potenciálok reziduális hője, melynek körülbelül 10%-a nem vész el a környezetben, hanem a membránokon marad (Ritchie, 1973), és szignifikánsan emeli a membrán helyi hőmérsékletét (Zs.-Nagy, 1979), ami egy folyamatos károsító hatást jelent. A gyökök közvetlen hatásaként kovalens kötések alakulnak ki a membránban, ill. az említett hőmennyiség energiája is kémiai kötések formájában marad ott. Ezek a folyamatosan alakuló kovalens kötések az okai a sejtmembrán gyors turnoverének, azaz rövid életidejének. Fontos hangsúlyozni, hogy a hőhatás jelentősebb szereppel bír az ingerelhető sejtek membránjaiban, így a neuronok és az izom sejtek esetében. A károsodott komponensek akkumulációja

meghatározza a sejtmembrán ún. fiziko-kémiai állapotát (Shinitzky, 1984), melyek legfőbb életkorfüggő jellemzői (kísérleti adatok alapján) például a következők:

- a szinaptoszóma membrán mikroviszkozitása nő (Nagy et al., 1983a, 1983b),
- a nagyobb molekulatömegű membránfehérjék aránya megnő, melyet szintén a szinaptoszómában vizsgáltak, ami a keresztkötések kialakulásával magyarázható (Nagy és Zs.-Nagy, 1984),
- májsejtekben kimutatták, hogy a membránfehérjék laterális diffúziós konstansa az életkorral csökken (D_p) (Zs.-Nagy et al., 1984; 1986a, 1986b, 1989, 1993; Kitani et al., 1988).
- agysejteken is megfigyelték, hogy a membránfehérjék laterális diffúziós konstansa az életkorral párhuzamosan csökken (Zs.-Nagy et al., 1999).

(2) Tehát ezek a változások egy rigidebb membránt eredményeznek, ez pedig befolyással lesz a membrán egyik fő funkciójára, a transzportra, ami magában foglalja a monovalens ionok csökkent transzportját is.

(3) Mindezek további, és egyik fő következménye például az idegsejtekben mért intracelluláris K^+ ion koncentráció növekedése (Zs.-Nagy, 1978, 1979). Ez segít fenntartani a membrán polarizált állapotát, különben eltolódás lenne tapasztalható egy kevésbé polarizált állapot felé. Ezenkívül a Na^+ és a Cl^- tartalom is nő, de a legnagyobb mértékben a kálium.

(4) A megnövekedett intracelluláris monovalens ionerősség miatt a kolloid rendszer kondenzáltsága (aggregációja) fokozódik, amely mintegy pozitív visszacsatolás révén tovább növeli a keresztkötések kialakulásának lehetőségét, mivel egy kondenzáltabb rendszerben megnövekszik a gyökreakciók hatékonysága. A sejt fokozatosan elveszti víztartalmát, hiszen egyidejűleg a kolloid ozmotikus nyomása is csökken (Zs.-Nagy et al., 1987). Ezek kísérletesen is igazoltak, tehát az életkor előre haladtával egy dehidráció következik be a sejtekben (Desbordes és Cohadon, 1987), párhuzamosan a szárazanyag tartalom növekedésével. Nagyon fontos hangsúlyozni, hogy mindezen folyamatok nem egy kitüntetett időpontban kezdődnek, hanem még az embrionális élet során. Egyes funkciók kialakulásához szükséges az, hogy a szárazanyag tartalom növekedjen, ilyenek a

csont- és az izomszövetek kifejlődése például. Tehát egy magas víztartalmú állapot felől halad a maturációs folyamat a fokozatosan dehidráltabb felé, amelynek legutolsó stádiuma az öregedési folyamat.

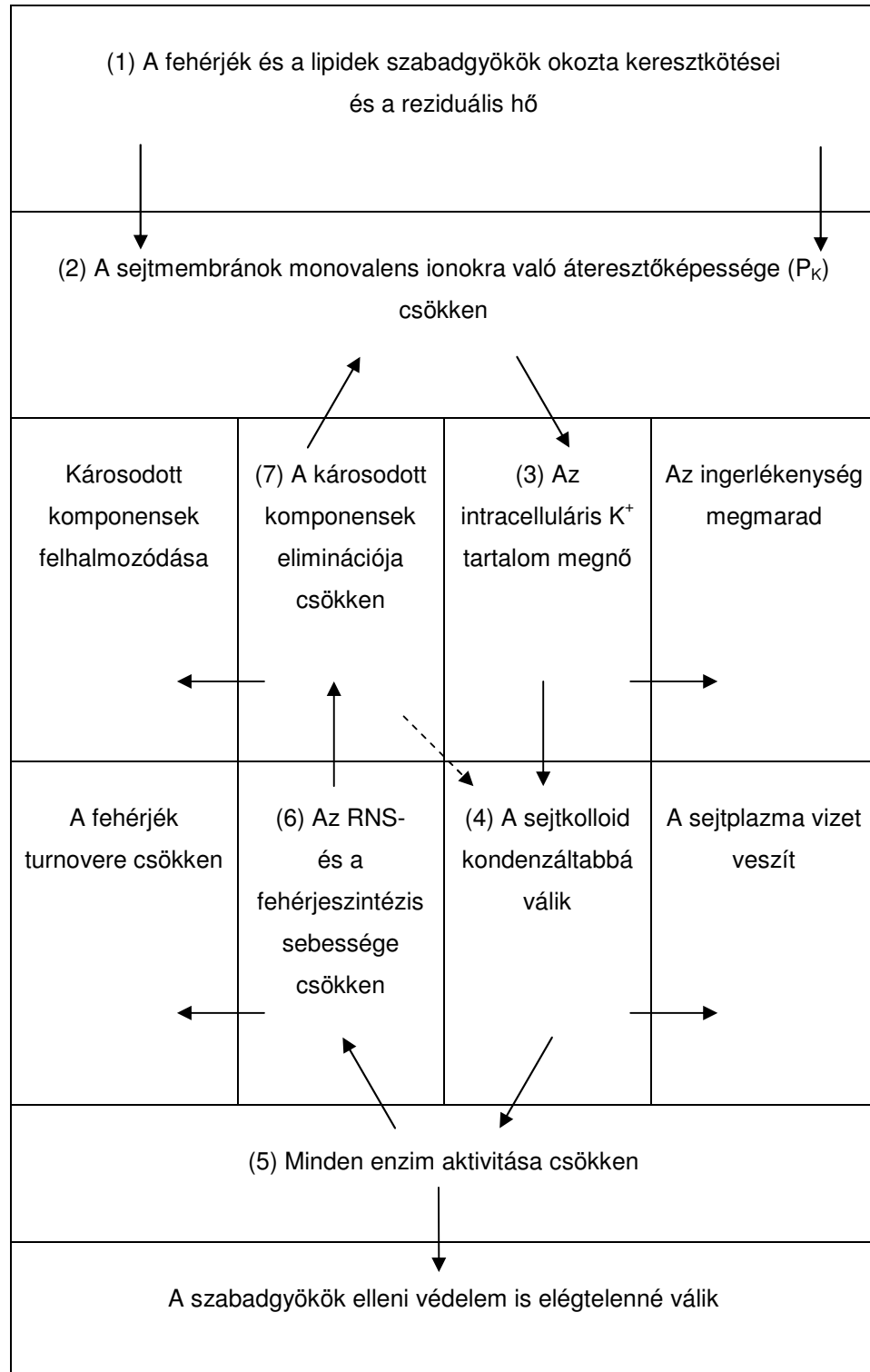
(5) A kolloid rendszerek fizikai sűrűségének növekedése, tehát a kondenzáltabb állapot maga után vonja az enzimek funkcióinak csökkenését, amint azt a már említett molekuláris enzimkinetikai modell is megfogalmazta (Damjanovich és Somogyi, 1973; Somogyi és Damjanovich, 1975). Mivel ez egy általános folyamat, így csökken a gyökök ellen védő enzimrendszer hatékonysága is, valamint a turnover-t biztosító enzimrendszerek aktivitása is, ami szintén hozzájárul a funkciók életkorral való elvesztéséhez.

(6) A kolloid rendszerek megnövekedett denzitása az RNS (Semsei et al., 1982) és fehérje szintézis csökkenését, lassulását is maga után vonja, tehát végső soron a génexpresszió életkorfüggő csökkenése következik be a fiziko-kémiai paraméterek és a környezet fokozatos megváltozásának hatására.

(7) A csökkenő enzimfunkciók további következménye az ún. öregedési pigment felhalmozódása a sejtekben. Amint azt az öregedési elméletek fejezetben már említettem, az MHA szerint a fiatal és idősebb szervezetek sejtjeiben nincs minőségi különbség a lipofuszcinn képződését és eltávolítását illetően. A különbség a folyamat sebességében van a fent említett fiziko-kémiai paraméterek változásának következményeként. (2. ábra)

Összegezve tehát, az élő szervezetekben egy állandó OH^\cdot termelődés folyik. Az OH^\cdot molekula jelenlétét az MHA igen fontosnak tartja a differenciálódási és öregedési folyamatok során. Ez a gyöktermelődés, valamint az akciós potenciálok reziduális hője fokozatosan károsítja a membrán szerkezetét, ezzel egyre rigidebb membránstruktúrát hozva létre. A membrán csökkenő transzportja miatt létrejövő ionösszetétel változás a sejt kolloidális rendszerére igen jelentős hatást gyakorol. Megfigyelhető a szárazanyag fokozatos felhalmozódása, a kolloidális frakció víztartalmának csökkenésével párhuzamosan. A sűrűbbé váló környezetben pedig a szabadgyökök hatása egyre fokozódik. Az MHA másik fontos megállapítása, hogy mindezzel a génexpresszió körülményeinek, a fiziko-kémiai paramétereknek a fokozatos megváltozása zajlik a maturációs folyamat során. Továbbá az is levezethető belőle, hogy a differenciálódási és öregedési folyamat hasonló

oki tényezőkre vezethetők vissza. Az elmélet az öregedést a maturációs folyamat "túlfutásának" tekinti. Az elméletből egyértelműen következik, hogy igen lényeges vizsgálni a szabadgyökök "károsító" hatásai mellett azok fiziológiás, azon belül is a differenciálódást indukáló hatását.



2. ábra: Az MHA főbb pontjai

3.3 Az acetilkolin-észteráz és a gangliozid-szialidáz

3.3.1 Az acetilkolin-észteráz

Az acetilkolin volt az első kémiai anyag, amelynek neurotranszmitter szerepét igazolták. Megtalálható mind a központi, mind a perifériás idegrendszerben. Szintézise a kolinerg neuronok axon terminálisában történik kolinból és acetyl-CoA-ból a kolin-acetyl-transferáz hatására. Inaktiválása úgy történik, hogy a receptorokról disszociáló acetilkolint az AchE enzim elbontja kolinra és acetátra. Az enzim a kolinerg szinapszisokban található és specifikus az acetilkolinra. Az AchE több izoformában és változatos alegység-összetételben fordul elő, azonban minden formában extracellulárisan, a plazmamembránhoz kötődik.

Az enzimet a kolinerg sejtvonalak (Sidell et al., 1984; Coleman és Taylor, 1996), így az SK-N-MC differenciálódási markerének tekintik (Kopitz et al., 1994). Ennél a sejtvonalnál a differenciálódással párhuzamosan az enzim aktivitásának megnövekedését tapasztalták (Kopitz et al., 1994). A bróm-dezoxi-uridinnal (BrdU) differenciált neuroblasztóma sejtvonal (SK-N-MC) AchE szintje például, egyhetes inkubáció során jelentősen megemelkedik (Mühl, 1992, 1996). Ezt a paramétert azért mértük meg a szabadgyökös kezelések hatására, mert kíváncsiak voltunk, hogy egy egyértelműen a differenciált állapotot, annak is a végső stádiumát jelző paraméter, hogyan változik kezeléseink hatására. Ennek megemelkedése bizonyítaná egyértelműen számunkra a szabadgyökök differenciálódást indukáló hatását.

3.3.2 A gangliozidok és a ganglizid-szialidáz

A sejtmembránt felépítő lipidek egyik érdekes csoportját alkotják a glikolipidek. Ide tartoznak a gangliozidok, melyek összetett glikoszfinolipidek. Oligoszacharid részük egy vagy több szialinsav molekulát tartalmaz, melyek száma alapján csoportosítani is szokták ezeket (Muchmore et al., 1989). A gangliozidok a gerincesek és a fejlettebb gerinctelenek fontos membránalkotói, elsősorban a sejtmembrán külső felszínén lokalizálódnak (Hakomori, 1981). Megtalálhatók még a sejtplazmában (Chigorno, 1990) és a

sejtmagmembrán alkotórészeként is (Wu et al., 1995). Koncentrációjukat tekintve a lipideknek csak igen kis részét alkotják, kivétel a központi idegrendszer, ahol a neuronok membránjában a lipidek 10%-át is kiteszik (Ledeen, 1978; Chan, 1987).

Fontos strukturális feladatokat töltenek be, hozzájárulnak a membrán stabilitásának kialakításához (Hakomori, 1981), további funkcióik az extracelluláris mátrix alakítása, a szomszédos sejtek közötti kontaktus létrehozása (Zeller és Marchase, 1992). Sejtfelszíni markerek révén, fontos szerepet töltenek be az immunológiai folyamatokban is (Oshima et al., 1993; Kimata és Yoshida, 1994; Bergelson, 1995). Receptorokat is képeznek, például a kolera toxin B-alegysége specifikus és nagy affinitású a GM1 gangliozidra (Olivera és Spiegel, 1992). De nemcsak az extracelluláris környezetre vannak hatással, hanem számos sejtbeli folyamatot -mint proliferáció, vagy differenciálódás- is befolyásolnak (Igarashi et al., 1989). Ioncsatornák kialakításában is részt vesznek, illetve számos fehérje modulálására is képesek, melyek például a szignáltranszdukciós láncokban vesznek részt, vagy amelyek növekedési hormonok receptorai (Hakomori és Igarashi, 1995).

Az idegrendszer fejlődésében is igen fontos szerepet tulajdonítanak a gangliozidoknak, ahol részt vesznek mind a proliferációs, migrációs, differenciálódási és szignáltranszdukciós folyamatokban (Stojilkovic et al., 1996). Központi szerepűnek a GM1 gangliozidot tartják, amelyet tenyésztett sejtekhez adva azok nyúlványképződését idézte elő (Ledeen, 1989), míg a GM1 szintézis gátlásával a retina neuronjainak differenciálódását tudták gátolni (Quiroga et al., 1990). A GM1 gangliozidról azt is bebizonyították, hogy az NGF hatását potenciózza (Rabin és Mocchetti, 1995).

A differenciálódási folyamatok során leírták a gangliozid szintézis és a gangliozid mintázat változását is (Hakomori, 1981). A sejtciklus során úgyszintén a gangliozid összetétel változásáról számoltak be (Gahmberg és Hakomori, 1973). A transzformált sejtekben -melyek a sűrűségfüggő kontaktgátlást és a növekedés ütemének gátlását is elvesztették- egy egészen más gangliozid mintázat figyelhető meg, mint a normális sejteknél. Így, a gangliozid összetétel és a proliferációs képesség között egy közvetlen összefüggést lehet feltételezni (Hakomori, 1970; Critchley és Macpherson, 1973; Langenbach és Kennedy, 1978). Ugyanakkor azt is meg kell említeni, hogy a

transzformáció foka és a jelenlévő gangliozidok komplexitása között még nem sikerült korrelációt találni (Zeller és Marchase, 1992).

A gangliozidok szerkezete igen érdekes, szintézisük szerinből és palmitoil-CoA-ból indul, a kondenzáció és redukció végeredménye a szfin- ganin molekula (Braun et al., 1970), majd a zsírsav acil-CoA-ból épül be és létrejön egy 4-transz kettős kötés is. Az alkohol komponens nem a glicerín, hanem a szfingozin, amelynél a 2. szénatomon $-NH_2$ csoport található. A legegyszerűbb felépítésű szfingolipid a ceramid, ahol a szfingozid első alkoholos szénatomjához nem kapcsolódik újabb csoport. A gangliozidok pedig a legkomplexebb szfingolipidek, a kapcsolódó szénhidrátok között - melyek tri- és oligoszacharidok- mindig megtalálható a kilenc szénatomos, pH 7.4 -nél negatív töltésű N-acetil-neuraminsav, azaz más néven szialsav. Az elnevezésükben az M (pl. GM3, GM2, GM1) azt jelzi, hogy a molekulában egy (mono) szialsav található, a számokkal pedig a szénhidrát láncokat jelölik.

A gangliozidok komplexitását a GS enzim befolyásolja, a terminális szialsav részek lehasításával. Az emlősök sejtjeiben az enzim különböző lokalizációjú lehet. Patkány izomsejtben kimutatták a lizoszómában, a lizo- szóma membránjában, a citoszólban és a sejtmembránhoz kapcsolódva is (Miyagi et al., 1990). Ezen izoenzimek szubsztrátjukban különböznek, a plazmamembrán-szialidázt specifikus GS-ként azonosították (Miyagi et al., 1993). A citoplazmatikus szialidázzal kimutatták, hogy részt vesz a mioblasz- tok differenciálódásában, aktivitása a differenciálódással párhuzamosan megnő (Sato és Miyagi, 1996). Humán fibroblasztokon megfigyelték, hogy a sejtmembrán szialidáz gátlásakor a sejtek proliferációs képessége extrémén megnő (Usuki et al., 1988). Kimutatták azt is, hogy a szialidáz enzimek expressziója az életkorral változik, így a gangliozidok megfigyelt életkorfüggő mintázatváltozásának alakításában feltehetően részt vesznek (Saito et al., 1995). Tenyésztett kisgyei szemcsesejtben azt tapasztalták, hogy a differenciálódással és a szinapszisok kialakulásával párhuzamosan a GS aktivitás megnő (Pitto et al., 1992).

Az SK-N-MC sejtekben is érdekes megfigyelések történtek a GS enzimre vonatkozóan. Itt kétféle gangliozid-GM3-szialidázt azonosítottak, egyiket a sejtmembránban (ez Triton-X-100 detergenssel specifikusan

aktiválható), és egy lizoszómálisat (melyet glükodeoxikoláttal tudtak stimulálni) (Kopitz et al., 1994). A membránhoz kapcsolódó enzim "szubsztrátja" a szíalsav, amit a gangliozidok terminális végeiről hasít le (Kopitz et al., 1996). Ezen enzim gátlásával a sejtek extrém nagy proliferációs képességűek lesznek, kontaktgátlásukat elvesztik (Kopitz et al., 1997), ezzel együtt a GM3 gangliozidok szintje megemelkedik, míg a GM1 és a laktozilceramid raktár lecsökken. Normális esetben az SK-N-MC sejtekben a spontán differenciálódással és a sejtek egyre nagyobb mértékű érintkezésével párhuzamosan a GS szintje fokozatosan megemelkedik, és a sejtfelszíni gangliozid mintázat is megváltozik, az előbbivel éppen ellentétben a GM3 molekulák szintje csökken, a GM1 raktár a magasabban szialilált gangliozidok lebontásával feltöltődik (Kopitz et al., 1996). Az enzim aktivitásának emelkedése tehát az SK-N-MC sejteknél a differenciáltabb állapothoz kötődik, és -úgy tűnik- igen fontos szereppel bír a sejtproliferációs és sejt differenciálódási folyamatokban.

Arra voltunk kíváncsiak, hogy ez az érzékeny rendszer hogyan reagál egy nemspecifikus, a hatását főként a sejtmembránra kifejtő OH^{\bullet} fluxus jelenlétére. A fenti állítások alapján az enzimet differenciálódási markernek tekintjük a sejtvonalra, de mindemellett arra is kíváncsiak voltunk, hogy a BrdU differenciálószer hatására hogyan változik az enzim aktivitása.

3.4 Közvetlen kísérleti előzmények, kérdésfelvetés

Milyen hatással van in vitro sejtkultúrákra a Fenton reakcióból származó OH^{\bullet} megemelt fluxusa? Az in vitro megemelt OH^{\bullet} fluxus hatását már vizsgálták tenyésztett kondrocita sejtvonalon (Zsupán et al., 1987), ahol a differenciálódás elindult a Fenton reakcióval generált szabadgyökök hatására. Tenyésztett leukémia sejtek két típusán (HL-60 és K-562) szintén történtek hasonló vizsgálatok (Nagy et al., 1993, 1995). Folytattak vizsgálatokat humán fibroblaszt tenyészeteken is (Bazsó-Dombi et al., 2000), ahol szintén sikerült kimutatni a differenciálódás jeleit, hasonló kezelések hatására. Végeztek ilyen jellegű kísérleteket úgy is, hogy nem OH^{\bullet} , hanem $\text{O}_2^{\bullet -}$ gyökök hatását vizsgálták (Naveilhan et al., 1994; Katoh et al., 1997). Valamint szintén hasonló jellegű vizsgálatnak tekinthető a külső oxigén

nyomás hatásainak vizsgálata a differenciálódásra in vitro (Absher et al., 1994; Katoh, 1997). Szívizom sejteken szintén nézték a reaktív oxigén gyökök szerepét a differenciálódás korai fázisában (Sauer et al., 2000). Ezen téma szakirodalma nem túl bőséges még napjainkban, de egyre több publikáció születik arra vonatkozóan, hogy a szabadgyökök szerepet játszanak a differenciálódási folyamatokban, legalábbis annak korai szakaszában illetve elindításában.

Az általánosíthatóság igényéből kiindulva, valamint -mint fentebb már említettem- az idegrendszer ezekben a folyamatokban való kitüntetett szerepe miatt, kiterjesztettük vizsgálatainkat idegrendszeri eredetű sejtvonalakra. Egy humán központi idegrendszeri eredetű sejtvonalon (SK-N-MC) szeretnénk volna bebizonyítani a szabadgyökök differenciálódást indukáló szerepét differenciálódási markerek vizsgálatával. Továbbá kiegészítő vizsgálatként egy másik idegrendszeri eredetű modellen (PC-12) vizsgáltuk a gyököket átalakító és elimináló enzimek indukcióját hasonló kezelések hatására.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Anyagok

4.1.1 Sejtvonalak

4.1.1.1 PC-12 sejtvonal

A PC-12 (ATCC CRL 1721) patkány feokromocitóma sejtvonal igen széles körben alkalmazott modell napjainkban a biokémiai és molekuláris biológiai kutatásban, valamint a sejt differenciálódási folyamatok vizsgálata során. A sejtvonalat 1976-ban izolálta Green és Tischler.

A primer tumor patkány mellékvese velőállományában kialakuló feokromocitóma, ami a nevét onnan kapta, hogy speciális krómsókkal intenzíven festődik. A tumort alkotó sejtek (feokromocita) szimpatikus idegrendszeri eredetűek, a szimpatikus dúctelepekből vándorolnak ki, nem differenciálódnak idegi irányba, hanem adreno-medulloblasztokként korlátlan ideig szaporodóképesek. (Straub, 1977).

A mellékvese velőállománya ektodermális eredetű, fejlődéskor a ganglionlécből differenciálódik. Sokszögű, finoman szemcsézett sejtjei krómsókkal barnára festődő granulumokat tartalmaznak, ezért kromaffin sejteknek is nevezik ezeket. Hisztokémiai módszerekkel kétféle sejt típus különíthető el, az adrenalint termelő fukszinofil és a noradrenalint termelő pikrinofil sejtek. A mellékvese velőállományát szimpatikus preganglionáris kolinerg rostok idegzik be, sejtjei ezért fejlődéstani és funkcionális szempontból analógok a posztganglionáris szimpatikus neuronokkal (Ádám és Fehér, 1990). A feokromocitóma nagy mennyiségben katekolamin hormonokat termel, így a hipertrófia egy jellegzetes tünete a daganat megjelenésének (Berkow, 1994). Ennek megfelelően a PC-12 sejtvonal is noradrenalint és dopamint termel, de adrenalint nem, így aktív tirozin-hidroxiláz, dopamin- β -hidroxiláz (monoamino-oxidáz) és katekol-o-metil-transzferáz enzimszintek mérhetőek a sejtekben. A PC-12 sejtek NGF hatására nyúlványos sejtekké differenciálódnak (Green és Tischler, 1976).

4.1.1.2 SK-N-MC sejt vonal

Az SK-N-MC (ATCC HTB 10) humán neuroblasztóma sejt vonal széles körben alkalmazott modell a neurokémiai kutatásokban. Egy másik vonallal (SK-N-SH) együtt izolálták. Az SK-N-MC megduplázódási ideje rövidebb az SK-N-SH-énál, és alacsonyabb dopa- β -hidroxiláz aktivitással rendelkezik, a sejt vonal kolinerg (Biedler et al., 1973; Seeger et al., 1977; Barnes et al., 1981).

A primer tumor egy 14 éves női beteg supra-orbitális agyterületéről származik. A vonal hisztológiailag neuroblasztóma, morfológiája epitheliális, monolayer sejt kultúrát alkot. Különböző ágensek hatására két irányban differenciálható in vitro (S és N típusú differenciálódás). 50 μ M BrdU hatására egy hét alatt S (Schwannian/substrat adherent) típusú morfológiát mutat, a sejtek nagyobbakká válnak, transzparensabbak lesznek (Mühl, 1992), ezzel párhuzamosan az AchE enzim aktivitása is jelentősen megemelkedik (Mühl, 1992, Kopitz et al., 1994).

4.1.2 Vegyszerek és reagensek

adenozin-5'-difoszfát (ATP) (Sigma)

BrdU (Sigma)

xantin, Na-sója (Sigma)

xantin-oxidáz (Sigma)

SOD (Sigma)

citokró-m-c (Sigma)

borjú szér-um albumin (BSA) (Serva)

kataláz (Sigma)

glutation-reduktáz (Sigma)

glutation, redukált (Sigma)

NADPH (Sigma)

Ethopropazin (Sigma)

Dowex AG 50W X8-200 (Sigma)

Aquasafe 500 Plus, szcintillációs koktél (Zinsser Analytik, Frankfurt)

Ultima Gold, szcintillációs koktél (Packard, Frankfurt)

fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF) (Sigma)
DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia, Freiburg)
DNS, Na-sója (Sigma)
tRNS (Sigma)
Hoechst 33258 (Sigma)
Folin-reagens (Merck)
TiOSO₄-oldat (preparált reagens, Leighton et al., 1968)
dimetil-szulfoxid (DMSO) (Sigma)
tripán-kék oldat (Serva)
tripszin (Gibco)
kollagén, I-es típusú (Sigma)
Minden más felhasznált reagens analitikai tisztaságú és kereskedelmi forgalomban beszerezhető volt.

4.1.3 Radioaktív reagensek

[1-¹⁴C] acetilkolin, 370 MBq/mmol (ICN)
[³H] gangliozid, 6.40 TBq/mmol (jelölése Kopitz et al., 1996. szerint történt)

4.1.4 Tápfolyadékok és alkotórészeik

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Sigma)
Eagle's minimum essential medium (E'MEM) (Sigma/Biochrom)
fetal calf serum (FCS) (Gibco/Boehringer Mannheim)
ViralexTM serum (FCS) (PAA Laboratories, Linz)
horse serum (HS) (Gibco)
L-Glutamin (ICN)
nemesszenciális aminosavak (Serva)
Penicillin-Streptomycin (PS) (ICN/Egyetemi gyógyszertár, Debrecen)
Phosphate Buffered Saline (PBS) (készített)
NaHCO₃ (Sigma)
D(+)-glükóz (Reanal)

4.1.5 Műszerek

Invertmikroszkóp, Invertoskop D (Zeiss, Frankfurt)
Invertmikroszkóp, Mic-1727 (Unitron, Newton Highlands)
Fénymikroszkóp, ZEISS Axiolab (Zeiss, Frankfurt)
Steril fülke, Laminarbox 1446 GV (VEB Elektromat, Drezda)
Steril fülke, Laminarbox BSB 4A (Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim)
CO₂ termosztát, (ASSAB T305GF KEBO Biomed, Spánga, Svédország
/Heraëus Christ, Osterode)
Gázégő, (NeoLab)
Spektrofotométer, HITACHI U-2000 r (Hitachi)
Spektrofotométer, Uvicon 820 (Uvicon)
Spektrofluoriméter, HITACHI F-4500 (Hitachi)
Folyadékszintillációs (LSC) számláló, 1600 TR (Packard, Frankfurt)
Laborcentrifuga, 6000 (Heraëus Christ, Osterode)
Laborcentrifuga, (Janetzki K 23)
Laborcentrifuga, (MLS K 26 D)
Univerzális centrifuga, 1200 (Hettich, Tuttlingen)
Asztali-centrifuga, (Eppendorf)

4.1.6 Eszközök

Mikropipetták (Gilson)
Nichiryio mikropipetták (Nichiryio Co., Ltd., Sotokanda, Japán)
Polietilén szcintillációs flaskák (Packard, Frankfurt)
Fagyasztócsövek (Nunclon)
Sejt-szűrő (Falcon, Becton & Dickinson, Heidelberg)
96-lyukú plate (Falcon)
Sejttenyésztő flaskák és Petri-csészék (Falcon)
Centrifugacsövek (Nunclon)
0.22 µm cellulóz-acetát sterilszűrő (Millipore, Molsheim)

4.2 Módszerek

4.2.1 Tenyésztési módszerek

A PC-12 sejtvonalat DMEM tápfolyadékban, 10% HS és 5% FCS-sel kiegészítve; az SK-N-MC sejtvonalat E'MEM médiumban, 10% FCS-sel kiegészítve, tenyésztettük standard tenyésztési körülmények (37 °C-on, 5% CO₂ és 80% páratartalom) között. Mindkét tápfolyadékhoz utólag tettünk Penicillint, Streptomicint és L-Glutamint, melyek végkoncentrációi a tápfolyadékban 100 IU/ml, 50 µg/ml és 2 mM voltak. Az E'MEM tápfolyadékot nemesszenciális aminosavakkal (1%) is kiegészítettük.

A PC-12 sejtvonalat 0.01%-os kollagén bevonaton növesztettük. A sejtek duplázódási ideje 48-96 óra, ennek megfelelően heti egy-két alkalommal passzáltuk, amikor a sejtek elérték az 50%-os konfluenciát. A sejtek lazán kötődnek a bevonathoz, így lemosásukhoz elegendő volt a tápfolyadék fel-le pipettázása Pasteur-pipettával. A tápfolyadék csere kétnaponként történt.

Az SK-N-MC sejtvonat monolayer kultúrát alkot, a tenyésztőedényhez is erősen kötődik, ezért a sejteket 0.4%-os tripszin segítségével szedtük fel passzáláskor. Mivel a sejtvonat megduplázódási ideje 24-36 óra, 3-5 naponként volt szükség passzálásra. Tápfolyadék cserét háromnaponként végeztünk.

4.2.2. Kezelések

A sejt kultúrák kezelése a Fenton reakcióval történt (Fenton, 1894), in vitro (Fenton kezelések, szabadgyökös kezelések). A kezelések során a már leírt módszert alkalmaztuk, melyet Floyd és munkatársai fejlesztettek ki (Floyd és Lewis, 1983; Floyd és Zs.-Nagy, 1984; Zs.-Nagy és Floyd, 1984), amely szerint a Fe²⁺-ADP komplex és H₂O₂ hozzáadása a sejt kultúrákhoz egyidejűleg történik. Más szerzők is sikerrel alkalmazták ezt a módszert (Gutteridge et al., 1990; Nagy, et al., 1993; Nagy, et al., 1995). Az ADP, a vas-szulfát/vas-ammónium-szulfát és a H₂O₂ törzsoldatokat bidesztillált vízben, mindig frissen készítettük el. Az ADP és vas-szulfát törzsoldatokból

azonos mennyiségeket elegyítve készítettük el a Fe^{2+} -ADP komplexet. Használat előtt sterilen szűrtük le az oldatokat. Az ADP végkoncentrációja mindig 20-szorosa volt a vasénak, ezzel az aránnyal biztosítottuk, hogy a vas autooxidációja ne következzen be. A végkoncentrációk az eredmények leírásánál és az összefoglaló táblázatokban szerepelnek. A tenyésztőedényben a vas legmagasabb koncentrációja $100\ \mu\text{M}$ volt mindkét sejttípusnál, a H_2O_2 legmagasabb koncentrációja pedig $25\ \mu\text{M}$ volt a PC-12 sejteknél és $10\ \mu\text{M}$ az SK-N-MC sejtek esetében.

Az SK-N-MC sejteknél párhuzamosan BrdU-val való kezelés is történt, ami jól ismert differenciálószer a sejtvonalnak. A törzsoldat készítésekor $5\ \text{mM}$ koncentrációban feloldottuk a BrdU-t a tenyésztő médiumban, majd a fel nem használt mennyiséget kis adagokban, -20°C -on lefagyasztva tároltuk. A BrdU végkoncentrációja $50\ \mu\text{M}$ volt a sejtkultúrákon, mely mennyiség a sejtek teljes differenciálódását okozta 6 nap elteltével (Mühl, 1992, 1996).

Mindezekkel párhuzamosan tenyésztettünk, ill. mértünk kontroll sejteket, melyeken nem alkalmaztunk kezeléseket. A PC-12 sejtvonalon két- naponként, az SK-N-MC sejtvonalon pedig háromnaponként cseréltünk tápfolyadékot, és ekkor ismételtük a kezeléseket. Így a PC-12 sejteket 1×48 és 2×48 órás, az SK-N-MC sejteket pedig 1×72 és 2×72 órás inkubációs időtartamokban kezeltük.

4.2.3 Sejtszám meghatározás

A sejtszámokat kétféle úton, direkt és indirekt módszerrel határoztuk meg. A direkt sejtszámlálást Bürker-kamrában végeztük. Az indirekt meghatározás a Promega (Cell Titer 96TM) nemradioaktív sejtproliferációs teszt segítségével vált lehetővé. A sejteket 4 órán át inkubáltuk egy metil-tetrazólium só-tartalmazó festékoldattal. Az élő sejtek a mitokondriumban átalakították ezt formazánná, ami kék színű (Mosmann, 1983). A reakció leállítását egy szolubilizáló oldat hozzáadása segítségével történt, majd megmértük az abszorbanciákat $570\ \text{nm}$ -en ELISA fotométerrel. Az abszorbancia adatok arányosak a sejtszámokkal.

4.2.4 Életképesség vizsgálat

100 µl PBS-hez 30-50 µl tripán-kék oldatot adtunk, majd ezt összekevertük 50 µl sejtszuszpenzióval. Az elpusztult sejtek membránja átjárható erre az anyagra nézve, így azok felvették a festéket és kékre színeződtek. Néhány percen belül megszámloltuk a teljes sejtszámot és a kékre festődött sejteket, s az elpusztult sejteket a teljes sejtszám százalékában adtuk meg.

4.2.5 Fénymikroszkópos vizsgálatok és fotózás az SK-N-MC sejteknél

Az SK-N-MC sejtvonal monolayer kultúrát alkot, a tenyésztőedényhez erősen kötődik. A tápfolyadék leszívása után a sejteket PBS-sel megmostuk és 10%-os formalinnal fixáltuk. A tenyésztőedény felső részének eltávolítása után a fixált sejteket tartalmazó alsó részt tárgylemezként használtuk. Hemalaun-eosin-nal festettük a sejteket (a nagymértékben transzparens sejtek így kontrasztosabbá váltak), majd glicerín-zselatinnal lefedtük, ezt követően néhány órán belül lefotóztuk. A fotózás Zeiss Axiolab mikroszkópon történt.

4.2.6 Szolubilizálás (SOD, CA és GPx enzimekhez)

Az enzim mérések megkezdése előtt, a sejteket egy szolubilizáló oldattal tártuk fel. A szolubilizáló oldat 50 mM-os Tris-HCl pufferben (pH=7.5) tartalmazott 0.3% Triton-X-100-at, 0.2 mM PMSF-et és 0.5% cetil-trimetilammónium-bromidot. Az ideális sejtkoncentráció 1×10^7 sejt/1 ml szolubilizáló oldat volt (Kasugai és Yamada, 1992). A feltárás úgy történt, hogy a tenyésztőedény aljáról lemosott sejteket lecentrifugáltuk, majd 10 ml PBS-sel átmostuk. Újbóli mosás után meghatároztuk a sejtszámokat. Innen is lecentrifugáltuk a sejteket, és végül a fenti koncentrációnak megfelelően felvettük a szolubilizáló oldatban. Fagyasztás-felolvasztás következett négyszer (folyékony nitrogénnel). A mintákat egy órán át 4°C-on rázattuk a tökéletesebb feltárás érdekében. A sejthomogenizátumokat végül 13000 x g-n 10 percig centrifugáltuk (szintén 4°C-on), majd az így kapott felülúszót használtuk a fehérje, a SOD, a CA valamint a GPx enzimek mérésére.

4.2.7 Szuperoxid-dizmutáz aktivitás meghatározás (Flohé és Ötting, 1984)

A mérés elve

A SOD enzim a $O_2^{\cdot-}$ gyököket dizmutálja H_2O_2 -dá. Rendszerünkben a xantin/xantin-oxidáz reakcióval hoztuk létre a $O_2^{\cdot-}$ gyököket, melyek redukálták a reakcióelegyhez adott citokróm-c molekulákat. A citokróm-c redukciója színváltozással jár, amit 550 nm hullámhosszon spektrofotometriásan követhetünk. A xantin-oxidáz enzim mennyiségét úgy kell kiválasztani, hogy a citokróm-c redukciójának sebessége 0,025 abszorbanciaegység/perc legyen a mintát vagy SOD standardot nem tartalmazó alapreakcióban. A minták SOD tartalma eliminálja a $O_2^{\cdot-}$ anionok több-kevesebb részét, így az alapreakcióhoz képest csökken a citokróm-c redukció sebessége. A standardizálás során ismert mennyiségű SOD-ot tartalmazó mintákban mértük meg a percenkénti abszorbancia csökkenéseket, s ebből következtetni tudunk a minták SOD tartalmára.

A méréshez szükséges oldatok

50 mM foszfát-puffer, pH=7.8 (0.1 mM EDTA-val)

≈0.2 unit/ml xantin-oxidáz (0.1 mM EDTA-ban), B-oldat

1 M xantin-oldat (0.001 M NaOH-oldatban), és 20 μM citokróm-c (foszfát-pufferben) 1:10 arányban elegyítve, A-oldat

300 μM KCN- oldat

A mérés menete

Alapreakció-elegy:	Minta-elegy:
<ul style="list-style-type: none">• 1400 μl A-oldat• 10 μl KCN• 25 μl puffer• ≈ 15 μl B-oldat	<ul style="list-style-type: none">• 1400 μl A-oldat• 10 μl KCN• 25 μl felülúszó (minta)• ≈ 15 μl B-oldat

Standardgörbe

Ismert mennyiségű SOD-ot tartalmazó mintákban mértük a $\Delta A/\text{min}$ értékeket. Az $1/\Delta A$ –SOD koncentráció görbe megszerkesztése után, kiszámoltuk a $tg\alpha$ értékét. A standard görbét 0–300 ng SOD tartományban vettük fel.

A kiértékelés menete

$\Delta A_0=0.025$, alapreakció abszorbancia változása/min

ΔA = a minta abszorbancia változása/min

$1/\Delta A_0=1/0.025=40$

$1/\Delta A-1/\Delta A_0=x$

$x/tg\alpha \rightarrow \text{ng SOD} / 25 \mu\text{l felülűszó}$

A SOD értékeket a párhuzamosan mért fehérje tartalmak alapján, mg fehérjére vonatkoztattuk.

4.2.8 Kataláz aktivitás meghatározás (Gaunt és De Duve, 1976)

A mérés elve

A CA a H_2O_2 -ot bontja vízzé és oxigénné. Mintáinkat ismert mennyiségű H_2O_2 -dal 30 percig inkubálva, a visszamaradó H_2O_2 mennyiségéből következtethetünk annak CA tartalmára. A visszamaradó H_2O_2 -ot TiOSO_4 -tal reagáltatva, a keletkező sárga színű titánium-peroxisulfátot kolorimetriásan határoztuk meg (405 nm-en). A mintákhoz adott teljes H_2O_2 mennyiséget is megmértük (totál). A standardizálás során ismert aktivitású CA enzimet tartalmazó mintákban mértük az abszorbancia értékeket.

A méréshez szükséges oldatok

Inkubáló-oldat: 0.5 mg/ml BSA, 10 mM imidazol

0.1% Triton-X-100, 0.06% H_2O_2

TiOSO_4 -oldat, használat előtt 1:1 arányban hígítjuk bidesztillált vízzel

A mérés menete (A=abszorbancia)

Vak: 100 µl minta (felülúszó), 100 µl bidesztillált víz (bdv), 2 ml TiOSO₄ → A_v

Totál H₂O₂: 100 µl bdv, 100 µl inkubáló-oldat, 2 ml TiOSO₄ → A₀, a kiindulási H₂O₂ koncentrációnak megfelelő abszorbancia érték

Minta: 100 µl minta (felülúszó), 100 µl inkubáló-oldat, 2 ml TiOSO₄ → A₃₀, ez a 30 percig H₂O₂ dal inkubált minták abszorbanciája

Standardgörbe

Az ismert mennyiségű CA-t tartalmazó minták abszorbancia értékeit megmérve, felállítottunk egy standard görbét, melynek tgα értékével határoztuk meg a minták enzimtartalmát. A standard görbét 0-50 unit CA tartományban vettük fel.

A kiértékelés menete

$$\lg [A_0 / (A_{30}-A_v)] = x$$

x/tgα → unit CA/100 µl minta (felülúszó)

A CA értékeket a párhuzamosan mért fehérje tartalmak alapján, mg fehérjére vonatkoztattuk.

4.2.9 Glutation-peroxidáz aktivitás meghatározás

(Flohé és Günzler, 1984)

A mérés elve

A GPx enzim a lipid peroxidokat bontja, miközben a redukált glutation (GSH) oxidálódik (GSSG). A képződött GSSG-t a feleslegben alkalmazott glutation reduktáz (GR) alakítja vissza GSH-vá, s a reakcióhoz NADPH-t használ H⁺ forrásként. Ez a NADPH fogyás követhető nyomon spektrofotométerrel 340 nm-en, mint abszorbancia csökkenés. A reakcióelegyhez ismert mennyiségű GSH-t, GR-t, NADPH-t és H₂O₂-t adva, a NADPH fogyás alapján következtetni tudunk a minta GPx tartalmára.

A meghatározás a következő lépésekből áll (3):

1. Előinkubálás /37°C, 10 perc/ (minta, GSH, GR-fölöslegben)

Ezen folyamat során a minta NADPH tartalma teljesen lebomlik, így a későbbiekben biztosan a hozzáadott NADPH fogyást mérjük.

2. H₂O₂-tól független NADPH fogyás /37°C, 3 perc/ (NADPH hozzáadásával)

Ekkor a H₂O₂-tól független NADPH fogyást mérjük. A fenti teljes ciklus működik, amíg a minták szerves és szervetlen peroxid tartalma el nem fogy. Ez alatt a NADPH fogyás igen kis mértékű.

3. Teljes reakció /37°C, 5 perc/ (H₂O₂ hozzáadásával)

A fenti teljes ciklus működik, és a mért időintervallumon belül a NADPH fogyás lineáris. A GPx függő reakció sebességét úgy kapjuk meg, ha a teljes reakciósebességből kivonjuk a H₂O₂-tól független és a nemenzimatis reakciósebességeket. Előbb említettem, hogy a H₂O₂-tól független NADPH fogyás nem jelentős mértékű, (de ennek ellenére nem hanyagoltuk el), míg a nemenzimatis, vagy más néven alapreakció sebességét úgy határoztuk meg, hogy a reakcióelegyben az enzim mintát pufferrel helyettesítettük. Irodalmi adatok szerint az alapreakció ΔA értéke 0.028 és 0.036 közé esik. Az alapreakcióra 0.033-0.034 abszorbancia csökkenést tapasztaltunk, mely értéket a kísérletek megismérlése során következetesen visszakaptunk. Az enzimértéket közvetetten, adott idő alatti NADPH fogyásként adtuk meg, ill. mg fehérjére vonatkoztattuk.

A méréshez szükséges oldatok

0.1 M K₂HPO₄ puffer (pH= 7.0) 1 mM EDTA-ban

0.1%-os NaHCO₃ bidesztillált vízben

2.41 U /ml GR 0.1 M K₂PO₄ pufferben, jégen tartva

10 mM GSH bidesztillált vízben

1.5 mM NADPH 0.1%-os NaHCO₃ -oldatban

1.5 mM H₂O₂ oldat bidesztillált vízben, 37°C-ra előmelegítve

A mérés menete

Az alapreakcióhoz összeállított reakcióelegy:

450 µl foszfát-puffer, 100 µl puffer, 100 µl GR és 150 µl GSH

→ előinkubálás: 10 perc 37°C-on.

Majd ehhez adva 100 µl NADPH-t,

→ H₂O₂ –től független reakció: 3 perc 37°C-on, 340 nm-en követve.

Majd ehhez adva 100 µl H₂O₂-ot,

→ teljes reakció: 5 perc 37°C-on, 340 nm-en követve.

A minták méréséhez összeállított reakcióelegy:

Ugyanaz, mint az előző, azzal a különbséggel, hogy a 100 µl puffer helyett

100 µl mintát (felülúszót) tettünk.

A kiértékelés menete

C = µmol NADPH fogyás/min

$C = (\Delta A \times V) / (\epsilon \times v \times d)$, ahol:

ΔA = abszorbancia csökkenés 340 nm-en

V = a reakcióelegy térfogata (1000 µl)

ϵ = a NADPH moláris extinkciós koefficiense (6220 M⁻¹ cm⁻¹)

v = a minta (felülúszó) térfogata (100 µl)

d = a küvetta átmérője (1 cm)

A GPx értékeket a párhuzamosan mért fehérje tartalmak alapján, mg fehérjére vonatkoztattuk.

4.2.10 Acetilcolin-észteráz aktivitás meghatározás (Blume et al., 1970)

A mérés elve

Az AchE enzim specifikus az acetilkolinra, azt acetátra és kolinra bontja. Aktivitását mintáinkban úgy határoztuk meg, hogy ¹⁴C-izotóppal jelzett acetilkolinnal inkubáltuk a sejthomogenizátumokat, ahol ¹⁴C-izotóppal jelzett acetát vált szabaddá az enzim hatására, mely negatív töltésű. A továbbiakban ioncserélő kromatográfiás eljárással elválasztottuk a keletkezett acetátot a szubsztráttól, és radioaktivitását LSC számlálóban mértük.

A méréshez szükséges oldatok

25 mM nátrium-foszfát homogenizáló puffer, pH=7.4, tartalmaz:

- 0.3% Triton-X-100-at
- 0.125 mM ethopropazin-t (törzsoldatból hígítva)

6.125 mM ethopropazin törzsoldat

[1-¹⁴C] acetilkolin: specifikus aktivitása 370 MBq/mmol, 10 mCi/mmol, eredetileg 0.05 mCi, 1.85 MBq volt 0.5 ml etanolban feloldva, az etanolt elgőzöltük, és 770 µl bideszt. vízben vettük fel, így a koncentrációja 6.5 mM lett

100 mM PMSF törzsoldat, metanolban: -20°C-on kis adagokban tároltuk, használat előtt 100 X-ra hígítottuk jéghideg metanollal.

Dowex AG csövek: 100 g-ot 200 ml bideszt. vízben feloldottunk, NaOH-dal addig mostuk, míg a pH-ja 9 föléi érték lett, majd bideszt. vízzel addig mostuk, míg a pH beállt 7 körüli értékre, 0.05% NaN₃ -ot adtunk hozzá, hűtőben tároltuk.

2%-os nátrium-azid

Aquasafe 500 Plus szcintillációs koktél

A mérés menete

A sejtek feltárása. A sejteket feltripszineztek, és 2x10 ml, majd végül 1 ml fiziológias sóoldatban átmostuk. Ezután a mintákat 1 ml homogenizáló pufferben vettük fel, 10x5 másodpercig pottereztek, majd 2x30 másodpercig szonikáltak. A sejthomogenizátumokat AchE, fehérje és DNS mérésekre osztottuk el.

AchE mérés. 20 µl homogenizátumot és 5 µl [1-¹⁴C] acetilkolint 30 percig inkubáltak 30°C-os vízfürdőben. A reakciót 1 ml 1mM-os, jéghideg PMSF oldat hozzáadásával állítottuk le. Közben kis méretű csövekre 1 ml Dowex AG-t vittünk fel, és 3x1 ml bidesztillált vízzel átmostuk. Az átmosott géltre ezután felvittük a mintákat, ahonnan az acetátot 3 ml bidesztillált vízzel lemostuk, műanyag flaskákban felfogtuk, és 10 ml szcintillációs koktél hozzáadása után, megmértük a beütésszámot (dpm). A vak „mintában” a sejthomogenizátumot bidesztillált víz helyettesítette.

A kiértékelés menete

$$\frac{[(\text{dpm}_{\text{homogenizátum}} - \text{dpm}_{\text{vak}}) / (22,2[\text{dpm}/\text{pmol}]) \times 30 \text{ min}]}{\text{pmol AchE átalakulás}/\text{min}/\text{ml}} =$$

= $\mu\text{U AchE}/\text{ml}$ felülúszó

A mért enzim értékeket mg fehérje és μg DNS tartalomra vonatkoztattuk.

4.2.11 Gangliozid-szialidáz aktivitás meghatározás (Lieser et al., 1989)

A mérés elve

Az GS enzim egyik típusa, a Triton-X-100-zal aktiválható, plazmamembrán szialidáz, a plazmamembránban lévő komplex gangliozidokat (GM3) bontja úgy, hogy a terminális szialsavakat lehasítja. Aktivitását mintáinkban úgy határoztuk meg, hogy ^3H -GM3-at, izotóppal jelzett szubsztrátot inkubáltunk a sejthomogenizátummal, melyből az enzim ^3H -laktozilceramidot tett szabaddá. A továbbiakban ioncserélő kromatográfiás eljárással elválasztottuk a keletkezett ^3H -laktozilceramidot a szubsztráttól, és radioaktivitását LSC számlálóban mértük.

A méréshez szükséges oldatok

170 mM Na-acetát homogenizálópuffer, pH=4.5, tartalmaz:

- 0.07% (w/v) Triton-X-100-at

1 mM ^3H -GM3, metanolban

A mérés menete

A sejtek feltárása. A sejteket feltripszineztek, és 2x10 ml, majd végül 1 ml fiziológiás sóoldatban átmostuk. Ezután a mintákat 1 ml homogenizáló pufferben vettük fel, és 10x5 másodpercig pottereztük. A sejthomogenizátumokat GS és fehérje mérésre osztottuk el.

GS mérés. 1 μl ^3H -GM3 oldatról lepároltuk a metanolt, és 30 μl reakciópufferben vettük fel. Intenzív rázással és ultrahangfürdőben való kezeléssel feloldottuk, majd 20 μl sejthomogenizátummal 60 percig inkubáltuk, 37°C-on. A vak „mintákban” a sejthomogenizátumot bidesztillált víz helyettesítette. A reakciót 1 ml jéghideg metanol hozzáadásával állítottuk le, és a mintákat jégre állítottuk. Közben kis méretű csövekre 1 ml DEAE-

Sepharose-t vittünk fel, metanollal átmostuk és felvittük rá a mintákat. A nem hidrolizált GM3 a pozitív töltésű gélhez kötődik, míg a termék, a laktozil-ceramid a metanollal kimosható. Ezt a frakciót (A-frakció) fogtuk fel szcintillációs flaskákba. Na-acetát pufferrel a nemhidrolizált részt is eluáltuk (B-frakció). 10 ml szcintillációs koktél hozzáadása után, mindkét frakcióban megmértük a beütésszámot (dpm).

A kiértékelés menete

$$\text{dpm}_A + \text{dpm}_B = \text{dpm}_{\text{összes}}$$

$$(\text{dpm}_A \times 100) / \text{dpm}_{\text{összes}} = A\%$$

$$A\% - \text{Vak}\% = X\%$$

$$(X\% \times 300 \text{ pmol}) / (120 \text{ min} \times [\text{fehérje mg/ml}]) = \mu\text{U szialidáz} / \text{mg fehérje}$$

4.2.12 Fehérje és DNS mérések

4.2.12.1 Fehérje mérés

A mérés elve

A kimutatás alapja a Folin-reakció. A tirozint és triptofánt tartalmazó fehérjék (valamint a szabad tirozin és triptofán) a foszfor-volfrámsav és foszfor-molibdénsav foszforsavas vizes oldatával kék színeződést adnak. Ezen az elven alapszik az alkalmazott Lowry-féle módszer (Lowry et al., 1951). Ennek lényege, hogy a fehérjék először rezet tartalmazó alkalikus oldatba kerülnek, melyben Cu^{2+} -fehérje komplexek jönnek létre, majd ez a komplex redukálja a Folin-reagenst.

A méréshez szükséges oldatok

43 mM CuSO_4 oldat, 1:49 arányban hígítani kell frissen a pufferrel

Folin-reagens, frissen hígítani kell 1:6 arányban bidesztillált vízzel

1 mg/ml-es BSA törzsoldat, a standardgörbéhez, fagyasztva, szétporciózva tárolható

A mérés menete

Standardsor. 2.5-50 µg fehérje mennyiségeknek megfelelően Eppendorf-csövekbe pipettáztuk a BSA törzsoldatot, majd 50 µl-re egészítettük ki bidesztillált vízzel. A vak fehérje helyett 50 µl bidesztillált vizet tartalmazott.

Minták. 10 µl felülúszó- ill. sejthomogenizátumhoz 40 µl bdv-et adtunk.

A fehérje mintákhoz hozzámértünk 500 µl frissen hígított CuSO₄ oldatot, majd 20 perces szobahőmérsékleten történő inkubálás után hozzáadtuk az 500 µl frissen hígított Folin-reagenst, s ezzel 30 percig inkubáltuk. Az extinkciókat 630 nm-en mértük.

A kiértékelés menete

A standardgörbe adatait a Microcal Origin programmal dolgoztuk fel, egyenest illesztettünk rá (lineáris regresszió), majd a kapott egyenes egyenletével számoltuk ki a minták fehérje tartalmát.

4.2.12.2 DNS mérés/1 (West et al., 1985; Teixeira et al., 1995)

A mérés elve

A Triton-X-100-zal kezelt sejthomogenizátum DNS tartalmát fluoreszcenciás szerrel határoztuk meg (Hoechst 33258). A triton okozta háttér fluoreszcencia kiküszöbölése érdekében a DNS-t alkohollal kicsaptuk, majd EDTA-ban visszaoldottuk. Így a módszer érzékenysége nagyobb lett, és $1\cdot 10^5$ sejtet is jól tudunk mérni. Tehát a módszer rendkívül pontos, érzékeny és kis DNS mennyiségek kimutatására is használható.

A méréshez szükséges oldatok

10 mM EDTA, pH= 12.3

3 M Na-acetát-oldat, pH= 5.2

10 mM Tris-100 mM NaCl, pH= 7.0

1 mg/ml Hoechst 33258 törzsoldat, ezt továbbhígítva:

200 ng/ml munkaoldat a mintákhoz

2000 ng/ml munkaoldat a standardsorhoz

1 M NH₄OH oldat

PBS, pH= 7.2-7.4
1 M KH_2PO_4 -oldat
1 mg/ml DNS törzsoldat
2% Triton X-100
200 $\mu\text{g/ml}$ tRNS-oldat
96%-os etanol

A mérés menete

Szolubilizálás. Ca és Mg mentes PBS-sel mostuk át a sejteket, majd 300 μl 2%-os Triton X-100 oldatot mértünk rá (10^4 - 10^5 sejtszámhoz) és 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően azonnal mértük, vagy -20°C -on tároltuk a mintákat.

DNS mérés. 75-300 μl Tritonos extraktumhoz fele térfogatú 3 M-os Na-acetátot adtunk, 20 μg tRNS-t és az elegy térfogatát 1.5 ml-re egészítettük ki etanollal. A DNS kicsapása 30 percig történt (ha kevés a DNS, 12 óra) -70°C -on. Ezután lecentrifugáltuk (12000g, 10 perc) és a felülúszó eltávolítása után megszáritottuk a mintákat. (A kicsapott DNS -20°C -on szintén eltárolható.) Az üledéket 700 μl 10 mM-os EDTA-ban oldottuk fel és kb. 50 μl KH_2PO_4 oldattal semlegesítettük. A mintákat egyenlő térfogatú festékkel kezeltük (750 μl), így 1.5 ml végtérfogatot kaptunk. A festék koncentrációja a mintában 100 ng/ml. A mintákat spektrofluoriméterrel mértük meg, extinkció: 365nm, emisszió: 460 nm, rés: 10 nm.

Standardgörbe

50-1000 ng közötti mennyiségeket mértünk ki a DNS törzsoldatból, a festék koncentrációja a standardsorban is 100 ng/ml volt.

A kiértékelés menete

A standardgörbe adatait a Microcal Origin programmal dolgoztuk fel, egyenest illesztettünk rá (lineáris regresszió), majd a kapott egyenes egyenletével kiszámoltuk a minták DNS tartalmát.

4.2.12.3 DNS mérés/2 (Bashford és Harris, 1987)

A mérés elve

Triton-X-100-at tartalmazó Na-foszfát pufferben, potterezéssel és szonikálással (mint az AchE mérésnél) sejthomogenizátumot készítettünk, melyet azonos térfogatú, 100 mM-os NaCl oldattal elegyítettünk. A DNS-t kicsapás nélkül, Hoechst 33258 fluoreszcens festék hozzáadásával, rövid inkubációs idő után mértük. Ez a mérés rendkívül gyors és egyszerű technika.

A méréshez szükséges oldatok

50 mM Na-foszfát puffer (2 mM EDTA-val és 2M NaCl-dal), pH= 7.4

100 mM NaCl-oldat

200 µg/ml festék (Hoechst 33258) törzsoldat

200 µg/ml DNS törzsoldat

A mérés menete

Szolubilizálás. Az AchE méréséhez végzett feltárás során keletkező sejthomogenizátumokat használtuk DNS mérésre.

DNS mérés. 50 µl homogenizátumot azonos térfogatú NaCl-oldattal elegyítettünk, ehhez 2.4 ml festékoldatot adtunk, majd 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat.

Standardizálás. A megfelelő DNS koncentrációkat tartalmazó mintákat 100 µl-re egészítettünk ki NaCl-oldattal. A továbbiakban ugyanúgy jártunk el, mint a mérendő minták esetében. A mintákat spektrofluoriméterrel mértük meg, 355 nm extinkciós és 460 nm emissziós értékeknél, rés: 10 nm.

Standardgörbe

0.1 és 10 µg között vettük fel a DNS standard görbét.

A kiértékelés menete

A standardgörbe adatait a Microcal Origin programmal dolgoztuk fel, egyenest illesztettünk rá, majd a kapott egyenes egyenletével számoltuk ki a minták DNS tartalmát.

4.2.13 Statisztikai elemzés

A kontroll és a kezelt sejtekben mért enzimaktivitási értékek átlagait és a mérések standard hibáit (SEM) hasonlítottuk össze. Ha az átlag \pm SEM intervallumok nem fedték át egymást, akkor a mintákat szignifikánsan különbözőnek tekintettük. Az egyes csoportokon belül az adatokat normál (Gauss) eloszlásúnak tételeztük fel, és ebből kiindulva páratlan "t" próba segítségével határoztuk meg a dupla tévedés valószínűségét, azaz a próba erősségét (p).

5. EREDMÉNYEK

5.1 A PC-12 sejtvonalon végzett mérések eredményei

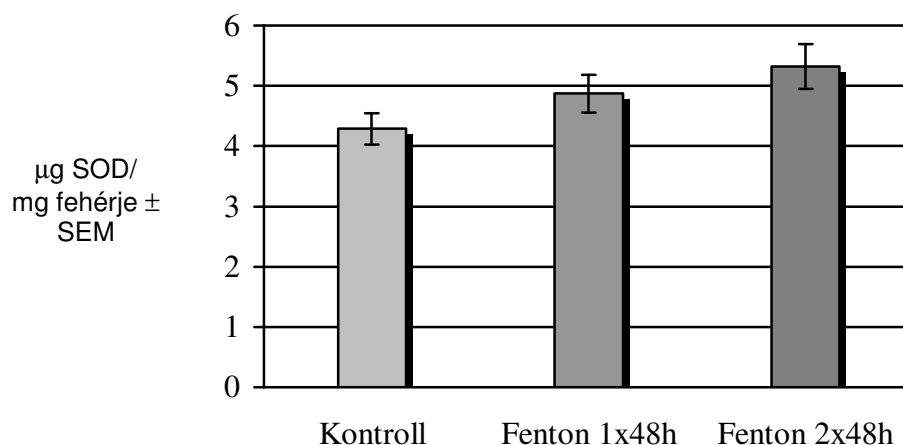
A PC-12 sejtvonalon az oxigénből származó reaktív részecskéket átalakító és elimináló enzimek (SOD, CA és GPx) aktivitásait mértük a kezeletlen, és a OH⁻-szabadgyökökkel (egyszer és ismételten) kezelt sejt kultúrákon. Pilótakísérletek során állapítottuk meg azokat a Fe²⁺ és H₂O₂ koncentrációkat, melyeket együttesen alkalmazva, még nem toxikusak a sejtekre az egyszeri és az ismételt hozzáadás során sem, de a sejtproliferációt már meggátolják. Tudjuk, hogy a stagnáló sejtszám a differenciálódási folyamatok markere és alapfeltétele is. 100 μM Fe²⁺ (Fe-ADP komplex formájában) és 25 μM H₂O₂ bizonyult a legmegfelelőbb koncentrációnak. E felett a koncentráció felett a sejtek elpusztultak, vagy a sejtszám drasztikusan csökkent, ez alatti koncentrációnál pedig a kezelés nem volt hatással a sejtosztódásra.

A kísérleti sejtszámokat úgy állítottuk be, hogy az inkubációs idők végén a kontroll és a kezelt sejtek azonos sűrűségűek voltak, így a konfluenciából adódó esetleges spontán differenciálódás hatását ki tudtuk küszöbölni. Ezt úgy valósítottuk meg, hogy a jól szaporodó kontroll sejteket alacsonyabb (1x10⁵/ml) sejtszámról indítottuk. A kezelt kultúrák esetében a kiindulási sejtszám magasabb (3x10⁵/ml) volt, és a kezelés, inkubálás során ezen a szinten maradt. Tehát, az első 48 h inkubálás után a kontroll és a kezelt (Fenton 1x48h) sejtek azonos sejtszámúak voltak, így a mért enzimszintek egymással jól összevethetők. Kíváncsiak voltuk arra is, hogy egy ismételt szabadgyök fluxus milyen hatással van a sejtekre, így a kezelt kultúrák egy részénél újabb kezelést végeztünk (Fenton 2x48h). Itt a sejtszám már kissé csökkent a kiinduláshoz képest. A kétszer kezelt kultúrák enzimértékeit az 1x48h-s kontroll enzimértékekhez viszonyítottuk, ugyanis a kontroll kultúrákat nem tudtuk ezzel párhuzamba állítani, mivel azok túlzott felszaporodása a sejtek pusztulásához vezetett volna a 2x48h inkubációs idő alatt. Az sem volt járható út, hogy a kiinduló sejtszámot még alacsonyabbra

állítsuk be, mert a sejtsűrűség nem csökkenthető egy bizonyos szint alá, akkor ugyanis a sejtek nem kezdenek el osztódni, és elpusztulnak.

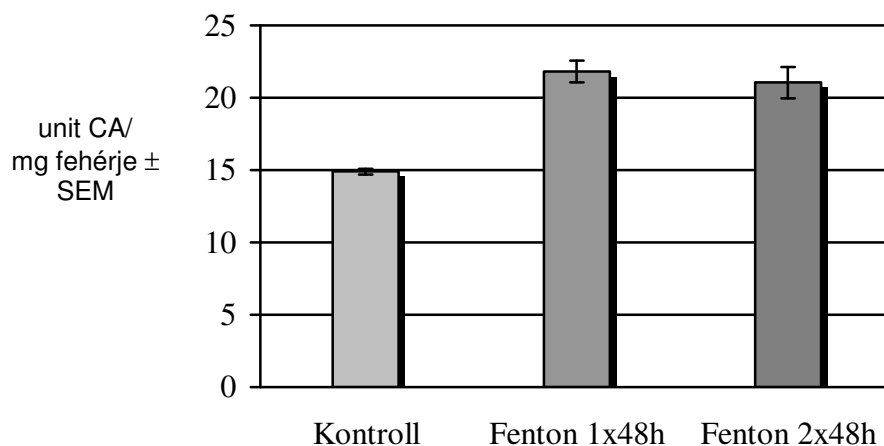
A sejtszám alakulásán kívül, a mikroszkópos morfológiát is figyeltük. Ebben a kezelésekre nem tapasztaltunk lényeges változásokat (mint nyúlványképződés például). A kezelt sejtek mikroszkóposan nagyobbak tűntek, de erre vonatkozóan nem végeztünk méréseket.

A SOD a O_2^- anionokat dizmutálja H_2O_2 -dá és vízzé. Az enzim (μg SOD/mg fehérje értékben kifejezett) aktivitása a kezeletlen sejtekben 4.29 ± 0.259 (\pm SEM) volt. Az első kezelés hatására ez egy kis mértékű, nem szignifikáns ($p < 0.19$) emelkedést mutatott, értéke 4.87 ± 0.308 volt. A második kezelés hatására viszont 5.32 ± 0.373 értékre emelkedett a SOD aktivitása, ami a kontrollhoz képest szignifikáns különbség ($p < 0.05$). A két kezelt (egyszeri és ismételt) kultúra enzimszintje között sem jelentős a különbség ($p < 0.36$). Tehát a SOD enzim esetében egy lassúbb, fokozatos emelkedést tapasztaltunk a kezelésekre során, mely összesen egy 24%-os enzimaktivitásbeli emelkedést jelentett. (1. táblázat, 3-1. ábra)



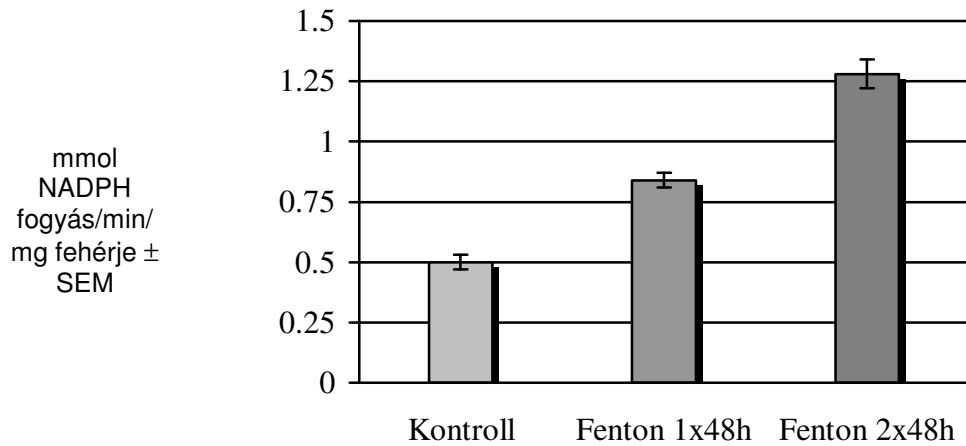
3.1. ábra. A SOD enzim aktivitásának változása a kezelésekre hatására

A CA a SOD által termelt H₂O₂-ot bontja el vízzé és oxigénné. Unit CA/mg fehérje értékben kifejezve, aktivitása a kontroll PC-12 sejtekben 14.89 ± 0.209 volt. Az enzim aktivitása már az első kezelés hatására jelentősen megemelkedett, 21.81 ± 0.765 érték lett. Ez 46%-os emelkedésnek felelt meg ($p < 0.001$). Az ismételt szabadgyök fluxus hatására ez az érték nem nőtt tovább, sőt kissé csökkent, (21.05 ± 1.086), bár a két kezelt kultúra CA aktivitás értéke egymáshoz képest nem mutatott szignifikáns különbséget ($p < 0.65$). (1. táblázat, 3-2. ábra)



3.2. ábra. A CA enzim aktivitásának változása a kezelések hatására

A harmadik mért paraméter a GPx enzim volt, mely az organikus peroxidokat bontja el. Az enzim aktivitását mmol NADPH fogyás/min/mg fehérje egységekben adtuk meg, ami megfelel más irodalmi adatoknak (Nagy és Zs.-Nagy, 1987, 1990). A kezeletlen sejtekben az enzim aktivitása 0.50 ± 0.029 volt. Az első, majd a második kezelés hatására is jelentős emelkedést kaptunk. 0.84 ± 0.020 , illetve 1.28 ± 0.058 volt az aktivitás 1x48h és 2x48h inkubációk után ($p < 0.001$). Az első kezelés 68%-os, a két kezelés együttesen 156%-os emelkedést eredményezett, ami igen magas, kiugró érték. (1. táblázat, 3-3. ábra).



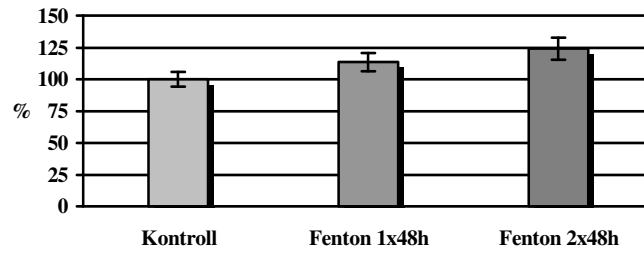
3.3. ábra. A GPx enzim aktivitásának változása a kezelések hatására

Összefoglalva, mindhárom mért paraméter (SOD, CA és GPx) jelentős aktivitásbeli emelkedést mutatott az egyszeri és az ismételt szabadgyökös kezelések hatására. (1. táblázat, 4. ábra)

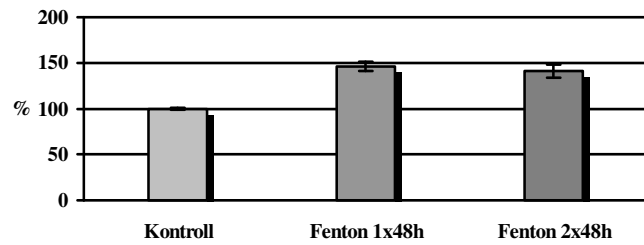
	µg SOD/mg fehérje átlag ± SEM	unit CA/mg fehérje átlag ± SEM	mmol NADPH fogyás/min/mg fehérje átlag ± SEM
Kontroll	4.29 ± 0.259	14.89 ± 0.209	0.50 ± 0.029
Fenton 1x48h	4.87 ± 0.308	21.81 ± 0.765	0.84 ± 0.020
Fenton 2x48h	5.32 ± 0.373	21.05 ± 1.086	1.28 ± 0.058

1. táblázat. Enzimaktivitások alakulása a Fenton reakcióval való kezelések előtt és után

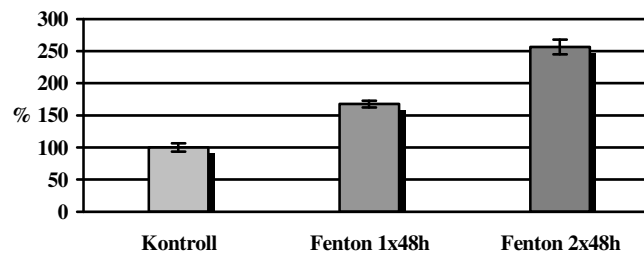
SOD



CA



GPx



4. ábra. Az enzimaktivitások (SOD, CA és GPx) relatív változása a Fenton reakcióval való kezelések hatására, a kontroll értékre, mint 100%-ra vonatkoztatva \pm SEM

5.2 Az SK-N-MC sejtvonalon végzett mérések eredményei

Munkánk során a sejtek morfológiai megjelenését invert mikroszkóppal követtük, valamint lefényképeztük a tenyésztőedények aljára fixált sejteket. (1. kép) A kezelések végén (2x72h) a kontroll és a BrdU-val kezelt sejtek konfluensek voltak. A BrdU-s kultúrák továbbá sokkal transzparensabb és nagyobb sejteket tartalmaztak. A Fenton kezelés hatására nem alakult ki konfluens kultúra, a sejtek egyrésze a BrdU-s sejtekhez hasonlóan nagyobb méretű, transzparens és a kontrollhoz képest a nyúlványok megjelenése kifejezettebb. Ugyanakkor nukleáris kondenzáció figyelhető meg, ami a vastoxicitás következménye is lehet. A differenciálódás és a Fenton kezelések morfológiára történő hatását nem vizsgáluk ennél részletesebben, vizsgálataink fő vonalát biokémiai paraméterek mérése képezte.

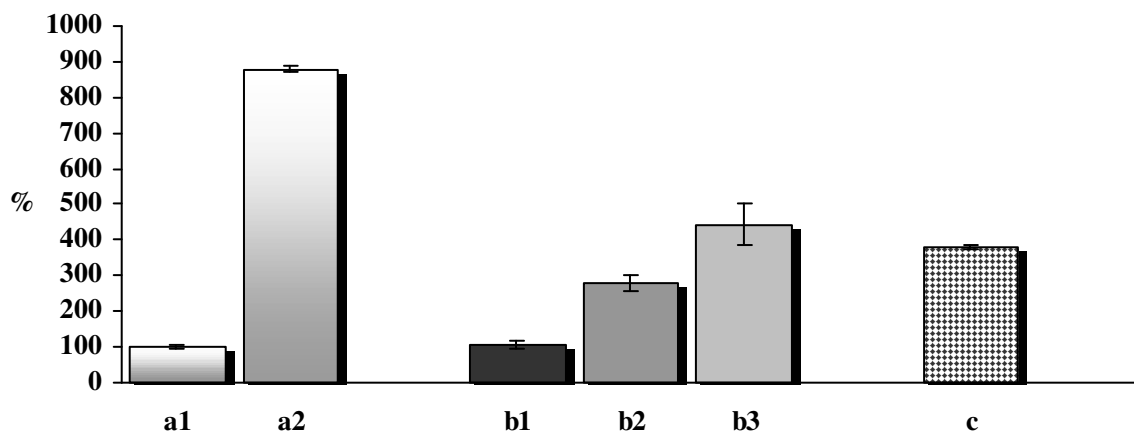
Az SK-N-MC sejtvonalon differenciálódási markerek megjelenését, illetve ezek aktivitásának emelkedését vizsgáltuk, szintén egyszeri és ismételt Fenton reakcióval való kezelések, és BrdU hatására is. A BrdU ismert differenciálószer az SK-N-MC és más neuroblasztóma sejteknek (Mühl, 1992, 1996; Kopitz et al., 1994), így pozitív kontrollként használhattuk ezeket a kultúrákat.

Az egyik mért paraméter az AchE enzim volt, ami egy elfogadott differenciálódást jelző enzim a kolinerg sejtvonalak (Sidell et al., 1984; Coleman és Taylor, 1996), és így az SK-N-MC sejtvonala esetében is (Mühl, 1992; Kopitz et al., 1994). Aktivitása a differenciálódással párhuzamosan jelentősen megnő (Mühl, 1992). A másik mért enzim a Triton-X-100-zal aktiválható plazmamembrán GS, mely az újabb eredmények tükrében, szintén differenciálódási markernek tekinthető (Kopitz et al., 1994, 1996, 1997). Az enzim aktivitása a differenciálódással párhuzamosan, szintén emelkedik.

Pilóta kísérleteink során állapítottuk meg azt a OH[•] kezelési koncentrációt, ami indukálta a sejtek differenciálódását, de nem volt toxikus a sejtekre. A BrdU kezelés hatására teljesen differenciálódó sejteknél, a 6 napos inkubáció során a sejttség nem stagnált, hanem egy 3.8 -szerez emelkedést mutatott, de még így is jóval alatta maradt a kezeletlen kontroll

proliferaációs rátájának (8.7 -szeres). Ez alapján egyforma sejtszámról indítottuk a mintákat (1×10^5 /ml). Az ideális kezelési koncentrációnak a 25-100 μM Fe^{2+} és a 10 μM H_2O_2 kombinációját találtuk, így először ebben a koncentráció tartományban vizsgáltuk a sejtszám alakulását a 2x72h inkubációs idő alatt. A 2x72h-s kezelés szerencsésen egybeesett a BrdU inkubációs idejével.

A sejtszámokat az előző fejezetben leírt indirekt módszer segítségével határoztuk meg. Az 5. ábrán látható, hogy a 2x72h-s inkubációs idő végére, a kezeletlen kontroll sejtszám kiugróan megemelkedik, 8.7-szeres lesz a kiindulási sejtszámhoz képest. A BrdU hatására sem stagnál a sejtszám, hanem 3.8-szeresére emelkedik ugyanezen idő alatt. A Fe^{2+} és H_2O_2 kezelések igen érdekes eredményt mutattak, a vaskoncentráció függvényében változott a sejtszám. A 100 μM Fe^{2+} és 10 μM H_2O_2 a kultúra sejtszámát a kiindulási értéken tartotta. A vaskoncentrációt a felére csökkentve, a sejtszám a 2.7-szeresére emelkedett. 25 μM Fe^{2+} és 10 μM H_2O_2 hozzáadásakor pedig, 4.4-szeresére emelkedett a sejtszám, mely érték hasonló a BrdU által kiváltott hatáshoz. (5. ábra)



5. ábra. Relatív sejtszámok a kezelések hatására ($\pm\text{SEM}$)

a1 kiindulási sejtszám

a2 kontroll

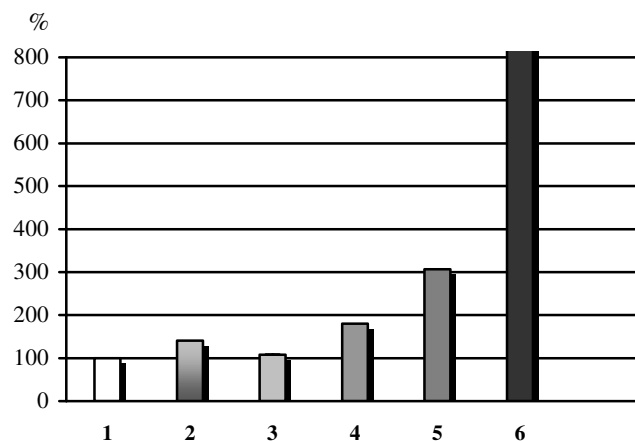
b1 100 μM Fe^{2+} + 10 μM H_2O_2

b2 50 μM Fe^{2+} + 10 μM H_2O_2

b3 25 μM Fe^{2+} + 10 μM H_2O_2

c 50 μM BrdU

A továbbiakban szeretnénk volna a legnagyobb hatást kiváltó Fe^{2+} - H_2O_2 kezelési koncentrációt alkalmazni, így az AchE enzimet először az előző koncentráció tartományban mértük. A 6. ábrán láthatjuk, hogy a 2x72h inkubációs idő alatt hogyan függ az enzim aktivitás értéke a vas koncentrációtól. Az 50 és 100 μM Fe^{2+} koncentráció kétszeres, illetve négyszeres mértékben emelte az enzim aktivitását (míg ezek hatása a kultúra sejtszámára éppen fordított). Mivel a 100 μM Fe^{2+} váltotta ki a legnagyobb hatást, így a továbbiakban ezt a kezelési koncentrációt alkalmaztuk annak ellenére, hogy a kezelés hatására a teljes (6 napos) inkubációs periódus végén alacsonyabb sejtszámokat kaptunk (a sejtszám a kiindulási érték közelében maradt), mint a BrdU-s kultúrában.



6. ábra. Az AchE enzim aktivitásának relatív változása különböző vaskoncentrációjú Fenton reakciós kezelésekre (2x72h alatt)

1- kontroll (1x72h)

2- kontroll (2x72h)

3- 25 μM Fe^{2+} + 10 μM H_2O_2

4- 50 μM Fe^{2+} + 10 μM H_2O_2

5- 100 μM Fe^{2+} + 10 μM H_2O_2

6- 50 μM BrdU

Tripán-kékkel életképesség vizsgálatokat is végeztünk a sejteken, hogy ellenőrizzük az 50 μ M BrdU és a legmagasabb koncentrációjú, azaz a 100 μ M Fe²⁺ + 10 μ M H₂O₂ kezelések hatását. A tesztet 1x72h és 2x72h inkubációs idők után végeztük el. A kontroll sejtekben 1.8% \pm 0.79% (\pm SEM) kékre festődött sejtet találtunk. Az 1x72h BrdU-s kezelés 7.02 \pm 0.76%, míg a Fenton kezelés ugyanezen idő alatt 6.8 \pm 1.7% elpusztult sejtet eredményezett. A kezelések ismétlésekor a BrdU kezelés esetében 8.01 \pm 0.05%-ra nőtt az elpusztult sejtek aránya, míg a Fenton kezelés már toxikus hatásokat eredményezett. Ez abban nyilvánult meg, hogy míg kb. 2 percig nem volt jelentős a kék sejtek aránya, a számolás mégsem vált lehetővé, mert a sejtek a számolás közben felvették a festéket. Így a 2x ismételt Fenton reakcióval való kezelés esetében nem tudtunk egy reális arányt megadni az elpusztult sejtek számát illetően. A toxikus hatáshoz az is hozzájárulhatott, hogy a tesztet tripszinezés és mosás előzte meg, ill. a festék maga is toxikus. Ez a három ok együttesen okozhatta, hogy nem vált lehetővé a számolás. A tenyésztőflaskában lévő sejtek mikroszkópos képe alapján nem vártuk, hogy bármelyik kezelés nagy eltérést mutat majd a Tripán-kék teszt alapján. Alacsonyabb Fe²⁺ koncentrációknál (50 és 25 μ M) 2x72 h alatt 9.65 \pm 0.59% és 9.25 \pm 0.19% volt az elpusztult sejtek aránya.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy (a 100 μ M Fe²⁺-sal 2x kezelt kultúrákat kivéve) a Fenton kezelések nem mutatnak erősebb toxikus hatást, mint a BrdU kezelés maga. Kiemelném, hogy az 1x72h-ban alkalmazott 100 μ M Fe²⁺-as Fenton kezelés toxicitása pedig egyezik a BrdU által okozott hatással. Így ez a kezelési koncentráció és inkubációs idő nem tekinthető toxikusnak, ez váltja ki a legerőteljesebb hatást a differenciálódási markerekre vonatkozóan, mint azt a későbbiekben is bemutatom.

Az AchE aktivitás és annak emelkedése számos kolinerg neuroblasztóma sejtvonal (Coleman és Taylor, 1960, Sidell et al., 1984) és az SK-N-MC-nek is differenciálódási markere (Kopitz, 1994). 50 μ M BrdU alkalmazása esetén ez a paraméter 4.5- szeresére emelkedik 72 óra, ill. 6.4- szeresére 2x72h alatt, a hasonló ideig kultúrában tartott kontroll sejtek enzimértékeihez viszonyítva. (2. táblázat)

A Fenton kezelés (100 μM Fe^{2+}) 3.2-szeres emelkedést idézett elő az AchE aktivitásában 72h alatt, míg az ismételt kezelés már nem emelte tovább ezt az értéket. A vaskoncentráció csökkentésével (50 és 25 μM értékre), az enzim aktivitása is fokozatosan csökkent.

Úgy tűnik, hogy a szabadgyökök differenciálódást okozó hatása egy igen szűk idő és koncentráció intervallumhoz köthető. Az AchE aktivitást μU enzim/mg fehérje értékben adtuk meg. (2. táblázat, 7. ábra)

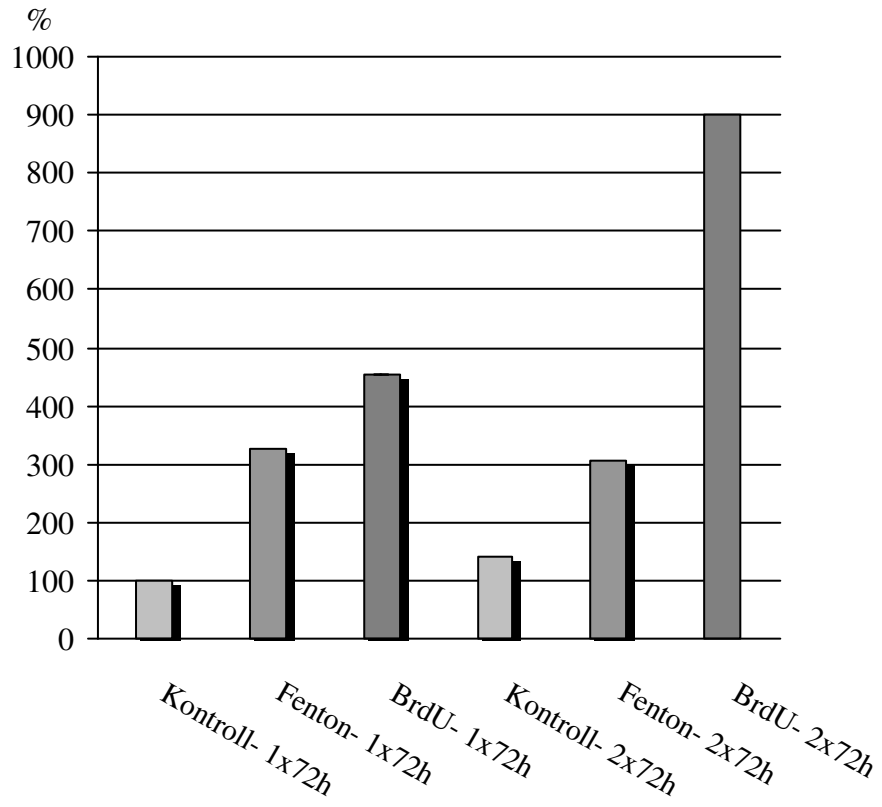
KEZELÉSEK	μU AchE/mg fehérje átlag \pm SEM (mérések száma) [mérési tartomány]	
	1X72h	2X72h
Kontroll	141.45 (2) [135.40-147.50]	198.60 (2) [184.40-212.80]
100 μM Fe^{2+} + 10 μM H_2O_2	459.72 (2) [455.60-463.85]	433.80 \pm 13.58 (3)
50 μM Fe^{2+} + 10 μM H_2O_2	-	254.23 (1)
25 μM Fe^{2+} + 10 μM H_2O_2	-	152.83 (1)
50 μM BrdU	641.95 (2) [615.40-668.50]	1275.25 \pm 5.26 (3)

2. táblázat. AchE aktivitások fehérjére vonatkoztatott értékei

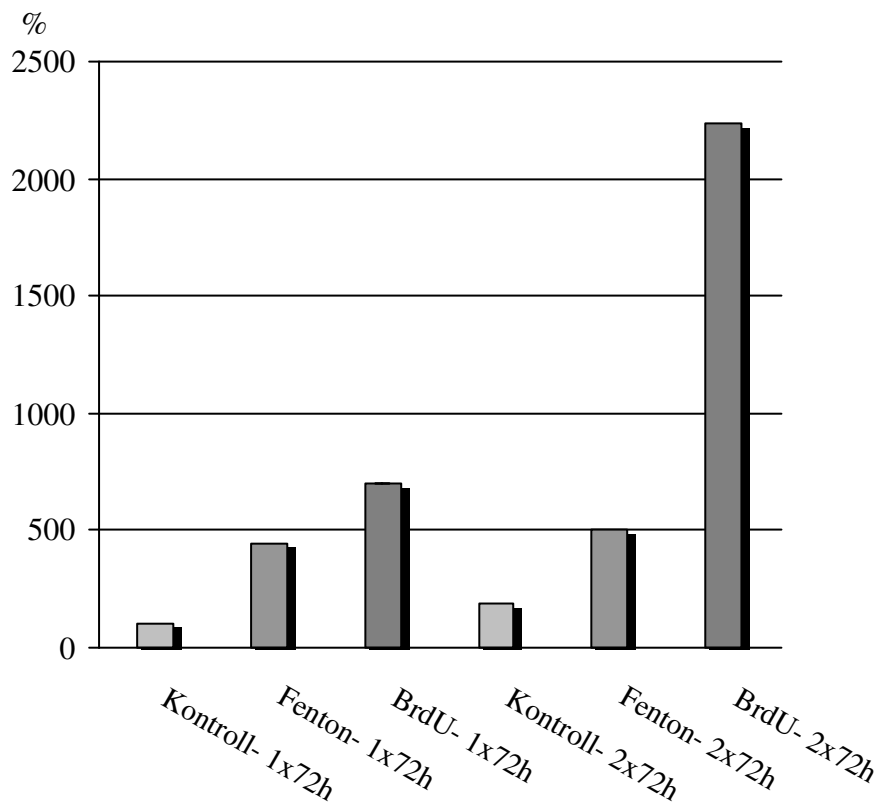
Úgy gondoltuk, hogy mivel a fehérjetartalom a differenciálódással párhuzamosan jelentősen megemelkedik, érdemes megvizsgálni az enzim-aktivításban mutatkozó változásokat μg DNS tartalomra vonatkoztatva is. Ezeket az eredményeket a 3. táblázatban láthatjuk, s kitűnik, hogy kifejezet-
tebb a különbség az enzim aktivitásában az 1x72h és 2x72h inkubációs idők között, mind a kontroll, mind pedig a BrdU és a Fenton kezelések esetében is. Igen szembetűnő a kontroll kultúrák esetében, hogy az enzim emelkedést mutat az 1x72h és 2x72h inkubációs idők között, ami spontán differenciálódásra utal. Ez a különbség 40%-os, ha mg fehérjére és 80%-os, ha μg DNS-re vonatkoztatjuk az eredményeket. Fontos megjegyezni, hogy a spontán differenciálódás mértéke mindig jóval elmarad a kezelések hatásától. (2., 3. táblázat, 7., 8-1. és 8-2. ábra)

	$\mu\text{U AchE}/\mu\text{g DNS}$ átlag \pm SEM (mérések száma) [mérési tartomány]	
KEZELÉSEK	1X72h	2X72h
Kontroll	1.378 (2) [1.279-1.477]	2.553 (2) [2.124-2.982]
100 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ + 10 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$	6.131 (2) [6.092-6.170]	6.918 (2) [6.262-7.575]
50 $\mu\text{M BrdU}$	9.646 \pm 0.298 (3)	30.832 \pm 0.234 (3)

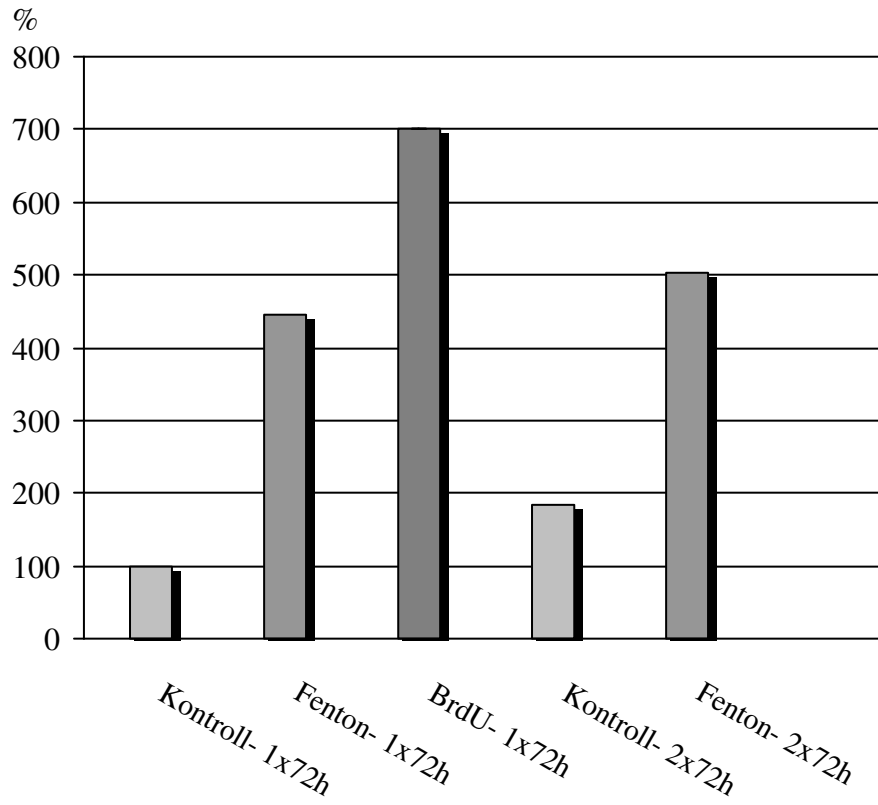
3. táblázat. AchE aktivitások DNS-re vonatkoztatott értékei



**7. ábra. Az AChE enzim aktivitásának relatív változása a kezelések hatására
(mg fehérjére vonatkoztatott adatok)**



**8-1. ábra. Az AChE enzim aktivitásának relatív változása a kezelések hatására
($\mu\text{g DNS-re}$ vonatkoztatott adatok)**

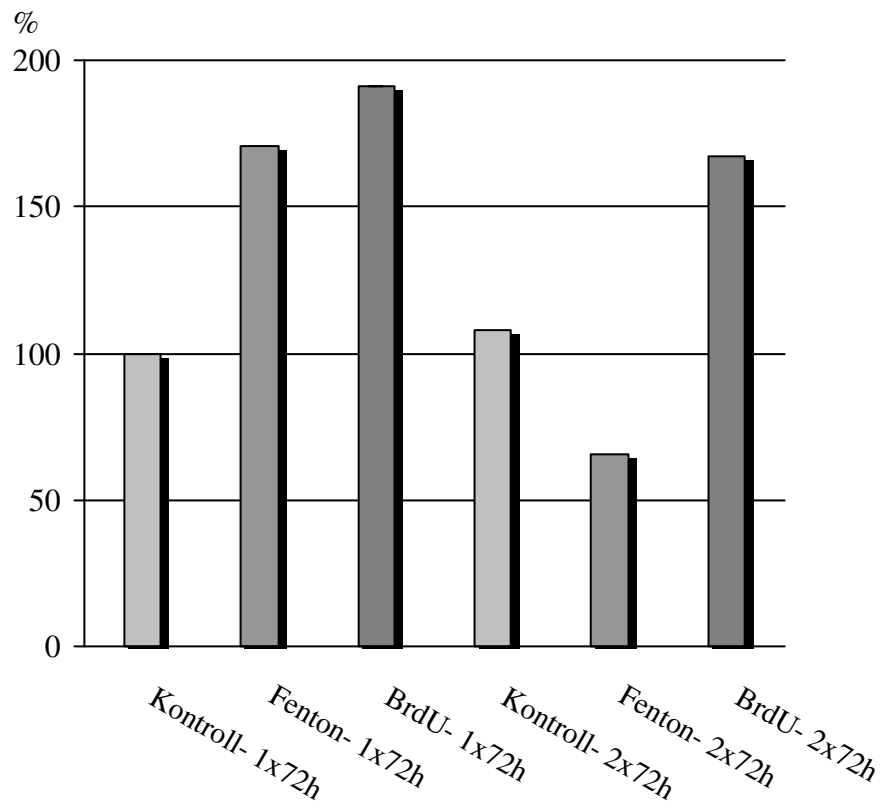


8-2. ábra. Az AchE enzim aktivitásának relatív változása a kezelések hatására
(μ g DNS-vonatkoztatott adatokból, a 2x72h-s BrdU kezelés nélkül)

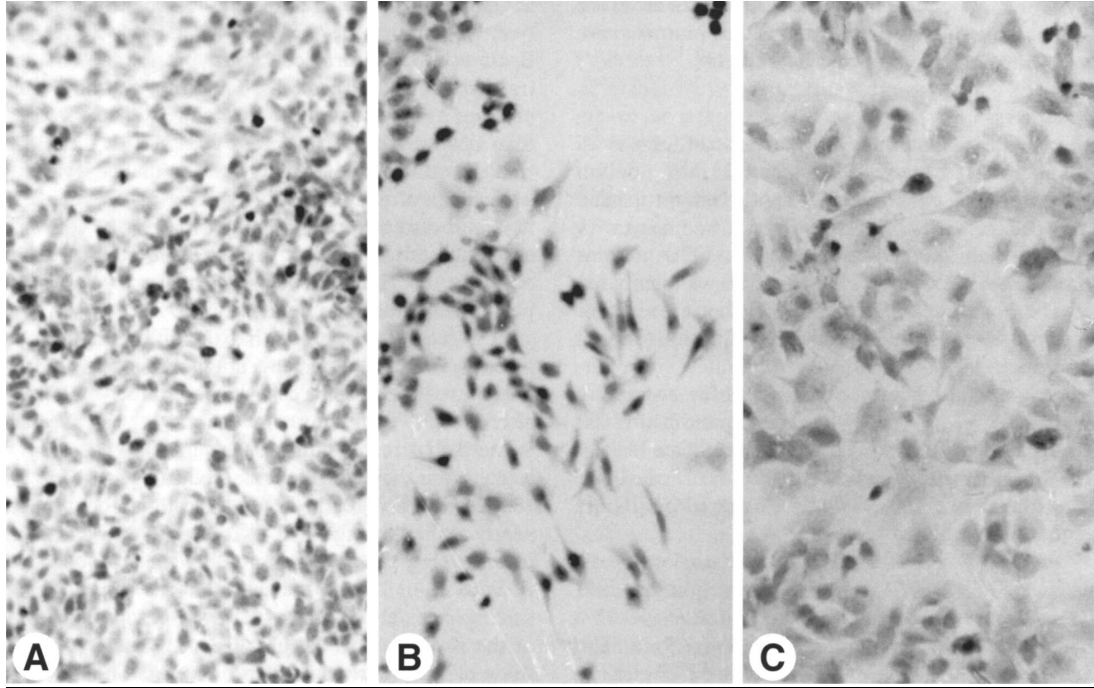
A másik vizsgált differenciálódási marker a GS enzim volt. Az első kezelések után (72h) az enzim aktivitása 1.7-szeresére nőtt a szabadgyökökkel, és 1.9-szeresére a BrdU-val kezelt kultúrákban, a kontrollhoz képest ($\mu\text{U GS/mg}$ fehérje értékekben megadva). A kezeléseket megismételve az enzim aktivitása csökkent a 72 órás értékekhez képest mind a Fe^{2+} , mind a BrdU-s kezelések esetében, csupán a kontroll kultúrákban tapasztaltunk kismértékű emelkedést. (4. táblázat, 9. ábra)

KEZELÉSEK	$\mu\text{U GS/mg}$ fehérje átlag \pm SEM (mérések száma) [mérési tartomány]	
	1X72h	2X72h
Kontroll	14.779 (2) [14.347-15.211]	15.984 (2) [14.648-17.320]
100 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ + 10 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$	25.192 (2) [24.697-25.688]	9.677 \pm 0.638 (3)
50 $\mu\text{M BrdU}$	28.253 (2) [27.553-28.953]	24.755 \pm 0.199 (3)

**4. táblázat. A GS enzim aktivitások
(mg fehérjére vonatkoztatott adatok)**



9. ábra. A GS enzim aktivitásának relatív változása a kezelések hatására



1. kép. Az SK-N-MC sejtek fénymikroszkópos képe 2x72h inkubációs időkhöz után.

(A) Kezeletlen kontroll sejtek

(B) Fenton kezelés /100 μM Fe²⁺ + 10 μM H₂O₂/

(C) 50 μM BrdU

Nagyítás: x 180

6. MEGBESZÉLÉS

Munkám célja annak bizonyítása volt, hogy egyszeri és ismételt, pillanatszerű OH^\bullet -szabadgyök fluxus hatással van-e a neuroblasztóma sejtvonalak differenciálódásának indukálására. Mindezeket a differenciálódási markerek megjelenésének, és az oxigénből származó reaktív részecskéket átalakító és elimináló enzimek aktivitásbeli megnövekedésének vizsgálatán keresztül szeretnénk volna bebizonyítani. Az irodalomban széles körben idézett, és az általunk is kiválasztott neuroblasztóma sejtvonalak (PC-12, SK-N-MC), munkánk során könnyen és jól kezelhető modelleknek bizonyultak. Szaporodási rátájuk igen magas, tenyésztésük egyszerű.

A kezelések során az OH^\bullet -szabadgyökök generálását a jól bevált Fenton reakció segítségével végeztük in vitro. Megállapítottuk azokat a kezelési koncentrációkat, ahol a sejtdifferenciálódás indukálódását érdemes vizsgálni. Kiválasztottuk azokat a Fe^{2+} és H_2O_2 koncentrációkat, melyeket együttesen adagolva, a sejtproliferáció stagnálása érhető el, toxikus hatások nélkül. A kezeléseket illetően kísérleteink során megállapítottuk, hogy a szabadgyökös kezelések egy igen szűk koncentrációtartományban végezhetőek el, továbbá, hogy ezen a tartományon belül a gyökök által kiváltott hatások koncentrációfüggése figyelhető meg. A vizsgált enzimek aktivitása az egyszeri és az ismételt kezelések hatására is emelkedett, de egymáshoz képest más-más arányban. Mindezekből a mérésekből az is körvonalazódott, hogy a szabadgyökök differenciálódást indukáló hatását egyszeri megemelt gyökfluxus után érdemes leginkább tanulmányozni. Ez azért is igaz lehet, mert ha az első kezelés hatására már beindul a differenciálódás, a második gyökmennyiség már egy fejlettebb stádiumban lévő sejtet érint, így a probléma összetettebb, sőt, toxikus hatások is megjelenhetnek. Igen érdekes számunkra annak megtapasztalása, hogy az egyszeri (vagy ismételt), pillanatszerű kezelések hatására, relatíve hosszú idő (egy hét) után is magasak maradtak a vizsgált enzimszintek, ami igen érdekes, ha összevetjük ezt a hatást az egyes sejtvonalakra jellemző differenciálószerrek hatásával (NGF, BrdU), melyek folyamatos jelenléte szükséges a tápfolyadékban a teljes differenciálódás eléréséhez. Ugyanakkor természetesen azt is ki kell

hangsúlyozni, hogy a Fenton reakcióval való kezelések hatása mennyiségileg soha nem éri el a differenciálószer hatását (kivétel a GS enzim, ahol igen), amit a kezeléseink nem specifikus voltával is lehet magyarázni. Ugyanakkor a paraméterek megváltozásának tendenciái egyértelműen azonosak voltak. A bevezető fejezetekben kihangsúlyoztam, de itt érdemes újra megemlíteni, hogy azért is volt érdekes idegrendszeri eredetű sejtvonalon vizsgálni a szabadgyökök hatását, mert az idegrendszer (a magasabb oxigénfogyasztása miatt) kitüntetett szereppel bír a gyökhatások tekintetében (Jones et al., 1982). Munkám szorosan kapcsolódik, ill. újabb kísérleti bizonyítékokkal szolgál azokhoz az irodalmi adatokhoz, ahol szintén (valamilyen formában) a szabadgyökök differenciálódásban betöltött szerepét vizsgálják. Munkacsoportunk a HL-60 és a K-562 leukémia sejtvonalakon és humán fibroblaszt tenyészeteken dolgozott, így ezzel a munkával sikerült egy újabb típusú modellen bizonyítani a szabadgyökök differenciálódást indukáló hatását. Munkám beilleszthető más kísérleti eredmények mellé is, miszerint a külső O_2 nyomás növelése, gátolja a sejtproliferációt számos sejtípus esetében (Grant et al., 1992; Absher et al., 1994). Katoh és munkatársai (1997) már azt is bizonyították, hogy a PC-12 sejtvonalnál a differenciálódás (mint nyúlványképződés, valamint differenciálódási marker fehérjék, a tirozin-hidroxiláz és a neurofilamentum M szintjének emelkedése) beindul egy 50%-kal emelt külső O_2 tartalom (hiperoxia) hatására. Mivel ezt a hatást antioxidánsok jelenlétében (aszorbinsav, N-acetil-cisztein) blokkolni tudták, feltételezték, hogy ezeket a hatásokat tulajdonképpen a reaktív oxigén-eredetű szabadgyökök fejtik ki. Majd a fenti (tirozin-hidroxiláz, neurofilamentum M) paraméterek emelkedését figyelték meg $O_2^{\cdot-}$ gyökök jelenlétében, amit a xantin/xantin-oxidáz rendszer segítségével generáltak. Kamata és munkatársai (1996) azt figyelték meg, hogy az NGF –ami a PC-12 sejtvonal differenciálódását okozza– nem fejt ki differenciálódást indukáló hatását (a nyúlványképződés elmarad) antioxidánsok, gyökfogó ágensek jelenlétében. Újabban ezt további vizsgálatokkal is megerősítették (Suzukawa et al., 2000), miszerint a reaktív oxigén gyökök (ROS) elvonása, megakadályozza a PC-12 sejtek NGF jelenlétében bekövetkező differenciálódását. Azt is bizonyították, hogy a ROS az NF κ B transzkripció faktor DNS kötő aktivitását

növelik (Sen és Packer, 1996). Továbbá arra vonatkozóan is folytak kísérletek, hogy a reaktív oxigén gyökök az NGF gén aktiválódását is elősegítik (Naveilhan et al., 1994).

Ezen irodalmi adatok és saját kísérleteink bizonyítéku­l szolgál­nak arra, hogy a differenciálódás indukálásában figyelembe kell venni a szabadgyökök szerepét úgyis, mint szignál molekulák, és úgyis, mint a fiziko-kémiai paraméterek megváltoztatásán keresztül, áttételesen ható ágensek, az MHA alapján úgy gondoljuk, hogy a szervezetünkben folyamatosan termelődő OH[•]-szabadgyökök azok, melyek betöltik ezt a funkciót. Tehát a szabadgyökök egy sokkal összetettebb –és nemcsak káros– biológiai, élettani szereppel bírnak annál, mint az napjainkban elfogadott.

A PC-12 sejtvonalon megmért három enzim (SOD, CA és GPx) együttesen megemelkedett szintjét úgy értelmezhetjük, hogy a sejt önmagában (válaszként, a rövid, külső gyökhatásra) egy magasabb szintű gyöktermelést állít be, amit a kezelések után relatíve hosszú ideig fenntart. Szerintünk tehát a differenciálódás mindenképpen összekapcsolódik a szabadgyök termelés magasabb szintjével. Ezt konkrétan úgy kell érteni, hogy a SOD enzim megemelkedett aktivitásának következtében több H₂O₂ keletkezik, aminek egy részét a CA és a GPx elbontja ugyan, de mindemellett a Fenton reakció (mely a jelenlévő Fe²⁺ és a H₂O₂ között igen gyorsan játszódik le) is több OH[•] termelődését eredményezi. Mindezekhez, úgy feltételezzük, hogy magasabb fokú oxigénfogyasztás is társul, amelyre vonatkozóan jelenleg folynak kísérletek.

Úgy gondoljuk tehát, hogy a fent nevezett enzimek megemelkedett aktivitása egy differenciáltabb állapothoz kapcsolódik. Ezt támasztja alá az is, hogy a PC-12 sejtekben az NGF jelenlétében ezen enzimek aktivitásának megváltozása teljesen hasonló tendenciát mutat, még hozzá hasonló inkubációs idők alatt (Sampath et al., 1994). A CA és a GPx aktivitásának megemelkedését mutatták ki NGF hatására a PC-12 sejtekben (Sampath és Perez-Polo, 1997). Az NGF megemeli a CA és a GPx mRNS szintjét is ugyanezen a sejtvonalon (Sampath et al., 1994). A SOD enzim mRNS szintje is magasabb NGF hatására (Li et al., 1998). A SOD igen érdekes enzim a differenciálódás szempontjából, nemcsak azt írták le, hogy szintje a differenciálódással párhuzamosan megemelkedik, hanem a SOD-ot egyértelműen

differenciálódási markerként is emlegetik (Sohal és Allen, 1990). A nem-differenciálódott és tumoros sejtekben a SOD aktivitás igen alacsony, ami a differenciálódás során extrémén megnő, a SOD jelenléte tehát a differenciálódás előfeltétele is (Sohal és Allen, 1990). Megfigyelték, hogy extracellulárisan adagolva differenciálódást indukál differenciálatlan sejtvonalak (Allen et al., 1988), mint például leukémiás sejtek esetében (Beckmann et al., 1989). A SOD fontos szereppel bír az oogenezis és az embriogenezis során is (Montesano et al., 1989), ahol terméke fontos az ovoperoxidáz funkciójához, ami a fertilizáció során keresztkötődések kialakításával tölti be funkcióját (Heinecke és Shapiro, 1990). Mindezek azt sugallják, hogy a SOD mennyiségi szintje fontos a sejt differenciálódás és sejtérés egyes fázisaiban (Zs.-Nagy, 1994).

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

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

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során a hidroxil szabadgyökök (OH^\cdot) neuroblasztóma sejtvonalak differenciálódásában betöltött indukáló szerepét vizsgáltam. Az öregedés membrán hipotézise (Zs.-Nagy, 1994) szerint a szervezetünkben folyamatos a OH^\cdot -szabadgyökök termelődése, mely szabadgyökök nemcsak káros hatásúak lehetnek az élő szervezetekre, hanem bizonyos koncentrációban való jelenlétük esszenciális az élő állapot fenntartásában, valamint szerepet játszanak a sejt differenciálódási folyamatokban. Célkitűzésemmel ehhez a kutatási koncepcióhoz csatlakozva, az oxigéneredetű szabadgyökök sejt differenciálódást kiváltó hatását tanulmányoztam két idegrendszeri eredetű sejtvonal, a PC-12 és az SK-N-MC modelleken. A kiválasztott sejtvonalak a jelenlegi sejt- és molekuláris biológiai kutatások széles körben alkalmazott modelljei.

Sikerült bebizonyítani, hogy létezik egy olyan ideális a hidroxil szabadgyök koncentráció, ami toxikus hatások nélkül, a sejtproliferációt gátolva, a differenciált fenotípus kialakulása felé viszi a sejteket. A PC12 sejtvonalon bizonyítottuk, hogy az oxigénből származó reaktív részecskéket átalakító és elimináló enzimek, a SOD, a CA és a GPx aktivitásának növekedése következik be in vitro szabadgyök fluxus hatására. Mindhárom enzim aktivitása az egyszeri és az ismételt kezelések hatására is emelkedett. Az SK-N-MC sejtvonal esetében megállapítottuk, hogy a differenciálódási markerek megjelennek a sejtekben a szabadgyökök differenciálódást indukáló hatása nyomán. Az AchE és a GS enzimek jelentős aktivitásbeli emelkedést mutattak egyszeri és ismételt kezelések után.

Összegezve tehát, mindkét vizsgált idegrendszeri eredetű sejtvonalon sikerült bizonyítani az oxigéneredetű szabadgyökök differenciálódást indukáló hatását, ezáltal feltett kérdésünket két, egymástól független kísérleti modellen is bizonyítottuk.

Mindezen munka során sikerült mélyebb ismereteket szerezni az öregedési elméletekről, és az oxigéneredetű szabadgyökök biológiai, élettani szerepéről.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Absher, M., Makrides, W., Shapiro, P. and Evans, J.N. (1994): Hyperoxia inhibits proliferation of cultured rat tracheal smooth muscle cells, *Am. J. Physiol.*, 267, L101-105.

Ádám, V., Faragó, A., Machovich, A. and Mandl, J. (1996): *Orvosi biokémia*, V. Ádám, Ed., Semmelweis Kiadó, Budapest, pp. 263-264.

Ahlert, G. (1995): Ursachen der Seneszenz - adaptiv, nicht destruktiv, *Z. Gerontol. Geriat.*, 28, 147.

Ahlert, G. (1996a): Konsequenzen aus der Evolutionsbiologie für die Biogerontology. Altern in Gesundheit und Krankheit, *Abstract d. 3. Kongr. d. DGGG*.

Ahlert, G. (1996b): *Altern - Ergebnis ökologischer Anpassung*, Karger Vlg, Freiburg.

Ahlert, G. (1999): Biogerontology: Stand und aktuelle Entwicklungen, *Z. Gerontol. Geriat.*, 32, 112-123.

Allen, R.G., Balin, A.K., Reimer, R.J., Sohal, R.S. and Nations, C. (1988): Superoxide dismutase induces differentiation in the slime mold *Physarum Polycephalum*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 261, 205-211.

Allsopp R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C. and Harley, C.B. (1992): Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10114-10118.

Ames, B.N., Saul, R.L., Schwiers, E., Adelman, R. and Cathcaet, R. (1985): Oxidative DNA damage as related to cancer and aging: assay of thymine glycol, thymidine glycol and hydroxymethyl-uracil in human and rat urine, in *Gene Stability and Gene Expression*, R.S. Sohal, L.S. Birnbaum and R.G. Cutler, Eds., Raven Press, New York, 137-144.

Ames, B.N., Shinegana, M.K. and Hagen, T.M. (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 7915-7922.

Ashok, B.T. and Ali, R. (1999): The aging paradox: free radical theory of aging, *Exp. Gerontol.*, 34, 299-303.

Balin A.K. (1985): Oxygen modulates the growth and life span of cultured 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.

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.

Barnes, E.N., Biedler, J.L., Spengler, B.A. and Lyser, K.M. (1981): The fine structure of continuous human neuroblastoma lines SK-N-SH, SK-N-BE(2), and SK-N-MC, *In Vitro*, 17, 619-631.

Bashford, C.L. and Harris, D.A. (1987): *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry – a Practical Approach*, IRL Press Limited, Oxford, Washington DC, pp. 64-65.

Bayreuther, K., Francz, P.I. and Rodemann, H.P. (1992): Fibroblasts in normal and pathological terminal differentiation, aging, apoptosis and transformation, *Arch. Gerontol. Geriatr. Suppl.*, 3, 47-74.

Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Jeney, F., Nagy, K. and Zs.-Nagy, I. (2000): On the useful role of OH. free radicals in differentiation of cultured human fibroblasts, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 31, 233-242.

Beckmann, B.S., Balin, A.K. and Allen, R.G. (1989): Superoxide dismutase induces differentiation of Friend erythroleukemia cells, *J. Cell Physiol.*, 139, 370-376.

Bergelson, L.D. (1995): Serum gangliosides as endogenous immunomodulators, *Immunology Today*, 16, 483-486.

Berkow, R., Ed., (1994): *MSD Orvosi Kézikönyv*, Melania Kiadó, Budapest, 1097-1100.

Biedler, J.H., Helson, L. and Spengler, B.A. (1973): Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture, *Cancer Res.*, 33, 2643-2652.

Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M. and Freedman, L.S. (1978): Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones, *Cancer Res.*, 38, 3751-3757.

Björksten, J. (1942): Chemistry of duplication, *Chemical Industries*, 49, 2.

Blume, A., Gilbert, F., Wilson, S., Farber, J., Rosenberg, R. and Nirenberg, M. (1970): Regulation of acetylcholinesterase in neuroblastoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67, 786-792.

Braun, P.E., Morell, P. and Radin, N.S. (1970): Synthesis of C18- and C20-dihydrosphingosines, ketodihydrosphingosines, and ceramides by microsomal preparations from mouse brain, *J. Biol. Chem.*, 245, 335-341.

Cadenas, E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity, *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 79-110.

Cadenas, E. and Davies, K.J. (2000): Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, *Free. Rad. Biol. Med.*, 29, 222-230.

Chan, K.-F. J. (1987): Ganglioside-modulated protein phosphorylation partial purification and characterisation of a ganglioside-stimulated protein kinase in brain, *J. Biol. Chem.*, 262, 5248-5255.

Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rev.*, 59, 527-605.

Chigorno, V., Valsecchi, M., Sonnio, S. and Tettamanti, G. (1990): Formation of tritium-labeled polysialylated gangliosides in the cytosol of rat cerebellar granule cells in culture following administration of [³H]GM1 ganglioside, *FEBS Lett.*, 277, 164-166.

Coleman, B.A. and Taylor, P. (1996): Regulation of acetylcholinesterase expression during neuronal differentiation, *J. Biol. Chem.*, 271, 4410-4416.

Cone, C.D.Jr. and Cone, C.M. (1971): Induction of mitosis in mature neurons in central nervous system by sustained depolarization, *Science*, 192, 155-158.

Critchley, D.R. and Macpherson, I. (1973): Cell density dependent glycolipids in NIL2 hamster cells, derived malignant and transformed cell lines, *Biochim. Biophys. Acta*, 296, 145-159.

Cutler, R.G. (1982a): Longevity is determined by specific genes: testing the hypothesis, in *Testing the Theories of Aging*, R. Adelman and G. Roth, Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 25-114.

Cutler, R.G. (1982b): The dysdifferentiative hypothesis of mammalian aging and longevity, in *The Aging Brain*, E. Giacobini, G. Giacobini, G. Filogamo, and A. Vernadakis, Eds., Raven Press, New York, 1-18.

Cutler, R.G. (1985a): Antioxidants and longevity in mammalian species, in *Molecular Biology of Aging*, A.D. Woodhead, A.D. Blackett and A. Hollaender, Eds., Plenum Press, New York, 15-73.

Cutler, R.G. (1985b): Dysdifferentiative hypothesis of aging: a review, in *Molecular Biology of Aging: Gene Stability and Gene Expression*, R.S. Sohal, L.S. Birnbaum and R.G. Cutler, Eds., Raven Press, New York, 307-340.

Cutler, R.G. (1985c): Peroxide producing potential of tissues: inverse correlation with longevity of mammalian species, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 4798-4802.

Cutler, R.G., Davis, B.J., Ingram, D.K. and Roth, G.S. (1992): Plasma concentrations of glucose, insulin, and percent glycosylated hemoglobin are unaltered by food restriction in Rhesus and Squirrel monkeys, *J. Gerontol. Biol. Sci.*, 47, B9-B12.

Damjanovich, S. and Somogyi, B. (1973): A molecular enzyme model based on oriented energy transfer, *J. Theor. Biol.*, 41, 567-569.

Darányi, G. (1930): Fejlődés, fajfenntartás és öregedés a természetben, *Term. Tud. Közl.*, 62, 305-313.

Darwin, E. (1795): *Zoonomie oder Gesetze des organischen Lebens (Translation from English: Zoonomia or the Laws of Organic Life)*, Gebrüder Hahn, Hannover, Part 1, 144 and Part 2, 382-384.

De Grey, A.D. (2000): The reductive hotspot hypothesis: an update, *Arch. Biochem. Biophys.*, 373 (1), 295-301.

Desbordes, P. and Cohadon, F. (1987): Brain water and aging, *J. Gerontol.*, 42, 655-659.

Donato, H. and Sohal, R.S. (1981): Relationships 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.

Esposito, J.L. (1983): Conceptual problems in theoretical gerontology, *Perspect. Biol. Med.*, 26, 522-546.

Fenton, H.J.H. (1894): Oxidation of tartaric acid in presence of iron, *J. Chem. Soc.*, 65, 899-910.

Flohé, L. and Ötting, F. (1984): Superoxide dismutase assays, *Meth. Enzymol.*, 105, 93-104.

Flohé, L. and Günzler, W.A. (1984): Assays of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.*, 105, 93-104.

Floyd, R.A. and Lewis, C.A. (1983): Hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide by ferrous iron-nucleotide complexes, *Biochemistry*, 22, 2645-2649.

Floyd, R.A. and Zs.-Nagy, I. (1984): Formation of long-lived hydroxyl free radical adducts of proline and hydroxyproline in a Fenton reaction, *Biochim. Biophys. Acta*, 790, 94-97.

Forman, H.J. and 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.

Fridovich, I. (1976): Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity, in *Free Radicals in Biology*, Vol. 1, W.A. Pryor, Ed., Academic Press, New York, 239-277.

Gahmberg, C.G. and Hakomori, S. (1973): External labeling of cell surface galactose and galactosamine in glycolipids and glycopeptides of human erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, 245, 4311-4317.

Gaunt, G. L. and De Duve, C. (1976): Subcellular distribution of D-amino acid oxidase and catalase in rat brain, *J. Neurochem.*, 26, 749-759.

Gershon, D. (1999): The mitochondrial theory of aging: is the culprit a faulty disposal system rather than indigenous mitochondrial alterations ?, *Exp. Gerontol.*, 34 (5), 613-619.

Gershon, H. and Gershon, D. (1970): Detection of inactive enzyme molecules in ageing organism, *Nature*, 227, 1214.

Gershon, H. and Gershon, D. (1973): Altered enzyme molecules in senescent organisms: mouse muscle aldolase, *Mech. Ageing Dev.*, 2, 33-41.

Glees, P. and Hasan, M. (1976): Lipofuscin in *Neuronal Aging and Diseases. Normal and Pathological Anatomy, Vol. 32*, W. Bargmann and W. Doerr, Eds., G. Thieme Publishers, Stuttgart.

Goldstein, D.B. (1968): A method for assay of catalase with the oxygen cathode, *Anal. Biochem.*, 24, 431-437.

Grant, M.M., Koo, H.C. and Rosenfeld, W. (1992): Oxygen affects human endothelial cell proliferation by inactivation of fibroblast growth factors. *Am. J. Physiol.* 263, L370-L375.

Greene, L.A. and Tischler, A.S. (1976): Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal phaeochromocytoma cells which respond to nerve growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2424-2428.

Greenwald, R.A. (1990): Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review, *Free Rad. Biol. Med.*, 8, 201-209.

Gutteridge, J.M.C., Zs.-Nagy, I., Maitt, L. and Floyd, R.A. (1990): ADP-iron as a Fenton reactant: radical reactions detected by spin trapping, hydrogen abstraction and aromatic hydroxylation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 277, 422-428.

Hakomori, S. (1970): Cell density-dependent changes of glycolipid concentrations in fibroblasts, and loss of this response in virus-transfected cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 67, 1741-1747.

Hakomori, S. (1981): Glycosphingolipids in cellular interaction, and oncogenesis, *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 733-764.

Hakomori, S. and Igarashi, Y. (1995): Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signalling, *J. Biochem.*, 118, 1091-1103.

Hallivel, B. (1996): Oxidative stress, nutrition and health: Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidants intake in humans, *Free Rad. Res.*, 25, 57-74.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1985): *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford.

Harley, C.B., Kim, N.W., Prowse, K.R., Weinrich, S.L., Hirsch, K.S., West, M.D., Bachetti, S., Hirte, H.W., Counter, C.M. and Greider, C.W. (1994): Telomerase, cell immortality, and cancer, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 59, 307-315.

Harman, D. (1956): Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.*, 11, 298-300.

Harman, D. (1960): The free radical theory of aging: the effect of age on serum mercaptan levels, *J. Gerontol.*, 15, 38-40.

Harman, D. (1961): Mutation, cancer and aging, *Lancet*, 1, 200-201.

Harman, D. (1988): Free radical theory of aging: current status, in *Lipofuscin – 1987: State of the Art*, I. Zs.-Nagy, Ed., Akadémiai Kiadó, Budapest and Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 3-21.

Harman, D. (1998): Aging: Phenomena and Theories, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 854, 1-7.

Harrison, D.E. (1985): Cell and tissue transplantation: a means of study the aging process, in *Handbook of the Biology on Aging*, 2nd ed., C.E. Finch and E.L. Schneider, Eds., Van Nostrand, New York, 322-356.

Hart, R.W. and Turturro, A. (1998): Evolution and dietary restriction, *Exp. Gerontol.*, 33 (1-2), 53-60.

Hayflick, L. (1965): The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, 37, 614-636.

Hayflick, L. (1982): Ageing and death of vertebrate cells, in *Lectures on Gerontology*, Vol. I, Part A, A. Viidik, Ed., Academic Press, London, 61-99.

Hayflick, L. (1985): Theories of biological aging. Review article, *Exp. Gerontol.*, 20, 145-159.

Heinecke, J.W. and Shapiro, B.M. (1990): Superoxide peroxidase activity of ovoperoxidase, the cross-linking enzyme of fertilization, *J. Biol. Chem.*, 265, 9241-9246.

Henshaw, P.S., Riley, E.R. and Stapleton, G. (1947): The biological effects of pile radiation, *Radiology*, 9, 349-364.

Holliday, R. (1990): The limited proliferation of cultured human diploid cells: regulation or senescence ?, *J. Gerontol. Biol. Sci.*, 45, B36-B41.

Igarashi, Y., Nojiri, H., Hanai, N. and Hakomori, S. (1989): Gangliosides that modulate membrane protein function, *Methods. Enzymol.*, 179, 521-541.

Ivy, G.O., Ihara, Y. and Kitani, K. (1991): The protease inhibitor leupeptin induces several signs of aging in brain, retina and internal organs of young rats, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 12, 119-161.

Ivy, G.O., Schottler, F., Baudry, M. and Lynch, G. (1986): Leupeptin causes several manifestations of aging in brain and liver of young rats, in *Liver and Aging - 1986*, K. Kitani, Ed., Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 389-400.

Ivy, G.O., Schottler, F., Wenzel, J., Baudry, M. and Lynch, G. (1984): Inhibitors of lysosomal enzymes: accumulation of lipofuscin-like dense bodies in the brain, *Science*, 226, 985-987.

Jamieson, D., Chance, B., Cadenas, E. and Boveris, A. (1986): The relation of free radical production to hyperoxia, *Annu. Rev. Physiol.*, 48, 703-719.

Jones, O.W. and Berg, P. (1966): Studies on the binding of RNA polymerase to polynucleotides, *J. Mol. Biol.*, 22, 199-209.

Jones, M.D., Jr., Rosenberg, A.A., Simmons, M.A., Molteni, R.A., Koehler, R.C. and Traystman, R.J. (1982): Oxygen delivery to the brain before and after birth, *Science*, 216, 324-325.

Kamata, H., Tanaka, C., Yagisawa, H., Matsuda, S., Gotoh, Y., Nishida, E. and Hirata, H. (1996): Suppression of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC-12 cells. N-acetylcysteine uncouples the signal transduction from ras to the mitogen-activated protein kinase cascade, *J. Biol. Chem.*, 271, 33018-33025.

Kasugai, I. and Yamada, M. (1992): High production of catalase in hydrogen peroxide-resistant human leukemia HL-60 cell lines, *Leukemia Res.*, 16, 173-179.

Kato, S., Mitsui, Y., Kitani, K. and Suzuki, T. (1997): Hyperoxia induces the differentiated neuronal phenotype of PC-12 cells by producing reactive oxygen species, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 241, 347-351.

Kimata, H. and Yoshida, A. (1994): Differential effects of gangliosides on Ig production and proliferation by human B cells, *Blood*, 84, 1193-1200.

King, A.L. (1946): Pressure volume relation for cylindrical tubes with elastometric walls: the human aorta, *Appl. Phys.*, 17, 501-505.

Kirkwood, T.B.L. (1985): Comparative and evolutionary aspects of longevity, in *Handbook of the Biology of Aging*, 2nd ed., C.E. Finch and E.L. Schneider, Eds., Van Nostrand, New York, 27-44.

Kirkwood, T.B.L. and Cremer, T. (1982): Cytoogerontology 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress, *Human Genet.*, 60, 101-121.

Kitani, K., Zs.-Nagy, I., Kanai, S., Sato, Y. and Ohta, M. (1988): Correlation between the biliary excretion of ouabain and the lateral mobility of hepatocyte plasma membrane proteins in the rat. The effects of age and spironolacton pretreatment, *Hepatology*, 8, 125-131.

Knight, J.A. (1998): Free Radicals: their history and current status in aging and diseases, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 28, 331-346.

Kopitz, J., Von Reitzenstein, C., Mühl, C., Cantz, M. (1994): Role of plasma membrane ganglioside sialidase of human neuroblastoma cells in growth control and differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199, 1188-1193.

Kopitz, J., von Reitzenstein, C., Sinz, K., Cantz, M. (1996): Selective ganglioside desialylation in the plasma membrane of human neuroblastoma cells, *Glycobiology*, 6, 367-376.

Kopitz, J., Mühl, C., Ehemann, V., Lehmann, C. and Cantz, M. (1997): Effects of cell surface ganglioside sialidase inhibition on growth control and differentiation of human neuroblastoma cells, *Eur. J. Cell. Biol.*, 73, 1-9.

Korr, H., Kurz, C., Seidler, T.O., Sommer, D. and Schmitz, C. (1998): Mitochondrial DNA synthesis studied autoradiographically in various cell types in vivo, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31, 289-298.

Kowald, A. (1999): The mitochondrial theory of aging: do damaged mitochondria accumulate by delayed degradation ?, *Exp., Gerontol.*, 34, 605-612.

Kunze, P. (1933): Die Korpuskeln der Ultrastrahlung in Meereshöhe, *Forsch. Fortschr. Dtsch. Wiss.*, 9, 363-377.

Langenbach, R. and Kennedy, S. (1978): Gangliosides and their cell density dependent changes in control and chemically transformed C3H10T1/2 cells, *Exp. Cell. Res.*, 112, 361-372.

Ledeen, R.W. (1978): Ganglioside structure and distribution: are they localised at the nerve ending ?, *J. Supramol. Struct.*, 8, 1-17.

Ledeen, R.W. (1989): Biosynthesis, metabolism and biological effects of gangliosides, in *Neurobiology of Glycoconjugates*, R.U. Margolis and R.K. Margolis, Eds., Plenum Press, New York, 43-83.

Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuim, P., Coffey, J.W., Fowler, S.D. and DeDuve, C. (1968): The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria and lysosomes from the livers of rat injected with Triton, *J. Cell Biol.*, 37, 482-513.

Lenaz, G. (1998): Role of mitochondria in oxidative stress and ageing, *Biochim. Biophys. Acta*, 1366, 53-67.

Li, X.-M., Juorio, A.V., Qi, J. and Boulton, A. (1998): L-deprenil potentiates NGF-induced changes in superoxide-dismutase mRNA in PC-12 cells, *J. Neurosci. Res.*, 53, 235-238.

Lieser, M., Harms, E., Kern, H., Bach, G. and Cantz, M. (1989): Ganglioside GM3 sialidase activity in fibroblasts of normal individuals and of patients with sialidosis and mucopolipidosis IV, *Biochem. J.*, 260, 69-74.

Lorand, A. (1904): Quelques considerations sur les causes de la senilité, *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 57, 500-507.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

Macieira-Coelho, A. (1990): Implications of the reorganization in the different hierarchical structures during the organism life span, in *Theoretical Basis of Aging Research*, L. Robert and G. Hofecker, Eds., Facultas Universitätsverlag GmbH, Vienna, 99-114.

Maurel, P. and Dousou, P. (1976): Catalytic implications of electrostatic potentials: the lytic activity of lysosyme as a model, *J. Mol. Biol.*, 102, 253-264.

Medvedev, Zh. (1961): Aging of the organism at molecular level, *Usp. Sovr. Biol.*, 51, 299-316.

Mehlhorn, R.J. and Cole, G. (1985): The free radical theory of aging: a critical review, *Adv. Free Rad. Biol. Med.*, 1, 165-223.

Miquel, J. (1998): An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications, *Exp. Gerontol.*, 33, 113-126.

Misra, H.P. and Fridovich, I. (1972): The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones, *J. Biol. Chem.*, 247, 188-192.

Miyagi, T., Konno, K., Sagawa, J. and Tsuiki, S. (1990): Neolastic alterations of membrane associated sialidase of rat liver, *Jpn. J. Cancer. Res.*, 81, 915-919.

Miyagi, T., Hata, K., Hasegawa, A. and Aoyagi, T. (1993): Differential effect of various inhibitors on four types of rat sialidase, *Glycoconjugate J.*, 10, 45-49.

Montesano, L., Carrí, M.T., Mariottini, P., Amaldi, F. and Rotilio, G. (1989): Developmental expression of Cu, Zn superoxide dismutase in *Xenopus*. Constant level of the enzyme in oogenesis and embryogenesis, *Eur. J. Biochem.*, 186, 421-426.

Morley, A. (1998): Somatic mutation and aging, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 854, 20-22.

Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application for proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.*, 65, 55-63.

Muchmore, E.A., Milewski, M., Varki, A. and Diaz, B. (1989): Biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid: the primary site of hydroxylation of N-acetylneuraminic acid is the cytosolic sugar nucleotide pool, *J. Biol. Chem.*, 264, 29216-29223.

Mühl, C. (1992): Gangliosid GM3-Sialidasen menschlicher Neuroblastomzellen der Zelllinie SK-N-MC: Einfluss spezifischer Inhibitoren auf Zellproliferation und Differenzierung. *Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg*, 1992.

Mühl C. (1996): Einfluß der Hemmung der Ganglioside-Sialidase der Zelloberfläche auf Wachstum und Differenzierung kultivierter menschlicher Neuroblastomzellen, *Inaugural-dissertation zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr.sc.hum.) der Medizinischen Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg*, 1996.

Nagy, K. and Zs.-Nagy, I. (1984): Alterations in the molecular weight distribution of proteins in rat brain synaptosomes during aging and centrophenoxine treatment, *Mech. Ageing Dev.*, 28, 171-176.

Nagy, K. and Zs.-Nagy, I. (1987): In vivo iron overload as a membrane damaging factor in synaptosomes of the brain cortex in rats, in *Lipofuscin - 1987: State of the Art*, I. Zs.-Nagy, Ed., Akadémiai Kiadó, Budapest and Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1988, 453-454.

Nagy, K. and Zs.-Nagy, I. (1990): The effects of idebenone on the superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in liver and brain synaptosomal and mitochondrial fractions, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 11, 285-291.

Nagy, K., Zs.-Nagy, V., Bertoni-Freddari, C. and Zs.-Nagy, I. (1983a): Alterations of the synaptosomal membrane microviscosity in the brain cortex of rats during aging and centrophenoxine treatment, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 2, 23-39.

Nagy, K., Simon, P. and Zs.-Nagy, I. (1983b): Spin label studies on synaptosomal membranes of rat brain cortex during aging, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 117, 688-694.

Nagy, K., Floyd, R.A., Simon, P. and Zs.-Nagy, I. (1985): Studies on the effect of iron overload on rat cortex synaptosomal membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 820, 216-222.

Nagy, K., Pásti, G., Bene, L. and Zs.-Nagy, I. (1993): Induction of granulocytic maturation of HL-60 human leukemia cells by free radicals: a hypothesis of cell differentiation involving hydroxyl radicals, *Free Rad. Res. Comm.*, 19,1-15.

Nagy, K., Pásti, G., Bene, L. and Zs.-Nagy, I. (1995): Involvement of Fenton reaction products in differentiation induction of K562 human leukemia cells, *Leukemia Res.*, 19, 203-212.

Naveilhan, P., Neveu, I., Jehan, F., Baudet, C., Wion, D. and Brachet, P. (1994): Reactive oxygen species influence nerve growth factor synthesis in primary rat astrocytes, *J. Neurochem.*, 62,2178-2186.

Olivera, A. and Spiegel, S. (1992): Ganglioside GM1 and sphingolipid breakdown products in cellular proliferation and signal transduction pathways, *Glycoconj. J.*, 19, 110-117.

Olovnikov, A.M. (1971): Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides, *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.*, 201, 1496-1499.

Olovnikov, A.M. (1973): A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon, *J. Theor. Biol.*, 41, 181-190.

Olovnikov, A.M. (1996): Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory, *Exp. Gerontol.*, 31, 443-448.

Orgel, L.E. (1963): The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 49, 517-521.

Orgel, L.E. (1970): The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. A correction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 67, 1476.

Orgel, L.E. (1973): Ageing clones of mammalian cells, *Nature*, 243, 441-445.

Osborne, T.B. and Mendel, L.B. (1915): The resumption of growth after long continued failure to grow, *J. Biol. Chem.*, 23, 439-454.

Oshima, H., Soma, G.-I. and Mizuno, D. (1993): gangliosides can activate human alternative complement pathway, *Int. Immunology*, 5, 1349-1351.

Packer, L. and Fuehr, K. (1977): Low oxygen concentration extends the life span of cultured human diploid cells, *Nature*, 267, 423-425.

Pearl, R. (1928): *The Rate of Living*, Knopf Publishing, New York.

Pieri, C., Zs.-Nagy, I., Zs.-Nagy, V., Giuli, C. and Bertoni-Freddari, C. (1977): Energy dispersive X-ray microanalysis of the electrolytes in biological bulk specimens. II. Age-dependent alterations in the monovalent ion contents of cell nucleus and cytoplasm in rat liver and brain cells, *J. Ultrastruct. Res.*, 59, 320-331.

Pitto, M., Giglioni, A. and Tettamanti, G. (1992): Dual subcellular localisation of sialidase in cultured granule cells differentiated in culture, *Neurochem. Int.*, 21, 367-374.

Platt, D. (1976): *Biologie des Alters*, Quelle et Meyer, Heidelberg.

Pryor, W.A. (1976): *Free Radicals in Biology*, Vol. 1, Academic Press, New York.

Quiroga, S., Panzetta, P. and Caputto, R. (1990): An endogenous inhibitor of N-acetylgalactosaminyltransferase inhibits retina neuron differentiation in culture, *Brain Res.*, 508, 337-340.

Rabin, S.J. and Mocchetti, I. (1995): GM1 ganglioside activates the high-affinity nerve growth factor receptor trk A, *J. Neurochem.*, 65, 347-354.

Reiss, U. and Rothstein, M. (1974): Heat-labile isozymes of isocitrate lyase from aging *Turbatrix acetii*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61, 1012-1015.

Ritchie, J.M. (1973): Energetic aspects of nerve conduction: the relationship between heat production, electrical activity and metabolism, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 26, 149-187.

Rubin, H. (2002): Promise and problems in relating cellular lifespan in vitro to aging in vivo, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 34, 275-286.

Rubner, M. (1908): *Das Problem der Lebensdauer und seine Beziehungen zum Wachstum und Ernährung*, Oldenbourg, Munich.

Russ, S. and Scott, G.M. (1939): Biological effects of gamma irradiation, *Br. J. Radiol.*, 12, 440-441.

Saito, M., Tanaka, Y., Tang, C.-P., Yu, R.K. and Ando, S. (1995): Characterisation of sialidase activity in mouse synaptic membranes and its age-related changes, *J. Neurosci. Res.*, 40, 401-406.

Sampath, D. and Perez-Polo, R. (1997): Regulation of antioxidant enzyme expression by NGF, *Neurochem. Res.*, 22, 351-362.

Sampath, D., Jackson, G.R., Werrbach-Perez, K. and Perez-Polo, J.R. (1994): Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC12 cells. *J. Neurochem.*, 62, 2476-2479.

Sato, K. and Miyagi, T. (1996): Involvement of an endogenous sialidase in skeletal muscle cell differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221, 826-830.

Sauer, H., Rahimi, G., Hescheler, J. and Wartenberg, M. (2000): Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells, *FEBS Lett.*, 476, 218-223.

Schreck, R. and Bauerle, P.A. (1991): A role of oxygen radicals as second messengers, *Trends Cell Biol.*, 1, 39-42.

Seeger, R.C., Rayner, S.A., Banerjee, A., Chung, H., Laug, W.E., Neustein, H.B. and Benedict, W.F. (1977): Morphology, growth, chromosomal pattern, and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines, *Cancer Res.*, 37, 1364-1371.

Selye, H. (1946): The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation, *J. Clin. Endocrinol.*, 6, 117-129.

Semsei, I. (2000): On the nature of aging, *Mech. Ageing Dev.*, 117, 93-108.

Semsei, I., Szeszák, F. and Zs.-Nagy, I. (1982): In vivo studies on the age-dependent decrease of the rates of total and mRNA synthesis in the brain cortex of rats, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 1, 29-42.

Sen, C.K. and Packer, L. (1996): Antioxidant and redox regulation of gene transcription, *FASEB J.*, 10 (7), 709-720.

Shanley, D.P. and Kirkwood, T.B. (2000): Calorie restriction and aging: a life-history analysis, *Evolution Int. J. Org. Evolution*, 54, 740-750.

Shinitzky, M., Ed. (1984): *Physiology of Membrane Fluidity*, Vol. 1, 2, CRC Press, Boca Raton, FL.

Shock, N.W., Watkin, D.M., Yiengst, M.J., Norris, A.H., Gaffney, G.W., Gregerman, R.I. and Falzone, J.A. (1963): Age differences in the water content of the body as related to basal oxygen consumption in males, *J. Gerontol.*, 18, 1-8.

Sidell, N., Lucas, C.A. and Kreutzberg, G.W. (1984): Regulation of acetylcholinesterase activity by retinoic acid in a human neuroblastoma cell line, *Exp. Cell Res.*, 155, 305-309.

Smith, G.M. and Ivy, G.O. (1989): *The protease inhibitor model of aging is valid for retina as well as for brain*, Abstr. 14th Int. Congr. Gerontology, Acapulco, Mexico, 195.

Sohal, R.S. (1985): Aging in insects, in *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 10, G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, Eds., Pergamon Press, Oxford, 595-631.

Sohal, R.S. (1988): Oxidative stress and cellular aging, in *Lipofuscin- 1987: State of the Art*, I. Zs.-Nagy, Ed., Akadémiai Kiadó, Budapest and Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 135-144.

Sohal, R.S. and Allen, R.G. (1985): Relationships between metabolic rate, free radicals, differentiation and aging: a unified theory, in *Molecular Biology of Aging*, A.D. Woodhead, A.D. Blackett and A. Hollaender, Eds., Plenum Publishing, New York, 75-104.

Sohal, R.S. and Allen, R.G. (1990): Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis, *Exp. Gerontol.*, 25, 499-522.

Sohal, R.S. and Orr, W.C. (1995): Is oxidative stress a casual factor in aging, in *Molecular Aspects of Aging*, K. Esser, G.M. Martin, Eds., Chichester: John Wiley and Sons, 109-127.

Sohal, R.S., Toy, P.L. and Allen, R.G. (1986): Relationship between life expectancy, endogenous antioxidants and products of oxygen free radical reactions in the house fly, *Musca domestica*, *Mech. Ageing Dev.*, 36, 71-77.

Somogyi, B. and Damjanovich, S. (1975): Relationship between the lifetime of an ES-complex and the properties of molecular environment, *J. Theor. Biol.*, 514, 393-401.

Stojilkovic, M., Blagojevic, T., Vukasovic, S., Zvezdina, N.D., Pekovic, S., Nikezic, G. and Racic, L. (1996): Ganglioside GM1 and GM3 in early human brain development: an immunocytochemical study, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 14, 35-44.

Straub, F.B., Ed. (1977): *Biológiai lexikon, 3. Kötet*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 70-71.

Strehler, B.L. (1962): *Time, Cells and Aging, 1st ed.*, Academic Press, New York.

Strehler, B.L. (1976): Elements of a unified theory of aging: integration of alternative models, in *Alternstheorien, Zellkern - Membranen*, D. Platt, Ed., Schattauer Verlag, Stuttgart, 5-36.

Strehler, B.L. (1977): *Time, Cells and Aging*, 2nd ed., Academic Press, New York.

Strehler, B.L. and Freeman, M.R. (1980): Randomness, redundancy and repair: role and relevance to biological aging, *Mech. Ageing Dev.*, 14, 15-38.

Strehler, B.L. (1982): Aging: concepts and theories, in *Lectures on Gerontology*, Vol. 1, Part A, A. Viidik, Ed., Academic Press, London, 1-57.

Suzukawa, K., Miura, K., Mitsushita, J., Resau, J., Hirose, K., Crystal, R. and Kamata, T. (2000): Nerve Growth Factor-induced Neuronal Differentiation Requires Generation of Rac1-regulated Reactive Oxygen Species, *J. Biol. Chem.*, 275, 13175-13178.

Szilárd, L. (1959a): A theory of aging, *Nature*, 184, 956-958.

Szilárd, L. (1959b): On the nature of aging process, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 45, 30-40.

Tanka, D. és Keller, M. (1974): *Hisztotechnikai és hisztokémiai laboratóriumi praktikum*, Egészségügyi Minisztérium Középfokú Oktatási Osztálya, Budapest, 78.

Tappel, A.L. (1975): Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes, in *Pathobiology of Cell Membranes*, Vol. 1, B.F. Trump, and A.U. Arstilla, Eds., Academic Press, New York, 145-172.

Tauber, R. and 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. and Shapiro, J.M. (1995): A Rapid and Ultrasensitive Method for Measurement of DNA, Calcium and Protein Content, and Alkaline Phosphatase Activity of Conocyte Cultures, *Calcif. Tissue Int.*, 56, 252-256.

Terry, R. and Gershon, S., Eds. (1976): *Neurobiology of Aging*, Raven Press, New York.

Van Heukelem, W.F. (1978): Aging in lower animals, in *The Biology of Aging*, J.A. Behnke, C.E. Finch and G.B. Moment, Eds., Plenum Press, New York, 115-130.

Verzár, F. (1955): Veränderungen der thermoelastischen Kontraktion der Schenkenfasern im Alter, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 13, C64-C67.

Verzár, F. (1956): Das Altern des Collagens, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 14, 207-220.

- Verzár, F. (1957): The aging of connective tissue, *Gerontologia*, 1, 363-378.
- Verzár, F. (1958): Problems of general biology of aging, *J. Gerontol.*, 13, 6-15.
- Verzár, F. (1963): Differenzierung verschiedener Vernetzungen (crosslinks) des Kollagens, *Z. Physiol. Chem.*, 335, 38-52.
- Verzár, F. (1964): Aging of the collagen fiber, *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, 2, 245-299.
- Verzár, F. (1965): *Experimentelle Gerontologie*, F. Enke Verlag, Stuttgart.
- Walling, C. (1975): Fenton's reagent revisited, *Acc. Chem. Res.*, 8, 125-131.
- Wanagat, J. Allison, D.B. and Weindruch, R. (1999): Caloric intake and aging: mechanisms in rodents and a study in nonhuman primates, *Toxicol. Sci.*, 52, 35-40.
- Weindruch, R. (1996): The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates, *Toxicol. Pathol.*, 24, 742-745.
- Weindruch, R. and Waldorf, R.L. (1988): *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction*, Charles C Thomas, Springfield, IL.
- Weismann, A. (1882): *Über die Dauer des Lebens*, G. Fischer Verlag, Jena.
- West, D.C., Satar, A. and Kumar, S. (1985): A simplified in situ solubilisation procedure for the determination of DNA and cell number in tissue-cultured mammalian cells, *Anal. Biochem.*, 147, 289-295.
- Wolfe, L.S., Gaunthier, S. and Durham, H.D. (1988): Dolichols and phosphorylated dolichols in the neuronal ceroid lipofuscinoses, other lysosomal storage diseases and Alzheimer disease. Induction of autolysosomes in fibroblasts, in *Lipofuscin - 1987: State of the Art*, I. Zs.-Nagy, Ed., Akadémiai Kiadó, Budapest and Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 389-411.
- Wu, G., Lu, Z.-H. and Ledeen, R.W. (1995): Induced and spontaneous neuritogenesis are associated with enhanced expression of ganglioside GM1 in the nuclear membrane, *J. Neurosci.*, 15, 3739-3746.
- Yu, B.P. and Yang, R. (1996): Critical evaluation of free radical theory of aging: A proposal for the oxidative stress hypothesis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 786, 1-11.
- Zeller, C.B. and Marchase, R.B. (1992): Gangliosides as modulators of cell function, *Am. J. Physiol.*, 262, C1341-C1355.

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. (1986): Common mechanisms of cellular aging in brain and liver in the light of the membrane hypothesis of aging, in *Living and Aging - 1986, Liver and Brain*, K. Kitani, Ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 373-387.

Zs.-Nagy, I. (1994): *The Membrane Hypothesis of Aging*, CRC Press, Boca Raton.

Zs.-Nagy, I. (1997): The membrane hypothesis of aging: its relevance to recent progress in the genetic research, *J. Mol. Med.*, 75, 703-714.

Zs.-Nagy, I. and Nagy, K. (1980): On the role of cross-linking of cellular proteins in aging, *Mech. Ageing Dev.*, 14, 245-251.

Zs.-Nagy, I. and 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., Pieri, C., Giuli, C., Bertoni-Freddari, C. and Zs.-Nagy, V. (1977): Energy dispersive X-ray microanalysis of the erythrocytes in biological bulk specimen. I. Specimen preparation, beam penetration and quantitative analysis, *J. Ultrastruct. Res.*, 58, 22-23.

Zs.-Nagy, I., Ohta, M., Kitani, K. and Imahori, K. (1984): An automated method for measuring lateral mobility of proteins in the plasma membrane of cells in compact tissues by means of fluorescence recovery after photobleaching, *Mikroskopie*, 41, 12-25.

Zs.-Nagy, I., Kitani, K., Ohta, M., Zs.-Nagy, V. and Imahori, K. (1986a): Age-dependent decrease of lateral diffusion constant of protein in the plasma membrane of hepatocytes as revealed by fluorescence recovery after photobleaching in tissue smears, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 5, 131-146.

Zs.-Nagy, I., Kitani, K., Ohta, M., Zs.-Nagy, V. and Imahori, K. (1986b): Age-estimations of rats based on the average lateral diffusion constant of hepatocyte membrane proteins as revealed by fluorescence recovery after photobleaching, *Exp. Gerontol.*, 21, 555-563.

Zs.-Nagy, I., Derecskei, B. and Lustyik, Gy. (1987): Age-dependent changes in the osmometric behavior of rat brain and liver, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 6, 339-354.

Zs.-Nagy, I., Cutler, R.G. and Semsei I. (1988): Dysdifferentiation hypothesis of aging and cancer: a comparison with the membrane hypothesis of aging, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 521, 215-225.

Zs.-Nagy, I., Kitani, K. and Ohta, M. (1989): Age dependence of the lateral mobility of proteins in the plasma membrane of hepatocytes in C57BL/6 mice: FRAP studies on liver smears, *J. Gerontol. Biol. Sci.*, 44, B83-B87.

Zs.-Nagy, I., Cutler, R.G., Kitani, K. and Ohta, M. (1993): comparison of the lateral diffusion constant of hepatocyte membrane proteins in two wild mouse strains of considerable different longevity: FRAP studies on liver smears, *J. Gerontol. Biol. Sci.*, 48, B86-B92.

Zs.-Nagy, I., Tanaka, S. and Kitani, K. (1999): Age-dependence of the lateral diffusion coefficient of Concanavalin-A receptors in the plasma membrane of ex vivo prepared brain cortical nerve cells of BN/BiRijHsd rats, *Exp. Brain Res.*, 124, 233-240.

Zsupán, I., Hadházy, Cs., Zs.-Nagy, V., Jeney, F. and 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.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a Debreceni Egyetem Gerontológiai Tanszék minden dolgozójának a dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségéért és támogatásáért:

Prof. Dr. Zs.-Nagy Imre egyetemi tanár úrnak, témavezetőmnek, hogy lehetővé tette számomra munkám kivitelezését és abban mindvégig támogatott, valamint a szakmai segítségéért, tanácsaiért,

Dr. Nagy Katalin tudományos főmunkatársnak, az enzimmérési módszerek megismerésében és a dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségéért, szakmai tanácsaiért,

Dr. Jenei Florence egyetemi tanársegédnek, a sejttenyésztési technikák elsajátításában nyújtott segítségéért, továbbá

Dr. Bazsó-Dombi Enikő, Kovács Erika, Horváth Ferenc és Csigéné Láber Katalin kollégáknak.

Szeretnék köszönetet mondani a Heidelbergi Egyetem Patokémiai és Általános Neurokémiai Intézet vezetőjének és tagjainak:

Prof. Dr. Michael Cantz egyetemi tanár úrnak, hogy lehetővé tette számomra, hogy intézetükben dolgozhassak és munkámat segítette szakmai tanácsaival,

Prof. Dr. Jürgen Kopitz egyetemi tanár úrnak, hogy munkám során hasznos tanácsokkal látott el,

Prof. Dr. Siegfried Hoyer egyetemi tanár úrnak, hogy segített abban, hogy intézetükben dolgozhassak,

Dr. Dorothee Kalka kolléganőnek, aki munkámat mindvégig segítette, továbbá **Dr. Carolina von Reitzenstein, Vera Schuhmann, Antje Hoyer és Evelyn Pülm** kollégáknak.

Szeretnék még köszönetet mondani szűkebb családomnak, hogy munkám során támogattak és lelkesítettek.

10. KÖZLEMÉNYEK ÉS ELŐADÁSOK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. Oravecz, K., Bazsó-Dombi, E., Jeney, F., Nagy, K., Gecse, M., Zs.-Nagy, I. (2001): The involvement of hydroxyl free radicals in differentiation of the PC-12 rat pheochromocytoma cell line. Arch. Gerontol. Geriatr., 33, 61-69. (IF: 0.681)
2. Oravecz, K., Kalka, D., Jeney, F., Cantz, M., Zs.-Nagy, I. (2002): Hydroxyl free radicals induce cell differentiation in SK-N-McC neuroblastoma cells. Tissue and Cell, 34 (1), 33-38. (IF: 0.808)

További közlemények:

3. Szabó, J., Jeney, F., Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Nagy, K., Zs.-Nagy, I. (1999): Szabadgyökök lehetséges szerepe az endocrin ophthalmopathia kialakulásában. Magyar Belorvosi Archivum, 52, 277-280.
4. Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Jeney, F., Nagy, K., Zs.-Nagy, I. (2000): On the useful role of OH[•] free radicals in differentiation of cultured human fibroblasts. Arch. Gerontol., Geriatr. 31, 233-242. (IF: 0.681)
5. Jeney, F., Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Szabó, J., Zs.-Nagy, I. (2000): Cytochemical studies on the fibroblast-preadipocyte relationship in cultured fibroblast cell lines. Acta Histochem., 102, 381-389. (IF: 0.867)

Az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó előadás:

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

További előadások:

7. Bazsó-Dombi, E., Nagy, K., Jeney, F., Oravecz, K., Zs.-Nagy, I. (1998): A Fenton reakció által indukált hidroxil (OH[•]) szabadgyökök hatása a SOD és a kataláz enzimek génexpressziójára a sejt differenciálódás során. Magyar Gerontológiai Társaság 1998. évi kongresszusa, Miskolc-Lillafüred, Palotaszálló, 1998. május 21-23.
8. Jeney, F., Nagy, K., Oravecz, K., Bazsó-Dombi, E., Zs.-Nagy, I. (1998): Az oxigén eredetű szabadgyökök hatása a sejt differenciálódásra – in vitro. Magyar Gerontológiai Társaság 1998. évi kongresszusa, Miskolc-Lillafüred, Palotaszálló, 1998. május 21-23.
9. Jeney, F., Szabó, J., Nagy, K., Oravecz, K., Zs.-Nagy, I. (1997): The effect of OH[•] free radicals deriving from Fenton reaction on the growth characteristics of human retrobulbar fibroblast cultures. AESF Meeting, München, 1997. december 4-6.
10. Jeney, F., Szabó, J., Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Zs.-Nagy, I. (1998): The role of free radicals on the growth characteristics of human retrobulbar fibroblasts from EOP patients and normal individuals. 5. Leipziger Allerlei, Lipcse, 1998. október 1-3.

11. Jeney, F., Szabó, J., Bazsó-Dombi, E., Oravec, K., Zs.-Nagy, I. (1998): VIth International symposium on Graves' Ophthalmopathy, Amszterdam, 1998. november 27-28.