

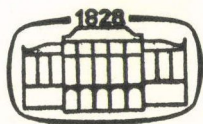
# ORVOSTUDOMÁNY

SZERKESZTI: KNOLL JÓZSEF

27.

KÖTET

## A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA V. ORVOSI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK KÖZLEMÉNYEI



AKADÉMIAI KIADÓ, 1976

1.  
SZÁM

# ORVOSTUDOMÁNY

A Magyar Tudományos Akadémia V. Orvosi Tudományok Osztályának  
Közleményei

A SZERKESZTŐ BIZOTTSÁG TAGJAI:

BABICS ANTAL, ERNST JENŐ, GEGESI KISSPÁL, HAYNAL IMRE,  
KERPEL—FRONIUS ÖDÖN, MISKOLCZY DEZSÓ, ZSEBŐK ZOLTÁN

FŐSZERKESZTŐ

KNOLL JÓZSEF

TECHNIKAI SZERKESZTŐ

KNOLL BERTA

SZERKESZTŐSÉG: 1085 BUDAPEST, ÜLLŐI ÚT 26.

KIADÓHIVATAL: 1363 BUDAPEST, ALKOTMÁNY UTCA 21.

*Az Orvostudomány* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Négy füzet alkot egy kötetet. Évenként általában egy kötet jelenik meg.

*Az Orvostudományban* az Osztály rendezvényein elhangzott előadások, az Osztály tagjainak eredeti vagy összefoglaló közleményei, továbbá az MTA saját intézeteinek közleményei jelennek meg. Kéziratok a következő címre küldendők:

*Orvostudomány*

1085 Budapest VIII., Üllői út 26.

A közlésre el nem fogadott kéziratokat a szerkesztőség lehetőleg visszajuttatja a szerzőhöz, de felelősséget a beküldött kéziratok megőrzéséért vagy továbbításáért nem vállal.

*Az Orvostudomány* előfizetési ára kötetenként 60 forint. Megrendelhető belföldre az Akadémiai Kiadónál (1361 Budapest Alkotmány u. 21. Pénzforgalmi jelzőszámunk 215—11488.), külföldre a „KULTÚRA” Könyv és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (1389 Budapest Postafiók 149. Pénzforgalmi jelzőszám: 218-10990 sz.) vagy annak külföldi képviselőinél és bizományosainál.

A Magyar Tudományos Akadémia V. Orvosi Tudományok Osztálya a következő idegen nyelvű folyóiratokat adja ki:

1. *Acta Chirurgica,*
2. *Acta Medica,*
3. *Acta Microbiologica,*
4. *Acta Morphologica,*
5. *Acta Paediatrica,*
6. *Acta Physiologica.*

E lapok hivatottak a magyar orvostudományok eredményeinek legjavát a külfölddel megismertetni.

A cikkek orosz, német, angol vagy francia nyelven jelennek meg a szerző kívánsága szerint, összefoglaló pedig további egy, ill. két nyelven. A dolgozatot magyar vagy a megfelelő idegen nyelven a következő címre kell beküldeni:

*Acta Chirurgica* szerkesztősége, 1082 Budapest VIII., Üllői út 78/b.

*Acta Medica* szerkesztősége, 1083 Budapest VIII., Szigony u. 43.

*Acta Microbiologica* szerkesztősége, Országos Közegészségügyi Intézet, 1097 Budapest IX., Gyáli út 4.

*Acta Morphologica* szerkesztősége, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, 1091 Budapest IX., Üllői út 93.

*Acta Paediatrica* szerkesztősége, 1083 Budapest VIII., Bókay J. u. 53.

*Acta Physiologica* szerkesztősége, 7642 Pécs, Rákóczi u. 80. Élettani Intézet.

# ORVOSTUDOMÁNY

A Magyar Tudományos Akadémia V. Orvosi Tudományok  
Osztályának Közleményei

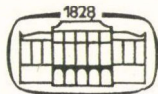
A Szerkesztő Bizottság tagjai:

Babics Antal, Ernst Jenő, Gegesi Kiss Pál, Haynal Imre,  
Kerpel-Fronius Ödön, Miskolczy Dezső, Zsebők Zoltán

Főszerkesztő:

Knoll József

27. kötet



AKADÉMIAI KIADÓ

Budapest, 1976



## ORVOSTUDOMÁNY

### 27-es kötet tartalomjegyzéke

<i>Jellinek Harry</i> : Megemlékezés Haranghy Lászlóról .....	3
<i>Gegesi Kiss Pál</i> : Az orvostudományi egyetemek önállósága kialakításának célja .....	7
<i>Stark Ervin</i> : Az adrenocorticotroph hormon (ACTH) elválasztást szabályozó mechanizmusok .....	17
<i>Ferencz Géza, Szende Béla, Lapis Károly és Podmaniczky Erzsébet</i> : Scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok kezeletlen és 20-methylcholanthrennel in vitro malignusan transformált egér embrio fibroblas sejtek tenyészetein .....	37
<i>Podmaniczky Erzsébet, Szende Béla, Lapis Károly és Ferencz Géza</i> : MC-29 vírussal fertőzött csirke-embryo fibroblast (CEC) kultúrákban megfigyelhető sajátos sejtfelszíni változások .....	41
<i>Tóth Miklós, Zakár Tamás és Antoni Ferenc</i> : A tesztoszteron 19. metil csoportjának jelentősége az androgén hatás biokémiai mechanizmusában. ....	45
<i>Knoll Berta</i> : Krónikus para-brom-metamfetamin (V-111) kezelés hatása patkányok tanulási és memóriatároló képességére .....	59
<i>Kovalszky Ilona, Jeney András, Asbót Richard és Lapis Károly</i> : Az MC-29 vírus által okozott májrákból kialakított transzplantálható hepatoma biokémiai vizsgálata. I. A csirke-máj és a hepatoma DNS, RNS, fehérje és foszfolipid tartalmának összehasonlítása .....	71
<i>Kovalszky Ilona, Jeney András, Asbót Richard és Lapis Károly</i> : Az MC-29 vírus által okozott májrákból kialakított transzplantálható hepatoma biokémiai vizsgálata. II. Összehasonlító enzimindukciós vizsgálatok a hepatoma és májszövetben .....	79
<i>Kesztyűs Loránd</i> : Az immunválasz kórokozó következményei .....	87
<i>Petrányi Gyula</i> : Az immunológiai kutatások módszertana és az immunológia mint kutató módszer .....	103
<i>Jeney András, Dzurillay Éva, Kopper László és Lapis Károly</i> : Daganatos sejtpopuláció növekedésének tanulmányozása II. Magi fehérjék vizsgálata gyorsan és lassan proliferáló NK/Ly ascites tumor sejtpopulációiban .....	115
<i>Kopper László, Jeney András és Lapis Károly</i> : Daganatos sejtpopuláció növekedésének tanulmányozása. III. Kemoterápiás szerek hatásának vizsgálata eltérő növekedési ütemű NK/Ly ascites tumoron .....	131
<i>Lapis Károly, Jeney András, Tyihák Ernő, Kopper László, Szarvas Tibor, Bursics László, Újhelyi Eszter és Szende Béla</i> : N-E- <sup>3</sup> H-trimetil-1-lizin felvételének vizsgálata NK/Ly ascites tumoros egerek szerveiben .....	147
<i>Petrányi Gyula</i> : Emberen yézzett tudományos kutatás etikája .....	161
<i>Rosivall László, Fazekas Árpád, Pösch Elek, Szabó György és Hársing László</i> : A vesevéráramlás és a véráramlás intrarenalis megoszlása kutyában normális körülmények között és uréter elzárás alatt .....	174
<i>Varga Bertalan, Ungváry György és Folly Gábor</i> : Proszttaglandinok és a petefészek véráramlása kutyában .....	185
<i>Gergely János</i> : Az immunológiai specificitás problémái .....	195
<i>Lapis Károly, Ferencz Géza, Szende Béla, Kovalszky Ilona és Jeney András</i> : In vitro karcinogenezis vizsgálatok egér fibroblaszt sejteken .....	205
<i>Nász István, Lengyel Anna, Ádám Éva és Medveczky Péter</i> : Az adenovírusok penton antigénjének vizsgálata .....	219
<i>Bencsáth Márta, Schaff Zsuzsa és Lapis Károly</i> : Unduláló membranózus szerkezetek citokémiai vizsgálata .....	237
<i>Burnet Frank Macfarlane</i> : T-sejt receptorok .....	243
<i>Burnet Frank Macfarlane</i> : A szomatikus sejt genetikai hibái és kapcsolataik az immunpatológiával és öregedéssel .....	251
<i>Knoll József, Hársing László Gábor és Friedmann Tamás</i> : A 3-éter-6-azidomorfinok farmakológiája. Az azidoetilmorfin, egy új köhögéscsillapító szelektálása .....	263



# ORVOSTUDOMÁNY

A Magyar Tudományos Akadémia V. Orvosi Tudományok  
Osztályának Közleményei

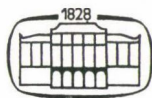
A Szerkesztő Bizottság tagjai:

Babics Antal, Ernst Jenő, Gegesi Kiss Pál, Haynal Imre,  
Kerpel-Fronius Ödön, Miskolczy Dezső, Zsebők Zoltán

Főszerkesztő:

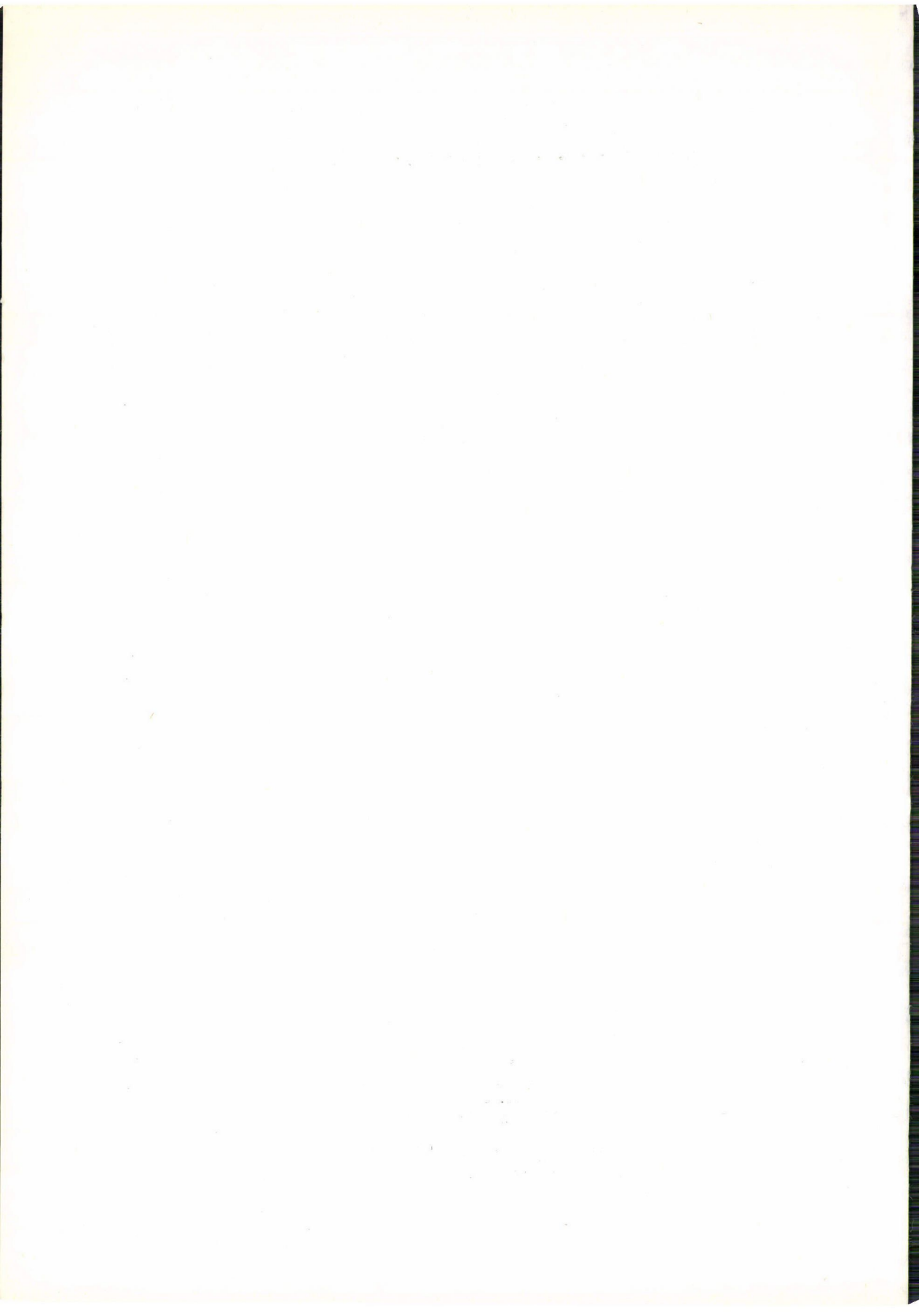
Knoll József

27. kötet



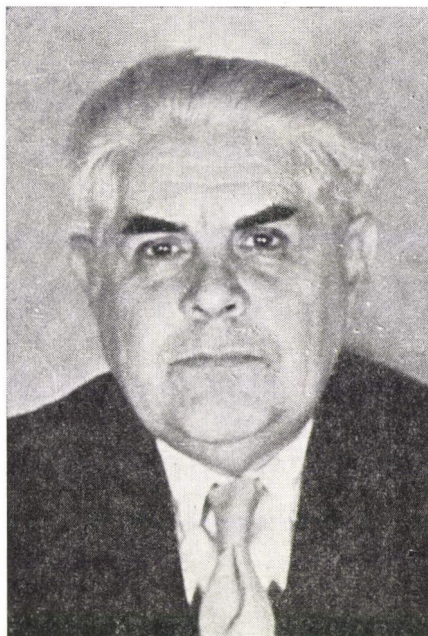
AKADÉMIAI KIADÓ

Budapest, 1976





DR. HARANGHY LÁSZLÓ  
(1897—1975)



1975. december 8.-án tragikus körülmények között eltávozott közülünk dr. Haranghy László akadémikus, a II. sz. Kórbonctani Intézet nyugalmazott professzora. Fájdalmasan emlékezünk Haranghy Lászlóra, a volt vezetőre, a munkatársra, a tanítómesterre. Távozása nagy veszteség nemcsak szűkebb szakterületének, a pathológiának, de sokirányú érdeklődése miatt az egész magyar orvostudománynak.

Dr. Haranghy László Debrecenben született 1897-ben. Orvosdoktorrá avatása után előbb a Debreceni Egyetem Kórbonctani és Igazságügyi Orvostani Intézetében volt tanársegéd, majd 1923 októbere óta a bajai kórház kórboncnok főorvosa. 1932-ben a Pécsi Orvostudományi Egyetemen magántanári képesítést szerzett, 5 évvel később címzetes rendkívüli tanárnak nevezték ki. 1940-ben a Kolozsvári Orvostudományi Egyetemen a kórbonctan és az igazságügyi orvostan tanára lett, s az egyetem Marosvásárhelyre való áthelyezése után itt működött ugyanebben a minőségben 1952-ig, amikor is a Budapesti Orvostudományi Egyetem II. sz. Kórbonctani Intézetének professzorává nevezték ki. Egyidejűleg három évig a Budapesti Orvostudományi Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetének tanári teendőit is ellátta. Munkásságának eredményeként alakult meg a Budapesti Gerontológiai Kutató Intézet. Több

alkalommal dolgozott a Tihanyi Biológiai Intézetben, a Nápolyi Zoológiai Intézetben és a Helgolandi Tengerbiológiai Intézetben. Több ízben tanulmányúton volt Ausztriában, Németországban, Olaszországban és Svájcban. Nemzetközi kongresszusokon vett részt Ausztriában, Csehszlovákiában, Dániában, Franciaországban, a Német Szövetségi Köztársaságban, Olaszországban, Romániában, Svájcban és Svédországban. 1948-ban lett tagja a Magyar Tudományos Akadémiának.

Tudományos munkássága sokirányú, szerteágazó. Pályája kezdetén foglalkozott a tuberculosis kérdésével, a diphteria problémájával, a Hans—Schüller—Christian-kór leírásával annak szervi megjelenésével, ami világirodalmi hírnevet szerzett számára. A RES területén végzett vizsgálatait ugyancsak nemzetközi elismerésben részesültek. A melani daganatkeltő hatását vizsgálta tengerimalacokban. A Deals tengerimalac hazai meghonosítása nevéhez fűződik. E tumorban, melyet sugárzó anyaggal indukáltak, vírusszerű testeket sikerült elektronmikroszkóppal kimutatnia. Évekig foglalkozott a lymphogranulomatosis témakörével és a 4 évtizeddel ezelőtt megjelent monográfiája ma is hiteles és mondhatnánk változatlan adatokat tartalmaz. Az utóbbi 15 évben figyelme egy új tudományág felé fordult. Megfigyelte, hogy a hazánkban leküzdött tuberculosis öreg egyénekben gyakrabban lép fel, mint azelőtt. Ezek a megfigyelések az öregkori tuberculosis közleményétől kezdődően a gerontológiai tudományág megalapozásához vezettek, melynek hazánkban megalapítója, úttörője volt abban az időben, amikor nemzetközi szinten is e tudományág még csak gyermekecipőben járt. A gerontológiai kutatások központi kérdésévé váltak, kliniko-pathológiai szemléletét e tudományágban is érvényesítette és a Gerontológiai Kutató Intézet létrehozása — mint e témakör kicsúcsosodása — is bizonyította az új tudományág létjogosultságát.

Munkássága igen sokoldalú volt. Amióta Magyarországra visszatért különböző akadémiai bizottságok elnökeként, vezetőségi tagjaként tevékenykedett, ugyancsak aktívan résztvett az Orvosegyetem Bizottságainak munkájában, valamint több hazai szakfolyóirat szerkesztőbizottságában dolgozott.

Kiterjedt tudományos érdeklődését, annak intenzitását széleskörű irodalmi tevékenysége, több mint 178 dolgozat, monográfiák bizonyítják. Tudományos munkái a magyar nyelven kívül németül, angolul, olaszul és románul is napvilágot láttak. Széles körű tevékenységét számos hazai és külföldi elismerés értékelte, mint tudományága képviselője nemzetközi társaságok elnökségi, vezetőségi és levelező tagjaként fejtett ki hasznos és értékes munkát.

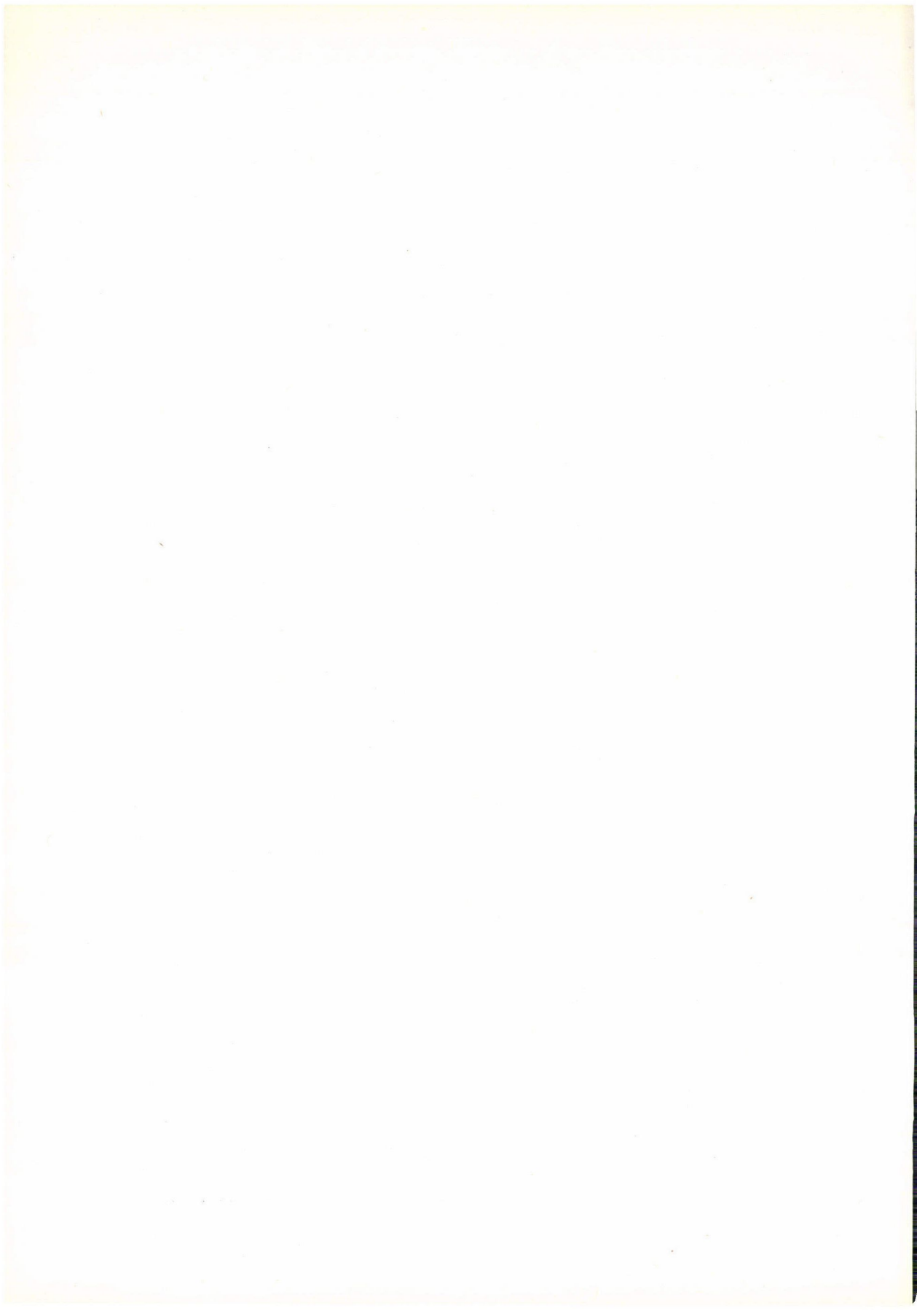
Haranghy László nemcsak kiváló tudós, de kitűnő oktató is volt. Mélységesen szerette a hallgatókat és nagyon szeretett oktatni. A tantermi előadásokat úgyszólván mindig maga tartotta; alaposan felkészülve, mégis kissé idegesen ment az órákra, feszült lelkesedést víve magával, amely átragadt a hallgatókra is. Nemcsak a tantermi előadások, de a gyakorlatok szintjét is rend-

szeresen ellenőrizte és megkövetelte az aktív, modern kórbonctani oktatást. Oktatására a kliniko-pathológiai szemlélet volt jellemző, melynek megfelelően írt könyve az ilyen jellegű első magyar nyelvű könyvnek tekinthető. Ez a részletes, nemcsak orvostanhallgatóknak és kórboncnokoknak, hanem általában orvosoknak szóló munka több mint 40 év tapasztalatait és számos önálló vizsgálatát foglalja magába és ennek rövidített formája „A kórbonctan elemei” címmel tankönyv formájában is megjelent.

Intézeti munkájának egyik fontos tényezője volt a kliniko-pathológiai konferenciák szervezése, ezek hazai terjesztésének lelkes hirdetője volt; az ő aktivitásának köszönhetően terjedtek el hazánkban és érték el a mai szintet ezek a fontos megbeszélések.

Haranghy professzor hosszú élete pályáját az első világháború forgatagában kezdte, nehéz körülmények között végezvén el az egyetemet. Ezt követően indult egyetemi pályafutása, azonban örökké belső nyugtalansággal hajtotta igazságkereső természete. Ez volt az oka annak is, hogy feletteseivel gyakran ellentétbe kerülve, kénytelen volt több munkahelyét elhagyni. Kolozsvári, majd marosvásárhelyi évei alatt külön nehézséget jelentett számára a sok kisebbségi probléma, ezekkel való küzdelmében elsődleges szempontja volt mindig a hazai érdekek képviselése. Élete folyamán sok fájdalom, sérelem érte, ennek ellenére töretlen energiával dolgozott, alkotott. Lelkes és céltudatosan átgondolt tudományos eredményei, a fiatalsággal való örömteli foglalkozás, oktatómunkájának magas színvonala, munkatársainak irányítása és azok eredményei jelentették számára az örömet. És örömet jelentett számára a zene, az elmélyült olvasás, a szép iránti fogékonyság. Széles látókörű, nagyműveltségű ember is volt, nemcsak elismert tudós, kiváló pedagógus, akinek távozása nagy veszteség mindnyájunk számára, akik ismertük, nagyrabecsültük. Nemcsak a magyar pathológusok, de az egész magyar orvostudomány művelői is fájdalommal őrzik emlékét.

*Jellinek Harry*



## AZ ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEMEK ÖNÁLLÓSÁGA KIALAKÍTÁSÁNAK CÉLJA

GEGESI KISS PÁL  
akadémikus

Közlésre érkezett: 1976. II. 27.

Egy ilyen nagyméretű szervezettséget, helyesebben kifejezve egy ilyen hatalmas, állandó mozgásban levő bonyolult élő szerveződöttséget, mint amilyen a budapesti Semmelweis Orvostudományi Egyetem, a maga egészében áttekinteni még egy bizonyos adott pillanatra vonatkoztatva is aligha lehetséges. Még megoldhatatlanabb egy negyedszázad folyamatainak összefüggéseit átfogni. Ez ünnepi órában nem is tekinthetem feladatommak a tárgyi jellegű eseményekkel, folyamatokkal való foglalkozást, hanem az egyetem azon összefüggéseit próbálom felidézni, amelyek ezt a szerveződöttséget az ország szellemi életének egyik fellegvárává tették és teszik. Gondolják csak el ezen az egyetemen évről-évre több ezer kialakulóban levő tanuló ifjú és a velük foglalkozó több ezer különböző felkészültségű, fejlettségű, tehetségű oktató él, dolgozik, tanul, tanít, nevelődik és nevel, igyekszik önmagát minél teljesebben kialakítani, készségeit, képességeit érvényesíteni. Az egyetem 25 éve — amit most ünneplünk — szervesen illeszkedik be az országnak a felszabadulás óta eltelt 30 évébe. E 30 évben az ország egésze felmérhetetlen erőfeszítéseket tett, hogy olyan társadalmat, olyan államhatalmat, igazgatási hálózatot, termelő és fogyasztó gazdasági egységet hozzon létre, ami biztosítja a fejlett szocialista társadalom felépítését. Az egyetem élve az ország által nyújtott lehetőséggel e 25 év alatt annyi új orvost képezett, akik a ma dolgozó több mint 20 000 orvosnak legalább felét teszik. Vagyis több mint 10 000 új orvos beállítódása, gondolkodásának rendszere, magatartása, viselkedése mechanizmusának alapsémái itt ezen az egyetemen alakultak ki. Ezen orvosok az országban fontos szerepet töltenek be, úgyszólván átszövik az országot és komoly hatást gyakorolnak az emberekre. Hatásuk két irányban is érvényesül. Egyrészt szakmai munkájukkal a mindennapi gyakorlatban érvényesítik azokat a tanultakat, amiket az egyetemen mint korszerű egészségügyi tevékenységet elsajátítottak. Másrészt orvosi munkájuk közben emberi kapcsolataikkal hatnak az emberek gondolkodására. Átadják pacienseik közbejöttével az embereknek, a családoknak azt a szellemiséget, azt a gondolkodási módot, azt az emberi

\* A Semmelweis Orvostudományi Egyetem önállóvá válásának 25. évfordulóján, 1976. február 25-én tartott előadás nyomán.

magatartási és viselkedési csménynt is, amit az egyetemi éveik alatt alakítottak ki magukban.

Ekként az egyetem elmúlt 25 éve eredményeket hozott önmagára az egyetemre vonatkozóan és eredményeket hozott az ország egészére vonatkozóan. Arra kellene most törekednem e 25 évre visszaemlékezve, hogy objektíve kövessem az egyetem e 25 évének történelmét. Bármennyire is igyekszem azonban, magamnak is tudomásul kellennem, és kérem tisztelt hallgatóimat is, vegyék mindnyájan figyelembe, hogy minden emberi emlékezés telítve van szubjektív elemekkel. Nem lehet ez másként, hiszen minden emlékezéskor ember emlékezik a sajátos lénye egészével. Van-e hát történelmi hűsége az emlékezésnek? Azt gondolom, hogy csak az ilyen emlékezésnek van igazi történelmi hűsége. Az egykori időket átélt ember ma is élön újra éli egykori életét együtt az akkori és a mai világgal, és ez az együttélés, együttérzés adja az elmondandók igazi történelmi hűségét. Az ekként emlékező emberi szubjektum a múlt, a jelen és a jövő egységét képviseli mondanivalóiban. Ebben az emlékezésben a jelen a híd a múlt és a jövő között, a múlt eredményeinek értékelése a jelen és a jövő szempontjából történik. A múlt tapasztalatainak birtokában lehet felmérni a jelenben a jövőre vonatkozó elképzelések megvalósíthatóságát.

A 25 év előtti 1950/51-ik tanév az önállóvá vált egyetem első éve. Akkor már 5 év telt el 1945 óta. Kemény munkával eltelt 5 esztendő volt ez. E munka rakta le az alapjait az immáron új önálló egyetem kialakítása lehetőségének.

Milyen egyetemet képzeltünk el akkor?

Az egyetemről való elképzeléseinket meghatározta az egészségügyről kialakult véleményünk. Úgy véltük, a korszerű egészségügy négyes tagolású legyen. Ennek megfelelően foglalkozzon: 1. az aktív egészségvédelemmel, az egyén és a közösség egészségvédelmével, 2. a bajok, a betegségek megelőzésével, a specifikus és a nonspecifikus prophylaxissal, 3. a már megbetegedettek gyógyításával, az esetleges járványok leküzdésével, és pedig korai aktív radikális therapiával, és végül, de nem utolsó sorban 4. foglalkozzon a betegség akut szakaszának lezajlása után a szélesen értelmezett rehabilitációval, az embernek a baj, a betegség keletkezése előtti életélés állapotába való visszahozásával.

Az egészségügyet az emberrel közvetlenül foglalkozó olyan tevékenységnek tekintettük, amely tevékenység—összesség feladatának tekinti: *a)* az ember testi szervezetével, *b)* az ember pszichikumával és *c)* a kettő egységével az emberi személyiség problémáival való törődést.

Világos volt az is, hogy az éppen most mondottak szerint értelmezett egészségügyi tevékenységet csak úgy lehet eredményesen végezni, ha ez a tevékenység két hatalmas pilléren nyugszik: 1. az állami egységes egészségügyi szakszolgálaton, és 2. a széles társadalmi jellegű tevékenységrendszeren. Az állami egészségügyi szakszolgálatot az állami egészségügyi intézményekben,

ill. szerveztekben orvosok, szakképzett egészségügyi közép-káderek végzik, a társadalmi jellegű tevékenységet pedig úgyszólván minden ember, minden család, akiket — tehát a „laikusokat” — a Vöröskereszt szervezetei készítik fel a feladatok megoldására. Hogyan is tudnák a jószándékú „laikusok”, a vöröskeresztesek tevékenysége nélkül a közel 3 millió magyar család mindenikéhez eredményesen eljuttatni a szakszolgálat az egészségügyi tudnivalókat, és hogyan is lehetne e „laikusok” segítségével el is fogadtatni és a mindennapok életében módszeresen cselekvően alkalmazni az orvostudományok által elméletileg kidolgozott tennivalókat.

Mi alakította ki az egészségügyről ezt a szemléletünket már az önálló egyetem megalakításának idejére? Az a sok-sok mindennapi tapasztalat, amit az egyetem önállóvá alakítását megelőző közel 30 éves orvosi gyakorló és kutató munka folyamán szereztem. Meggyőződéssé vált bennem, hogy az orvosnak nemcsak az ember szerveivel, szervrendszereivel kell foglalkozni, nemcsak a betegségekkel, a betegségi állapotokkal, a betegségi folyamatokkal, hanem az egészséggel, az egészségi állapotokkal, az egészségi folyamatokkal is. Fontos ez, hiszen minden betegségi folyamat, betegségi állapot egészségfolyamatból, egészségállapotból alakul ki, és minden betegségi folyamatot egészségállapotba, egészségfolyamatba igyekszünk visszajuttatni. Ez mindenekelőtt azt jelenti, hogy az egészségre vonatkozó ismereteket nemcsak azokhoz kell eljuttatni, akik valamilyen formában már betegek, hanem el kell juttatni mind a hárommillió magyar családnak és a családtagokhoz. Azért helyes ez a felismerés, mert lényegében az emberi élet a családokon alapszik. Mindenki minden nap a családból indul napi útjára és este valamilyen családhoz jut vissza megpihenni. Eredmény eléréséhez a családban kell tehát elültetni az alapvető egészségi ismereteket. Ezt az orvosok segítségével hazánkban a több mint 10 000 Vöröskereszt-szervezet tudja elvégezni.

Másrészt a mindennapi gyakorlat rávezetett annak a felismerésére is, hogy az ember és környezete, és pedig az egybeszövődő természeti és társadalmi környezete funkcionális egységet képeznek mind egészségállapotban, mind betegségekben. Nem szabad tehát az embert sem egészséges állapotában, sem betegségében az életfolyamata egészéből, a környezetéből kiszakítva, attól elkülönítve szemlélni, mert ekként eljárva sem a bajba jutotton, a betegnek nem lehet eredményesen segíteni, sem a baj, a betegség keletkezését nem lehet megelőzni. Az emberi test szervei: a tüdő, a szív, az erek, az agy, az idegek, a máj, a gyomor, a belek, a szem, a fül, a torok, a száj, a vesék, a húgyutak, az izom, a csont- és izületrendszer csak a könyvekben és a boncasztalon léteznek külön-külön. A gyógyító orvos mindig az emberrel, az ember egységes egészével, az emberi személyiséggel kell foglalkozzon. Az orvos az egyes szervek, szervrendszerek működését az emberi közösségekben élő, dolgozó, alkotó, érző, gondolkodó, másik emberrel, családjával, gyermekével, szüleivel, barátjaival, munkatársaival, tanítómestereivel és tanítványaival együtt élő egyéni

individuumokban, mint sejtjei, szövetei, szervei summatio feletti egységében kell szemlélje.

Az egészségügy azért nagyon bonyolult, mert az ember és környezete, különösen társadalmi környezete ugyancsak nagyon bonyolult. Sőt azt mondhatjuk, hogy az ember bonyolultsága alig tekinthető át.

Mivel a mai történelmi szakaszban az ember az ontogenezis folyamán biológiai és társadalmi hatások egybeszővődő érvényesülése közben érik és fejlődik, az orvos figyelembe kell vegye mind a biológiai, mind a társadalmi tényezőket. Figyelembe kell vegye ezek egymásra hatását és az egybeszedődött természeti és társadalmi hatásoknak az emberre érvényesülését a magzati élettől kezdve a megszületésen át a csecsemő-, a gyermek-, az ifjú-, a felnőtt-, az öregedő és az öreg életkorszakokban egyaránt, ha e korok egészségállapottával és betegség folyamataival eredményesen akar foglalkozni.

A magzati és az újszülött életszakban levő egyed úgyszólván tisztán biológiai jellegű lény. Ebben az életszakban az érvényesülő környezeti hatások — a kedvezők és az ártók egyaránt — tisztán természeti jellegű hatások. Ilyen hatásokra halad előre a testi szervezet érése kedvezően vagy kedvezőtlenül a filogenezisben beprogramozódottak törvényszerűségeit követve. A csecsemőkortól kezdve viszont az ontogenezis előrehaladásával mind jelentősebb és jelentősebb a szerepe mind az érésben, mind a fejlődésben a társadalmi jellegű környezeti hatásoknak, és pedig mind a pozitív mind a negatív jellegűeknek.

A felnőtt emberréválás útján az eredményes egészségügyi tevékenységben emiatt nemcsak a klasszikusan értelmezett orvosi ismeretekre van szükség, hanem ezek mellett elengedhetetlen bizonyos társadalmi tudományok — elsősorban a pszichológia, a pedagógia, a szociológia — orvostudományi szempontból való ismerete is. Elengedhetetlen ez, mert a csecsemőkorszaktól kezdődve mind az egészségállapot, mind a betegségi folyamatok és állapotok milyensége egyaránt függ szomatiko-pszichés és psycho-szomatikus mozgásirányú egészséges és kóros hatásoktól. A pszichikum pedig döntően a társadalmi hatások feldolgozása folyamán alakul ki.

Azt kell mondanunk, hogy a mai korszerű orvosi gondolkodás hármás rendeződöttségű beállítódás egységén kell nyugodjon. Egyrészt az orvosi gondolkodásnak biológiai kiindulásának kell lennie. Számításba kell venni, hogy a ma létező egyed ember is a létezés életfolyamatának szerves, kiszakíthatatlan része. Szükséges tehát, hogy az orvos az egyedet ne a biológiai folyamatból kiszakítva szemlélje, hanem mindig vegye számításba mintegy a filogenezisben kialakult törvényszerűségeket, a humangenetikát: az öröklési, a veleszületett tényezőket. Az ember egyed ma is olyan valami, aki az ősök által évmilliókon át kialakított, megszerzett morfológiai és fiziológiai tulajdonságokat, képességeket, készségeket, adottságokat bizonyos fokig és bizonyos formában veleszületetten magával hozza az egyedi életéhez. Az lehet, hogy a



veleszületetten magával hozottak nem közvetlenül a megszületés után, hanem valamelyik későbbi életszakban manifesztálódnak, de ez a lényegen nem változtat.

Ez a biológiai tényező azonban csak az egyik olyan összetevő, amit az orvosnak számításba kell venni. A második az a ténycsoport, hogy a ma élő ember csak társadalmi jellegű környezettel funkcionálisan szoros egységet alkotva tud egyéni életében kibontakozni. Az egyén csak ekként, társadalmi létezés-formában tudja az adott lehetőségein belül önmagát megvalósítani, megfogalmazni. A mai ember életét ugyanis — éspedig mind testi-szervezeti, mind psychés életét — megszületésétől kezdve folyamatosan társadalmi jellegű környezet, ilyen vagy olyan emberi közösség alakítja. Külső társadalmi hatásra épül be, felnőtt közösség építi be tudatosan és nem tudatosan, akarva és nem akarva az új egyén idegrendszere működésébe azokat a programokat, azt az életcélt, azt az értékelő rendszert, azt a világ modellt, azt az „élet értelme” modellt, amelyek később élete folyamatát mintegy a kibernetika törvényszerűségei szerint vezérlik. Ekként ilyen vagy olyan mértékben minden ember „társadalmi emberré” válik. A külvilágból és a saját belvilágából őt ért ingerekre olyan választ ad, ami a társadalom által már korábban „elfogadott” formájú és tartalmú, vagyis általános társadalmi „megegyezéses”, konvencionális.

Félreértések elkerülése végett röviden megemlítem, hogy az éppen most szóban levő emberi közösség az egyedi élet kezdet kezdetén csak az egyénből saját magából és az anyából (a gondozóból) áll. A környezet, mint hatástényező csak az egyedi élet későbbi szakaszában bővül. Fokozatosan kezd eredményesen hatni mint környezet a család egésze, az anya mellett a többi családtagok, majd még későbbben a családon kívüli közösségek, mint környezethatások: a bölcsőde, a napközi, az óvoda, az iskola, majd a felnőtté válásban a munkahely. Mind e helyeken az ingerforrások: a saját kortársak és az idősebbek: a felnőttek. Mindezekkel egybe szövődve az élet bizonyos szaka után érvényesül, mint környezethatás a mindennapi társadalmi élet: az utca, a játszótérek, a közlekedés, a kereskedelem, az üdülési, a kultúrálódási, a hírközlési, a szórakozási helyek mindennapi életének hatástényezői. Bár lényegében a család maga is formájában és élete tartalmában egyaránt függvénye a társadalom milyenségének, mégis a fiatal egyed szubjektuma számára jogosan különítjük el mint hatástényezőket: a családot és a családon kívüli társadalmat.

Az említett környezetek, emberi és tárgyi közösségek, szerveződöttségek a legfiatalabb életkortól kezdve folyamatosan közvetlenül vagy közvetve hatnak az egyedre. E környezetek létezéséből fakadó jelenségek, mint „ingerek” az egyed idegrendszerét, szervezetét ingerületbe-izgalomba hozzák. A szervezet egésze működésének rendszere, ezzel együtt a psychikumát is magában foglaló személyisége az ekként keletkezett ingerületeknek, izgalmaknak belső és külső egyéni feldolgozása nyomán szerveződik. Ekként válik

függvényévé az egyén szervezeti működésének rendszere, valamint személyisége a környezeti, a társadalmi folyamatos ráhatásoknak.

Az orvosi gondolkodásban az eredményes tevékenységet segítő harmadik rendeződöttség abból adódik, hogy a mondottakon túl a mai ember, a szóban levő egyed az általános emberin belül egy bizonyos csupán egyetlen egyszer létező, mindenki mástól eltérő, a közösségben élve is elkülönült különös egyiség, különös individuum is. Egyéni élete történelmi egyediségéből kifolyólag csupán őt jellemző egy bizonyos összefüggésű szubjektív emléktanyag, a jeleknek — túl az általánosan elfogadott konvencionális jelentésén — „a nekem jó” és „a nekem rossz” törvényszerűségei szerint különös egyedi jelentés rendszere van beépülve az idegrendszerébe, a szervezetébe, a psychikumába, a személyisége egészébe. Ez az egyéni szubjektív emléktanyag, a sajátos emlékvilág, sajátos egyéni jelentésrendszer részben mint statikum, részben mint dinamizmus a szélesen értelmezett emlékező működés közbejöttével befolyásolja az egyént a mindennapok életének élésében. Az orvosi tevékenységben ez az individualitás, ez a szubjektív létezési összefüggés mind a szervezeti működési rendszer, mind a psychikum, mind a személyiség egésze megnyilvánulásainak szempontjából csak egyéneként és egyénien közelíthető meg.

Ezt a szubjektív egyéni emlékvilágot, emléktanyagot, emlékező működést tágabb értelemben kell felfogni, mint ahogyan általában szokták. Az emberi emlékvilágban nemcsak verbalizáltan intellektuális szféráról van szó. Szükséges — ha csak egészen vázlatosan is — érinteni az emlékvilág struktúráját.

Az egyéni emlékvilágnak, emléktanyagának egyik részét, a statikai jellegű részt az egyedi élet folyamán a testi-szervezet morfológiás jellegű struktúrájára ható tényezők hozzák létre. Ilyen szempontból nézve statikai, morfológiai jellegű „emléktanyagok” pl. mindazok a hegek, mindazok a végleg megmaradó morfológiai elváltozások, amelyek a testi-szervezetben az egyedi korábbi kóros életfolyamatok folyamán keletkezett elváltozások következtében jöttek létre. Az ilyen morfológiai struktúra-változás az egyed egyéni „emléktanyaga”, mert hiszen egyénileg csupán őt jellemzően, speciálisan megszabja bizonyos élettani működések milyenségét. Gondoljunk példaként a keményen merev mitralis stenosisra, vagy valamilyen baleset következtében létrejött végtagcsonkolódásra, vagy myocardialis heg által létrehozott pitvar-kamrai vezetési blockra.

A dinámia-szerű „emléktanyagokat” a közvetlen funkcionális jelleg határozza meg. E funkcionális emléktanyag részben fiziológiai, részben pszichológiai jellegű. A közvetlen funkcionális megnyilvánulás dinámia-szerű emlékek is rendszerekké szerveződnek. Ezek a funkcionális rendszerek szerveződhetnek a verbalizált tudatszférába mint összefüggő képzetek, fogalmak, érzetek. Szerveződhet az ilyen emléktanyag a nem verbalizált emocionális (érzelmi, indulati) szférába. Mindkét elhelyezkedésű emléktanyag, illetve mind-

két emlékanyag forma, mivel dinámia jellegű, hatásában befolyásolhatja az egész személyiséget, annak magatartását, megnyilvánulásait, leterjedve a hatás egészen a vegetációs sejti-szöveti működésig. Fiziológiai jellegű emlékanyagként tekinthetjük a különböző immunitásokat, allergiákat, hyperergiákat, külön kiemelve az autoimmun folyamatokat. Psychológiai emlékanyagnak tekinthetjük sok más mellett az egyes tárgyak, jelenségek, emberek iránti alig magyarázható szimpatákat, antipatiákat, bizonyos helyzetekben a szorongásokat, más helyzetekben az eufóriát.

Az emberben az egyedi élete folyamán mintegy történelmileg felgyűlt és beépült egyéni szubjektív „emlékanyag” azt is befolyásolja, hogy egy aktuális pillanatban az egyedre ható „inger”-t — legyen az inger testi vagy psychés jellegű, legyen az fertőzés, vagy sérülés, sértés (testi vagy psychés sértés) — az egyednek össz-szervezeti működése, psychikuma, személyiségének egésze miként dolgozza fel, miként értékeli, miként kódolja, majd a belső feldolgozás eredményeként az ingerre miként „válaszol”. Az orvosnak azért szükséges ezt is figyelembe venni, mert hiszen a „betegség” is ilyen feldolgozás eredménye, ilyen „válasz”.

Az a három nagy gondolkodási alap-rendeződöttség tehát, amin az eredményes orvosi tevékenység felépül, röviden összefoglalva a következő: 1. egyrészt az ember, akivel és akinek problémáival foglalkozunk, ma is alapjában biológiai jellegét megőrzött lény. Az ember minden megnyilvánulása — ekként egészsége és betegsége — ma is függ biológiai tényezőktől. Azt jelenti ez, hogy a morfológiai és fiziológiai jelenségek és folyamatok adják azt a keretet, amin belül minden történik. 2. Másrészt ugyanekkor ez a biológiai eredetű ember és problémái minél inkább halad az egyed ontogenetikus érése a felnőtté felé, annál inkább egybe vannak forrva környezeti, társadalmi tényezőkkel. Ez viszont azt jelenti, hogy az ember gondolkodási és érzelmi szférájának történései az emberi kapcsolatokban a humanizációk azok, amik az emberi szubjektum szerint mindennek az értelmét adják. 3. És végül az ember és a mindenkori problémái (és így bajai, betegségei) szorosan függenek sajátosan egyéni szubjektív „emlékanyagától”, emlékvilágától, saját egyéni élettörténetétől. Ez azt jelenti, hogy az egyén történéseinek vezérlője: „az én” életcélja, „az én” megvédése a személyiségen belül, „az én” helyének megkeresése és rögzítése a világban: a tárgyi, a rendszeri és a személyi világban való érvényesülése.

Ez a három tényezőcsoport hatásában egybefonódva szabja meg az egyén személyiségében felépült azon kibernetikai rendszert, ami vezérli, meghatározza azt a magatartást, azt a reagálási módot, ahogyan egy bizonyos „betegséget” kiváltó ingerre a testi-szervezete, a psychikuma, a személyisége egésze válaszol: megbetegszik, majd meggyógyul. Ha e három tényező-csoportot már régen elfogadott fogalmakkal kívánom röviden jelölni: *constitutio*, *aktuális conditio* és *aktuális személyiségről* szólhatok.

Az egészségügyről, az eredményes egészségügyi tevékenységről kialakult és ezúttal csak egészen vázlatosan összefoglalt nézetünk megszabta már ezelőtt 25 évvel is és azóta is változatlanul megszabja azt is, hogy milyennek képzeltük el és milyennek szeretnénk volna látni az önállóvá váló orvostudományi egyetemet.

Az első igény, hogy *ne legyen* az egyetem valamiféle szellemi arisztokratikus jellegű elefántcsont-torony. Az egyetem legyen az egységes magyar egészségügy szerves része. Vegyen részt az egészségügyi gyakorlat feladatainak megoldásában. E tevékenysége közben törekedjen arra az egyetem, hogy mind a nem-manuális, mind a manuális szakmákban kiválóan vizsgáló, kóris-mező, gyógyító, operáló orvosai legyenek, olyan valóban jó orvosok, akik a beteg emberrel való foglalkozásnak minden részletét nagy technikai készséggel, nagy elméleti felkészültséggel, gazdag gyakorlati tapasztalatokkal tudják végezni, akik meg tudják nyerni a betegek bizalmát, akiknek személyisége a legnemesebb „gyógyszerként” hat, és akiknek már a jelenléte a beteg szerint „fél gyógyulást” jelent. Legyenek az egyetem orvosai jó szervezők, a rendelkezésre álló anyagi és személyi adottságokat az elérendő cél érdekében tudják hasznosan mozgósítani.

A gyakorlati étellel való szoros együttműködés azonban ne mondjon ellent annak az igénynek, és ez a második igény az egyetem iránt, hogy ugyanakkor legyen az egyetem az orvosi tudományok egyetemességének fellelőjére, valóban az orvostudományok „*universitasa*”. Az egyetem tudományos kutató munkájának témái mindenekelőtt a magyar egészségügyben is jelenlevő problémák megoldási törekvéseit segítsék. Ahogy mondani szoktuk, a kutatás a betegágytól, a magyar egészségügy problémáitól induljon és az eredményt a betegágnál, a magyar egészségügyben lehessen felhasználni. És ezt a klinikai tudományos munkát akként kell végezni, hogy a kutató ne tekintse a beteget valami kísérleti alanyának, hanem minden ténykedés járuljon hozzá a gyógyításhoz is. És a kutató mindenekelőtt tartsa be a „*nil nocere*” törvényét. Ugyanakkor legyen ereje az egyetemnek arra is, hogy támogassa, kísérje figyelemmel és kellőként értékelje az ún. alapkutatásokat. Olyan alapkutatásokat, melyeknek közvetlen gyakorlati haszna ma még nem látszik, de amely kutatások szerves részei a ma még meg nem oldott elméleti kérdésekkel foglalkozásnak.

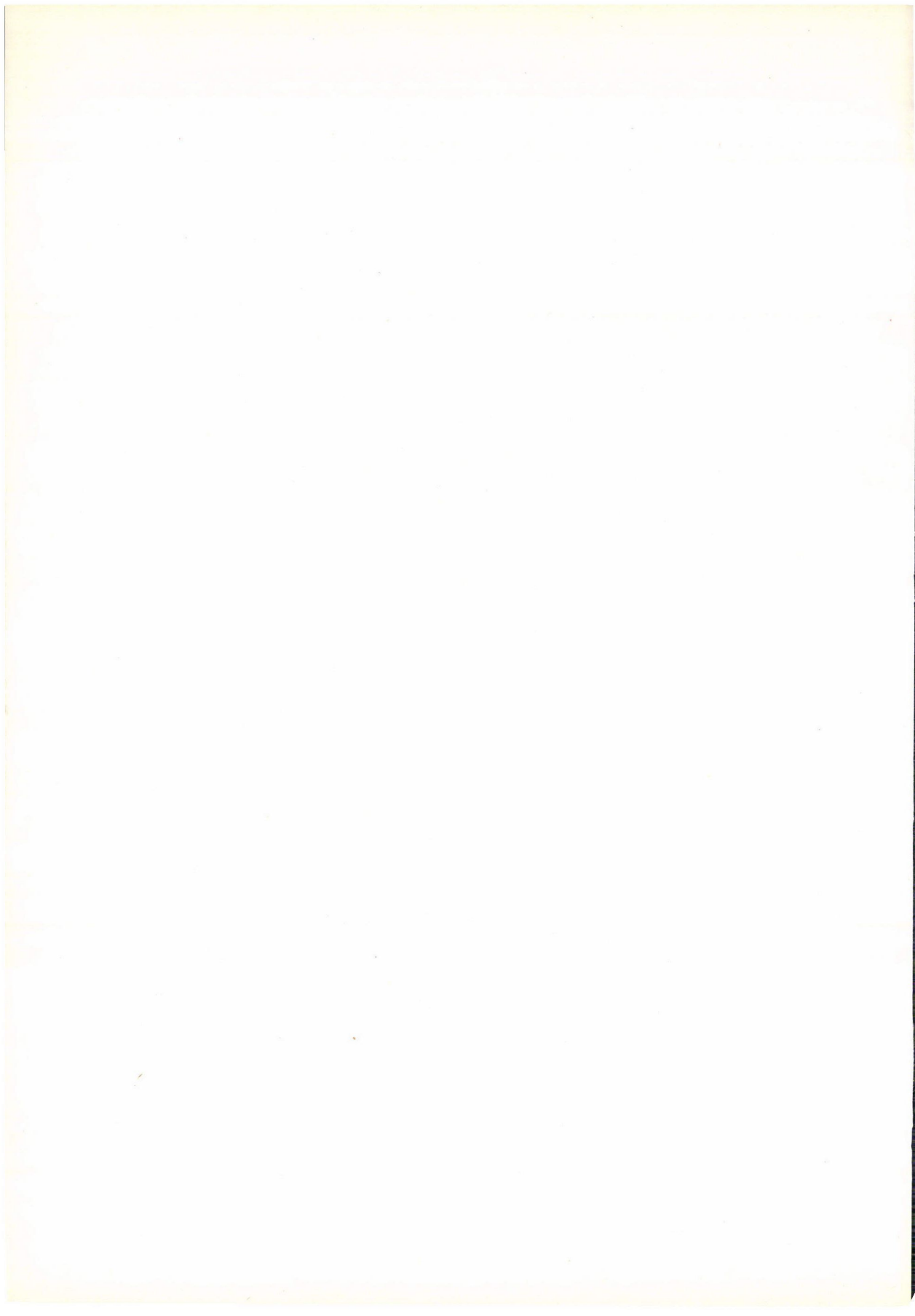
Ezen egybefonódó kettős beállítódás, vagyis a gyakorlattal és a tudományokkal való egybetartozás adja meg az alapját az önálló egyetem iránt támasztott harmadik igénynek: legyen az egyetem a legnemesebb értelemben vett „*orvosi iskola*”. Olyan felsőfokú orvosi iskola, ahol nem csak kiváló szakmai felkészítés történik, hanem ahol vezetésre és nyugodt, dolgos, alkotó, boldog életre alkalmas és más embereket is ilyen irányban befolyásolni képes személyiségű emberek alakulnak ki. Ennek döntő feltétele a jól felszereltség és anyagi ellátottság mellett, hogy ne legyen az egyetemen egymás mellett élő két világ:

külön a professzorok, a már doktorált, esetleg tudományos minősítést szerzett kutatók világa és külön a még kialakulóban levő ifjúság világa. Ne legyen külön világa a katedrán álló, felülről beszélő, előadó tanároknak, és külön a velük valóban szemben a padokban alacsonyabban ülő „hallgatók”-nak. Legyen az egyetemen egyetlen egységes világ: az együtt gondolkozó, az együtt érző, az együtt cselekvő, az egyet akaró, a tanítva-tanuló és a tanulva-tanító fiatalabb és idősebb, egyetlen célt szem előtt tartó, egymást tisztelő, egymás törekvéseit becsülő és segítő munkatársak világa. Legyen közös céljuk: a jelenben és a jövőben minél eredményesebb egészségügyi ellátást biztosítani az embertársaknak, és minél hathatósabban hozzájárulni az orvostudomány hazai és nemzetközi fejlődéséhez. Az egyetemen élő és dolgozó tanárok és ifjak segítségével egymást a szocialista gondolkodású és erkölcsű személyiségű emberré válás útján. A megfelelő emberi interperszonális kapcsolat, a szóval-oktatás, az együtt végzett gyakorlati tevékenység, a tudományos kutató munka együtt legyenek az orvosképzés, az orvossá nevelés eszközei.

Úgy képzeltem el, hogy ekként az önálló orvosegyetem nemcsak az orvosi gyakorlati és kutató tudományos életnek lesz fellelvára, hanem a magyar szellemi életnek is egyik központjává válik.

Az évszázados múltú orvosi fakultás megőrizve a legjobb hagyományokat megújultan mint önálló egyetem a most általunk ünnepelt 25 éves munkájával és fejlődésével bizonyítja, hogy komoly odafigyeléssel, megfeszített akarással, célszerű folyamatos munkával fokról-fokra meg lehet valósítani a 25 év előtti elképzeléseket és a kitűzött célokat követő egyetem hozzá tud járulni hazánkban a maga sajátos eszközeivel a legfőbb cél, a szocialista társadalom felépítéséhez.

E visszaemlékezés befejezéseként kívánok a 25 éves fennállását ünneplő önálló Semmelweis Orvostudományi Egyetemnek az idők végtelenségéig eredményekben, sikerekben gazdag jövőndőt!



## AZ ADRENOCORTICOTROPH HORMON (ACTH) ELVÁLASZTÁST SZABÁLYOZÓ MECHANIZMUSOK\*

STARK ERVIN

az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1975. IX. 26.

Jól ismert, hogy ha a szervezetet a legkülönbözőbb megterhelések érik, a hypophysisből ACTH kerül a keringésbe, aminek hatására a mellékvese fokozott corticoid elválasztással reagál. Az ACTH elválasztását szabályozó mechanizmus magyarázatára két időt álló elmélet alakult ki:

1. a corticoid feedback vagy autoregulációs szabályozás és a
2. neurohumorális szabályozás.

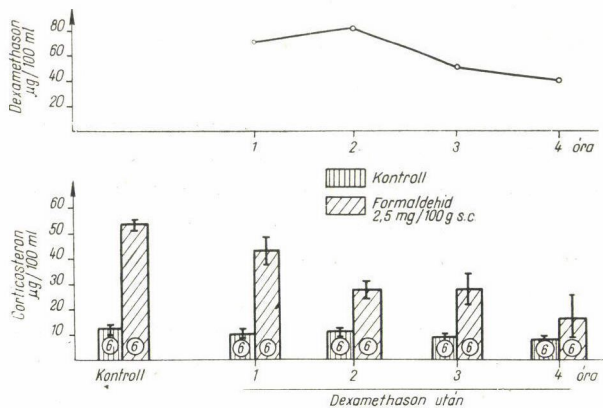
Az ACTH elválasztás negatív feedback mechanizmus útján való szabályozásának elmélete azon a felismerésen alapult, hogy a vér corticoid szintjének változása az ACTH elválasztást ellenkező irányban befolyásolja. Az elmélet megalapozói Sayers és Sayers (1948) szerint „nyugalmi” körülmények között a szövetek corticoid szükséglete alacsony, a glycocorticoidok szintje csak viszonylag szűk határok között ingadozik. Az ingadozások a hypophysisre közvetlenül vagy közvetve hatnak és ott ellenkező irányú működés változást okoznak. Stressz esetén megnő a szövetek corticoid igénye, csökken a corticoid szint a vérben, ill. a szövetekben, s ez fokozott ACTH elválasztáshoz vezet. Ez a mechanizmus a szervezet szükségletének megfelelő hormonális ellátottságot automatikusan biztosítja.

Az ACTH elválasztás autoregulációs elmélete hosszú időn át elfogadott volt; néhány kísérleti tény azonban ezen elmélettel nem volt összeegyeztethető; így pl. a megterhelést követően a plazma corticosteron szint mindig emelkedett, de az emelkedést megelőzően nem csökkent. Yates és munkatársai (1961) ezt az ellentmondást elegáns elmélettel igyekeztek feloldani. Elméletünk szerint stressz esetén a fokozott ACTH elválasztást nem a plazma corticoid szintjének csökkenése indítja meg, hanem a szövetek megnövekedett corticoid igénye, ami a központi idegrendszer corticoidra specifikusan érzékeny központjában virtuális corticoid hiányt jelez és ez indítja meg automatikusan az ACTH fokozott elválasztását.

Később azonban Smelik (1963) kimutatta, hogy az exogen corticoiddal előidézett magas plazma corticoid-szint nem gátolja meg az egyidejűleg alkalmazott stressz okozta ACTH elválasztást.

\* Az 1974. XII. 3. székfoglaló előadás.

Saját kísérletsorozatunk megerősítette ezt a tényt (Stark és Facht, 1963). Mivel a patkány glycocorticoidja a corticosteron, hogy az exogen és endogen corticoidot külön mérhessük a plazmában, dexamethasonnal előkezelt állatokban megfelelő szeparálás után párhuzamosan mértük a dexamethason koncentrációját és a stressz okozta corticosteron szint változását a vérben patkányban. A corticosteron az ACTH elválasztás indikátorául szolgált.



1. ábra. Dexamethason szintje a plazmában és stressz okozta ACTH elválasztás dexamethason (250 ug/100 g i.p.) injekció után.

Mint az 1. ábra mutatja, a formalin még egy órával a dexamethason beadása után is jelentős corticosteron szint emelkedést idézett elő, annak ellenére, hogy a plasma dexamethason szintje igen magas volt. Az ACTH elválasztás gátlása fokozatosan, csak néhány órával a dexamethason beadása után alakult ki. E kísérleteket úgy értelmeztük, hogy az akut stressz okozta ACTH elválasztás fokozódása nem a negatív feedback mechanizmuson keresztül valósul meg, mivel a fokozott ACTH elválasztás még a feltételezett virtuális corticoid hiány kivédésével sem akadályozható meg.

Ennek ellenére bizonyos, hogy az ACTH elválasztás szabályozásának egyik fontos tényezője a corticoid feedback hatása.

A corticoidok negatív feedback hatásának érvényesülése függ a keringő corticoidok mennyiségétől, a megterhelő inger intenzitásától, az időtől, mely a beadását követően eltelik a stresszor alkalmazásáig, stb. Amit hangsúlyozni kívánok az az, hogy nyugalmi állapotban levő állatban az akut stressz okozta ACTH elválasztás fokozódása nem a negatív feedback mechanizmus útján jön létre.

Ha az akut megterhelésre bekövetkezett fokozott ACTH elválasztást nem a negatív corticoid feedback mechanizmus indítja meg, akkor milyen mechanizmus teszi ezt?



Az elmúlt 25 év alatt számos adat gyűlt össze, amelyek arra mutattak, hogy a stresszre bekövetkező fokozott ACTH elválasztásban a hypothalamusnak központi szerepe van.

Az 1950-es évek óta végzett igen nagyszámú vizsgálaton alapul az a hypothézis, hogy a hypothalamus egy az ACTH-termelését szabályozó anyagot a corticotrop releasing faktort (CRF) termel, és hogy a hypophysis hormontermelését szabályozó CRF a hypothalamust a hypophysissel összekötő speciális érrendszeren keresztül jut az adenohypophysisbe. (Harris, 1955, Harris és George, 1969). Ez az anyag a mediális basalis hypothalamus (az MBH) egy jól körülírt területén, a Halász (1968) által lokalizált hypophyseotroph areaban szabadul fel.

Sokkal kevésbé ismertek azonban azok a mechanizmusok, afferens pályák melyeken keresztül a legkülönbözőbb stresszorok stereotip módon bekövetkező fokozott ACTH elválasztáshoz vezetnek.

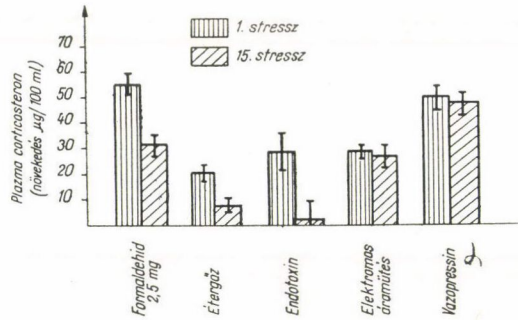
A stressz reakció afferens pályái alatt a következőkben mindazokat az információkat továbbító mechanizmusokat értjük, melyek a hypothalamus-hypophysis egységet aktiválva ACTH kibocsátáshoz vezetnek. Ezen információt továbbító mechanizmusok lehetnek idegingerület, a szisztémás keringésbe vagy liquorba jutott humorális mediátorok, vagy bármely más keringési, anyagcsere változás, melyek közvetlenül vagy közvetve, egymást indukálva érik el a hypothalamus-hypophysis egységet.

Fortier volt az első, aki a stressz okozta ACTH elválasztás szabályozásának kettős mechanizmusát tétélezte fel (Fortier, 1951). „*Neurotrophnak*” nevezte azokat az ingereket, amelyek csak akkor voltak hatásosak, ha a hypophysis kapcsolata a hypothalamussal megmaradt, vagyis amelyek a központi idegrendszer útján hatnak. „*Szisztémásnak*” azokat, melyek a hypothalamikus összeköttetésétől megfosztott hypophysist a szisztémás keringés útján képesek ACTH elválasztásra serkenteni.

A stresszoroknak neurotroph és szisztémás csoportra osztását később maga Fortier tette kritika tárgyává, mert egyrészt kísérleteiben az ACTH hatás vizsgálatára erősen vitatható kritériumokat (ascorbinsav depleció, lymphopenia) alkalmaztak, másrészt nem számoltak azzal az azóta felismert lehetőséggel, hogy a szisztémás keringés útján CRF juthat az átültetett hypophysishez.

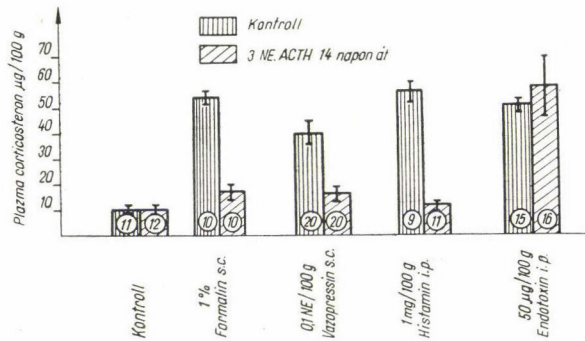
Az ACTH elválasztást különböző megközelítésekből tanulmányozva két olyan jelenséget észleltünk, melyek közvetve arra mutattak, hogy a különböző stresszorok különböző afferens pályák útján fokozzák az ACTH elválasztást.

Az első jelenséget akkor észleltük, amikor a patkányokat két héten keresztül naponta ugyanazon megterhelésnek tettük ki és az utolsó napon vizsgáltuk a megterhelés hatását a plasma corticosteron szintre (2. ábra). A sorozatos megterhelés után egyes stresszorok a corticosteron szintet nem,



2. ábra. Hypophysis-mellékvese reakció ismételt megterhelések után. Adagolás: formaldehid 2.5 mg/100 g s.c.; telítettétergőz 1 percig; typhus endotoxin 20 000 csíra/100 g i.p.; vasopresszin 1 N. E./100 g s.c.

vagy szignifikánsan kevésbé emelték, mint az első megterhelés után, míg más stresszorok ugyan olyan corticosteron szint emelkedést váltottak ki ismételt alkalmazásuk esetén is mint az első alkalommal (Stark és mtsai, 1965, 1968a).

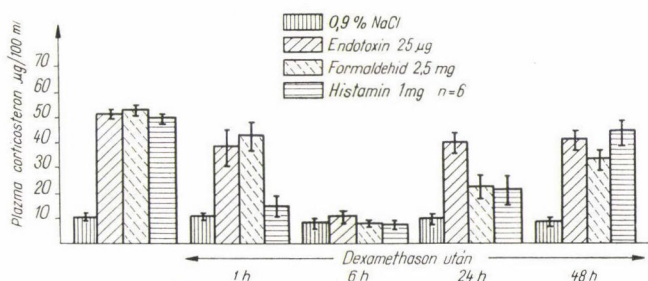


3. ábra. Hypophysis mellékvese reakció 14 napos ACTH kezelés után.

E vizsgálatok egyik lehetséges értelmezése az volt, hogy egyes stresszorok afferens pályái alkalmazkodnak, míg más stresszoroké nem, tehát különböző pályákon hatnak. Ugyanerre utaltak azok a kísérletek, amelyekben 14 napon át ACTH-val kezelt állatokban vizsgáltuk néhány stresszor ACTH elválasztást fokozó hatását (Stark és mtsai, 1968b). Az utolsó ACTH injekció után a plasma corticosteron szint jóval magasabbra emelkedett mint egy ACTH után, de 24 óra múlva kontroll szinten volt. Ebben az időpontban a histamin, formalin, lysin-vasopresszin nem idézett elő ACTH elválasztást, míg más stresszorok, mint pl. az endotoxin, igen (3. ábra).

Miután megállapítottuk, hogy a kezelt állatok hypophysise ACTH elválasztásra képes, mellékveséinek válaszképessége fokozott (Stark és mtsai,

1969), a corticoidok eliminációja nem változik (Ács és mtsai, 1969), a jelenség leginkább kézenfekvő magyarázatát abban láttuk, hogy az utolsó ACTH okozta magas plasma corticoid szint negatív visszajelentő hatása gátolja a CRF-ACTH elválasztást 24 órával később és ez a magyarázata, hogy egyes stresszorok után a CRF—ACTH elválasztása elmarad. Mivel magyarázható, hogy az endotoxin éppen olyan hatásos, mint a kontroll állatokban?



4. ábra. Különböző sztrezszorok okozta ACTH elválasztás dexamethason (250 µg i.p.) után  
A dózisokat 100 g testsúlyra adtuk meg.

Yates (1967) vizsgálatai alapján felvetődött, hogy az endotoxin, nem corticoid inszenzitív pályákon hat-e. A kérdés eldöntésére dexamethazonnal előkezelt állatokban megvizsgáltuk az endotoxin, hisztamin és formalin hatását az ACTH elválasztásra.

Mint a 4. ábra mutatja, a dexamethazon után az endotoxin sem fokozta az ACTH elválasztást, tehát ez az anyag is corticoid szenzitív pályákon hat. Az ábrából az is leolvasható, hogy a dexamethazonnal kezelt állatokban különböző stresszorok gátlása nem azonos időpontban következik be és nem azonos időpontban szűnik meg. Mint látható, a hisztamin hatás már gátolt, amikor az endotoxiné még nem, 6 óra múlva mind a három stresszoré gátolt, de 24 óra múlva az endotoxin már éppen olyan ACTH elválasztás fokozódást eredményez, mint a kontrollban, míg a másik két stresszor hatás még mindig gátolt.

A megfigyelés természetesen számos kérdést vet fel: például el kellett gondolkoznunk azon, hogy nem arról van-e szó, hogy az egyes stresszorok intenzitásuktól függően a gátlást áttörik, míg mások nem.

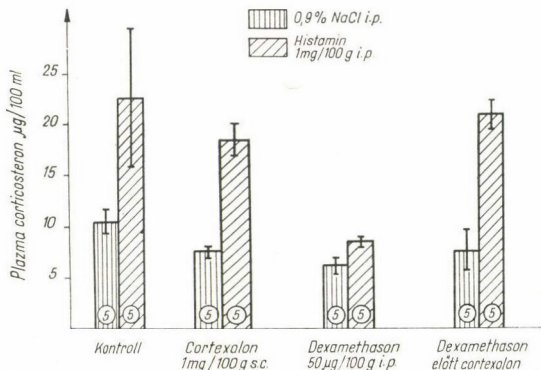
Mindent egybevetve arra a feltételezésre jutottunk, hogy az utolsó ACTH injekció okozta magas plazma corticoid szint nemcsak a hypothalamus CRF elválasztását, hanem a hypothalamushoz vezető afferens pályákat is gátolhatja, ez a gátlás különböző idő alatt szűnik meg; és egyes stresszorok pályái még gátoltak lehetnek, amikor más stresszoroké már nem.

Ez a magyarázat is magába foglalja azt a feltételezést, hogy a különböző stresszorok különböző pályákon érhetik el és aktiválhatják az ACTH

elválasztást. Ez a feltételezés természetesen indirekt, mondhatnám spekulatív és fontos része, hogy a glukokortikoidok hatásának helye a hypothalamuson kívül, az agy más területein is lehet.

Megpróbáltuk e feltételezés jogosságát kísérletileg alátámasztani.

Elterjedt az a felfogás, mely szerint a hormonok hatásában első lépés a fehérje természetű receptormolekulákhoz való kötődés. Bár ezt a peripheriás



5. ábra. Cortexolon hatása a histamin sztrezz dexamethasonnal való gátlására.

célszervek esetére sokan és sok támadáspontra igazolták, nem találtunk az irodalomban olyan kísérletes bizonyítékot, mely ezt az általánosítást a corticoid visszajelentés esetére is igazolta volna. Mi az igazolást két lépésben próbáltuk. Először vizsgáltuk felfüggeszthető-e a visszajelentő hatás olyan anyaggal, mely a corticoid és a receptor kapcsolódását kompetitíven megakadályozza, majd feltérképeztük, hogy az agyban merre és milyen corticoid receptor található.

Nemrég kimutatták, hogy a corticoidokat a thymus sejtek receptorairól egy corticoid „antagonista”, a cortexolon leszorítja.

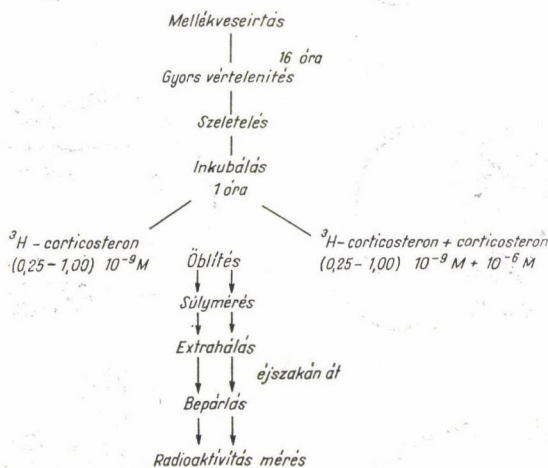
Ha a corticoid receptor és a dexamethason kapcsolódás gátlást eredményez, a cortexolon pedig a receptor és a dexamethason kapcsolódását megakadályozta, akkor az várható, hogy a cortexolon után adott dexamethason nem okoz gátlást.

Az eredmények (5. ábra) a feltételezéssel egybehangzóak. Dexamethason injekció után adott hisztamin az ACTH elválasztást nem fokozza. Ha azonban a dexamethazont megelőzően cortexolont adtunk — és feltehetően megakadályoztuk a dexamethazon kötődését a receptorhoz — akkor a dexamethazon gátlás elmarad.

Ez a kísérlet valószínűsíti, hogy a glycocorticoidok visszajelentő hatásában is első lépés a receptor-hormon kapcsolat létrejötte.

Egycs elektrofiziológiai és implantációs módszerrel végzett korábbi fiziológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy az ACTH elválasztást a corticoidok

extra-hypothalamikusan, egyes központi idegrendszeri struktúrákon keresztül befolyásolják. Megvizsgáltuk tehát, hogy a központi idegrendszer területén a hypothalamusban és azon kívül hol található corticosteron kötő receptor. Szem előtt tartva, hogy corticoid receptoroknak azokat a makromolekulákat nevezzük, melyek a corticosteroidokat azok biológiai hatékonyságával arányos specifitással és nagy affinitással kötik és amelyek a sejten élettani körülmények között előforduló hormon koncentráción telíthetők, a vizsgálatokat *in vivo* és *in vitro* saturációs analízissel végeztük.



I. táblázat

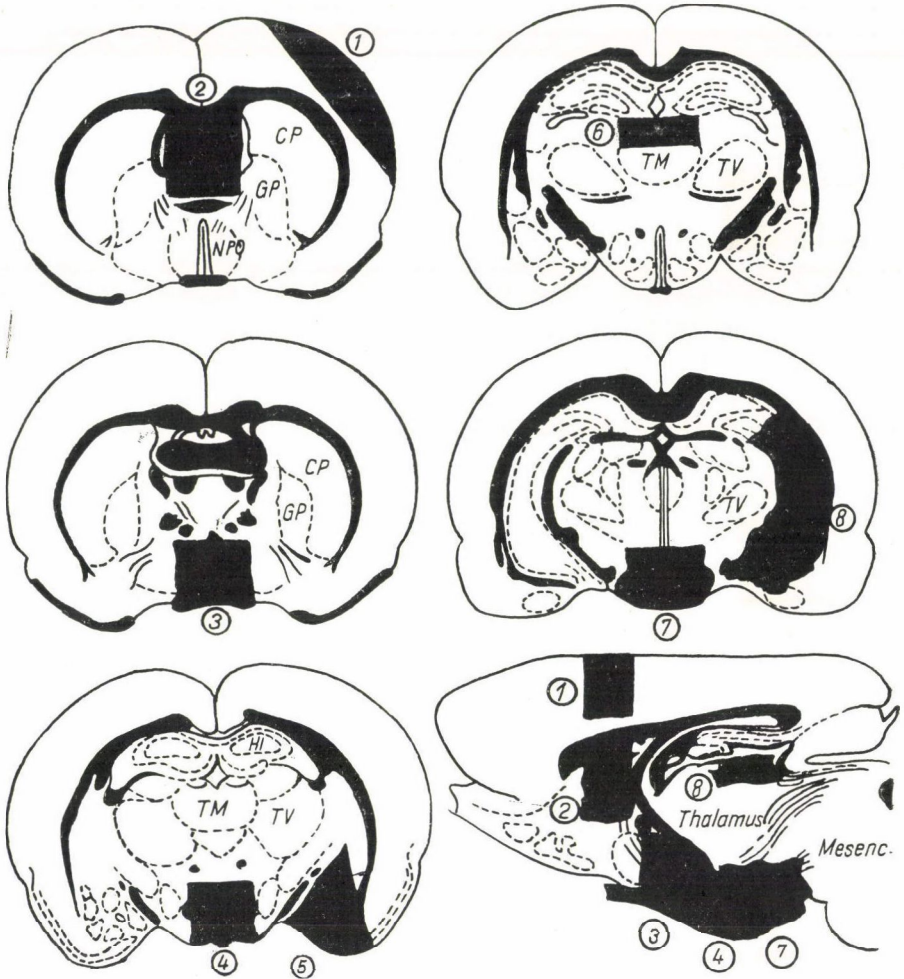
Az *in vitro* módszer (1. táblázat) lehetővé teszi, hogy kiszámítsuk a corticosteron kötőhelyek számát és a receptor-corticosteron kötés asszociáció állandóját.

A 6. ábra sematikusan mutatja, hogy mely területek corticosteron kötő receptorait vizsgáltuk. Nincs feltüntetve a hypophysis, melyet ugyancsak vizsgáltunk.

Vizsgálataink szerint a hypothalamus mediális és posterior, a hippocampus, a n. habenulae és a parietális agykéreg jelentős mennyiségű kortikoszteront kötött meg. A hypothalamus anteriorban, a septumban és az amygdalában nem találtunk specifikus kortikoszteront kötő receptort és nem találtunk a hypophysisben sem.

A hypothalamus mediálisban, a hippocampusban és a parietális agykéregben kimutatott kortikoszteroid kötés, az asszociációállandó és a kötőhelyek száma alapján megfelel a receptor kritériumainak. A hypothalamus posteriorban és a n. habenulacban a kötés gyengébb, ezek a feltételek nem teljesülnek, és így ezeken a területeken mért kortikoszteroid kötéset nem tekintjük specifikus receptornak (2. táblázat).

Mivel a hypophysis mint a visszajelentés helye ma is vitatott, gondol-



6. ábra. Központi idegrendszeri területek, melyeknek a kortikoszteroid receptorait vizsgáltuk. 1. parietális agykéreg; 2. septum; 3. hypothalamus anterior; 4. hypothalamus mediális; 5. amygdala; 6. n. habenulae; 7. hypothalamus posterior; 8. hippocampus

## II. táblázat

A kortikoszteroid-receptor kötés asszociációállandója és a kötőhelyek száma a központi idegrendszer különböző területein

	Kötőhelyek száma $\times 10^{-9}$ mol/100 g szövet	Asszociációállandó ( $\times 10^{-9}$ M $^{-1}$ )
Hypothalamus mediális	0,92	0,95
Hypothalamus posterior	520,00	0,0008
Hippocampus	4,40	0,13
N. habenulae	44,60	0,0118
Parietális agykéreg	0,82	1,10

nunk kell arra a lehetőségre, hogy csak azok a hypophysis sejtek tartalmaznak corticoid receptort, amelyek ACTH-t termelnek. Az ACTH sejtek %-os arányát immunhisztokémiai módszerrel megvizsgáltuk. Az 1. sz. kép az adenohypophysis ACTH sejtjeit mutatja miután az MSH-val történő keresztreakció lehetőségét kizártuk. Normál hypophysisben sejszámolás alapján az ACTH sejtek vizsgálataink szerint az összes adenohypophysis sejtek 3,6—6,0%-nak mutatkozott. Ez az adat közelítően egyezik Costoff (1973) adataival, aki 2—4% ACTH sejtet talált. Lehetséges, hogy saturációs analízissel a sejtek kis száma miatt specifikus corticoid kötő receptort — ha ilyen egyáltalán van a hypophysisben — nem tudtunk kimutatni.

Adataink azt bizonyítják, hogy kortikoszteroid-receptorok nemcsak a hypothalamus mediálisban vannak, hanem azokban az extrahypothalamikus struktúrákban is, amelyek elektrofiziológiai, ill. implantációs módszerekkel végzett vizsgálatok alapján szerepet játszhatnak az ACTH-elválasztás szabályozásában.

Anélkül, hogy e vizsgálati eredmények számos (physiológiai) vonatkozását diszkutálnám, azt szeretném kiemelni, hogy az az elképzelés, hogy a corticoidok nemcsak a hypothalamus szintjén, hanem extra-hypothalamikus területeken is gátolhatják a CRF elválasztásban szerepet játszó afferens pályákat, nem csupán spekuláció.

Az a feltételezésünk tehát, mely szerint ACTH kezelés után a magas endogén corticosteron szint 24 órával később egyes stresszorok esetében gátlást eredményez, mások esetében nem, joggal implicálja azt a feltételezést, hogy egyes stresszorok más afferens pályákon jutnak a hypothalamus CRF termelő sejtjeihez mint mások.

Megkíséreltük közvetlenebb módon igazolni, hogy a különböző stresszorok valóban különböző afferens pályákon fokozzák-e az akut stressz okozta ACTH elválasztást.

E vizsgálataink kezdetekor abból a feltételezésből indultunk ki, hogy a stressz okozta akut ACTH elválasztás a fokozott CRF felszabadulás eredménye és hogy a CRF termelő sejtek az MBH-ban vannak. Elméletileg idegi és nem-idegi csoportra oszthatók azok a pályák, amelyek a stresszorok hatását a hypothalamus e területéhez közvetítik.

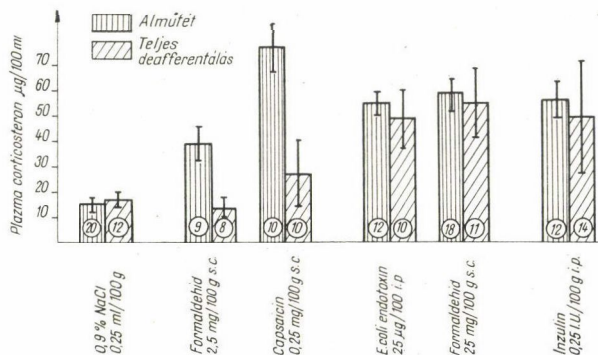
A továbbiakban neurálisnak neveztünk minden olyan stresszort, mely idegi pályákon keresztül éri el az MBH-t, humorálisnak azokat, amelyeknek alkalmazása után az ACTH elválasztást fokozó információ nem idegi, hanem pl. vér vagy liquor keringés útján jut a CRF-t termelő sejtekhez.

E megfontolásokból kiindulva megvizsgáltuk néhány stresszor ACTH-t fokozó hatását az MBH anterolateralis és teljes defferentálása után (Makara és mtsai, 1969, 1970). Miután a két beavatkozás után nyert eredmények lényegében azonosak voltak, a továbbiakban elsősorban azokról beszélek, melyeket az MBH teljes defferentálása után nyertünk.

A műtétet Halász és Pupp (1965) módszerével végeztük. A stresszre bekövetkező akut ACTH elválasztás fokozódást a műtétet követő 7—8 napon vizsgáltuk.

A vizsgálatok befejeztével a műtétek sikerét sorozatmetszeteken ellenőriztük. A szagittális metszeten (2. kép) a deafferentált hypothalamus szöveti képe látható.

A deafferentált hypothalamussal rendelkező állatokban a nyugalmi plasma corticoid szint nem különbözött a kontrolloktól. A kis dózísú formalin



7. ábra. Stressz reakció az MBH deafferentálása után 7—8 nappal.

és capsaicin nem okozott plasma corticosteron szint emelkedést, míg az endotoxin, nagy dózísú formalin, insulin ugyanúgy fokozta az ACTH elválasztást, mint az álműtött állatban (7. ábra).

E kísérleteket úgy értelmeztük, hogy a stresszorok egy csoportja az MBH-hoz befutó idegi pályák útján fokozza a CRF termelést, tehát *neurálisak*. Az ACTH fokozott elválasztása azért maradt el, mert a serkentő inger a pályák átvágása után nem jutott el az MBH-hoz. Az endotoxin, a nagy dózísú formalin, insulin ugyanolyan hatásosnak bizonyultak, mint az álműtött állatokban, hatásuk tehát *humorálisan* érvényesül.

A 3. táblázaton összefoglaltuk a stresszorok pályák szerinti felosztását.

Azt természetesen nem állíthatjuk, hogy a humorális stresszorok hatásában az idegi afferenseknek egyáltalában nincs szerepe. Lehet, hogy az intact állatban a humorális és idegi afferensek együttes hatására fokozódik az ACTH elválasztás. Azt azonban állíthatjuk, hogy az idegi afferenseknek ebben a reakcióban nincs meghatározó szerepük.

Eredményeink és az irodalmi adatok alapján nyilvánvaló, hogy az intact állatban egyformán ACTH elválasztás fokozódást okozó különböző megterhelések az MBH-ba befutó idegek átvágása után nem egyformán hatásosak. Egyesek hatása teljesen elmarad, ezek a neurálisak, másoké teljesen megmarad, ezek a humorálisak. Úgy véljük, hogy ezek az adatok felhasználhatók



## III. táblázat

## Stresszorok felosztása pályáik szerint

Idegi stresszorok	Humorális stresszorok
Zaj-vibrálás*	Éter
Műtéti stressz*	Bacteriális endotoxin*
Lábtörés*	Histamin*
Capsaicin*	Hypoglycaemia*
Fény	Hypoxia
Hang	Hypotensio
Psychés ingerek	ADH
Formaldehid*	Formaldehid*

\* saját kísérletek alapján

a stresszorok CRF—ACTH felszabaduláshoz vezető afferens pályáinak jellemzésére.

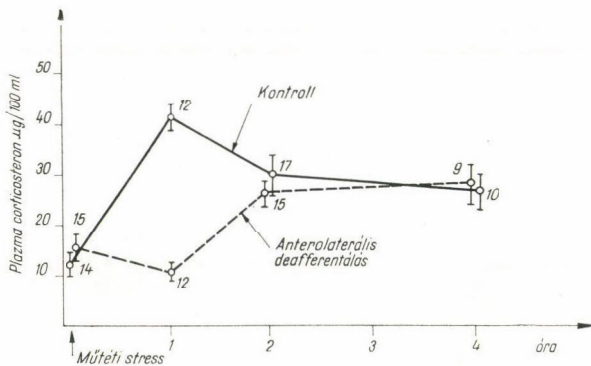
Az ismertetett vizsgálatokkal kapcsolatban természetesen számos kérdés vetődik fel. Megkísérlem, hogy ezek közül néhányra kísérleteink alapján válaszoljak.

1. Mivel Brodish (1964) műtéti stresszel végzett vizsgálata óta gyakran felmerül az a nézet, hogy a stressz reakció két fázisban zajlik le, azt is megvizsgáltuk, hogy az MBH deafferentálása után egy adott időpontban hatástalannak bizonyult stresszor nem vált-e ki fokozott ACTH elválasztást a vizsgálatnál későbbi időpontban.

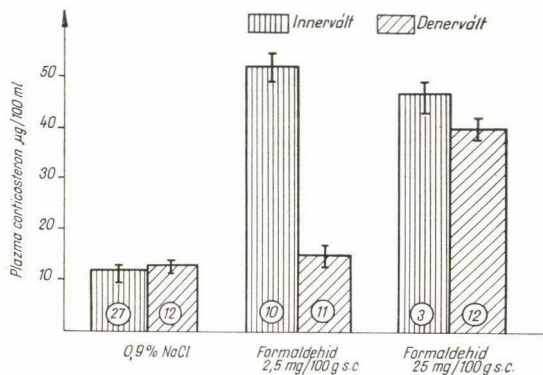
A műtéti stressz, hasonlóan Brodish észleletéhez, melyet hypothalamus laedált állatban talált, az anterolaterálisan deafferentált állatban sem idézett elő fokozott corticoid szint emelkedést az első órában, de két óra múlva szignifikánsan fokozta azt (8. ábra). Ugyanezt a kísérletet elvégezve a kis dózisu formalin beadását követően sem 30, sem 60, sem 120 perc múlva nem idézett elő fokozott ACTH elválasztást. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a műtéti stressz után — csakúgy, mint a kis dózisu formalin után — a gyors CRF elválasztást serkentő információt az MBH-hoz befutó idegpályák közvetítik, de a késleltetett fázis a műtéti stressz esetén más afferens pályán valósul meg mint a gyors fázisban. A két fázis azonban nem minden stresszorra jellemző (Stark és mtsai, 1970b, Stark, 1972).

2. A stresszorok egyes szerzők szerint bizonyos beavatkozások után (hypothalamus laesió, corticoid blockád, stb.) nem attól függően hatnak vagy sem, hogy afferens pályájuk különbözőek, hanem intenzitásuktól függően. Ezek a szerzők nem gondoltak arra, vajon az intenzitással nem változik-e az afferens pálya, melyen keresztül a stresszorok hatnak?

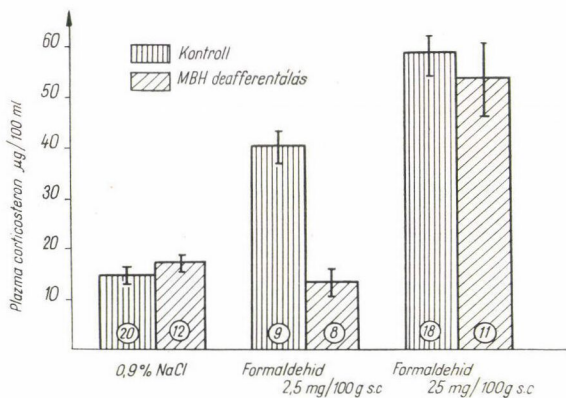
Egy rögzített időpontban vizsgáltuk a plazma corticosteron szintjét és növeltük a beadott stresszor (formaldehid és hisztamin) mennyiségét, melyet intenzitás növelésnek szoktak tekinteni (Mangili és mtsai, 1966).



8. ábra. Késleltetett stressz reakció az MBH anterolaterális deafferentálása után.

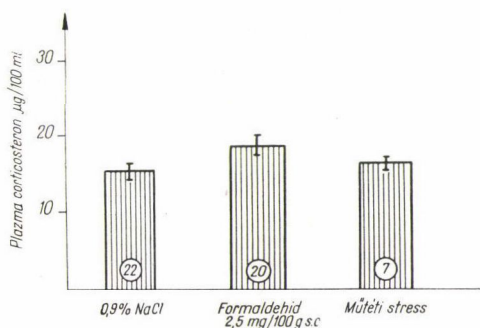


9. ábra. Különböző intenzitású inger hatása a végtag denerválása után.



10. ábra. Különböző intenzitású ingerek hatása az MBH deafferentálása után.

Az álműtött állatokban különböző adagú formaldehid injekciók corticosteron szintre gyakorolt hatása között szignifikáns különbség nincs. Ha azonban ugyan ezeket a dózisokat a végtag denerválása után (9. ábra), vagy az MBH teljes deafferentálásán átesett patkányok hátsó végtagjába injiciáltuk (10. ábra), azt észleltük, hogy csak a nagy dózis hatására következett be corticosteron szint emelkedés, s ez az emelkedés szignifikánsan nem különbözött



11. ábra. Műtéti stressz és formaldehid hatása az MBH eltávolítása után.

a kontroll állatokéitól. Ebből arra következtethetünk, hogy ha ugyanazon stresszor intenzitását növeljük, megváltozhat az afferens pálya, melyen keresztül fokozott ACTH elválasztáshoz vezet.

3. Vajon a formaldehid nagy dózisa vagy az endotoxin és insulin, melyek az MBH teljes deafferentálása után is hatásosak voltak, csak a CRF elválasztását fokozták-e, vagy pedig az MBH-t megkerülve képesek fokozott ACTH elválasztást előidézni?

A kérdésre az MBH-től megfosztott állatokon végzett vizsgálatoktól vártunk választ.

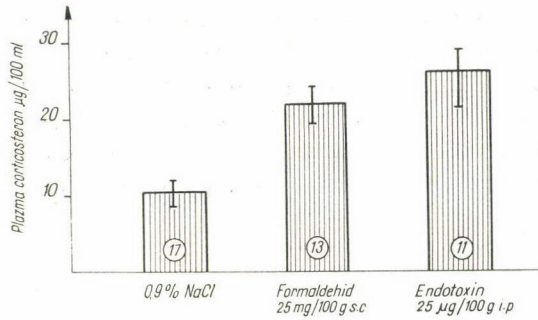
Üvegesővel a chiasma opticum és a corpus mamillare között elhelyezkedő hypothalamus részt a felette levő agyszövettel együtt kb. 4 mm szélességben eltávolítottuk (Makara és mtsai, 1971).

A 3. kép mutatja, hogy az MBH helyén vérömleny van. Az MBH eltávolítása után a hypophysishen bekövetkezett változás jól megegyezik a nyél átmetrészt követő ismert képpel.

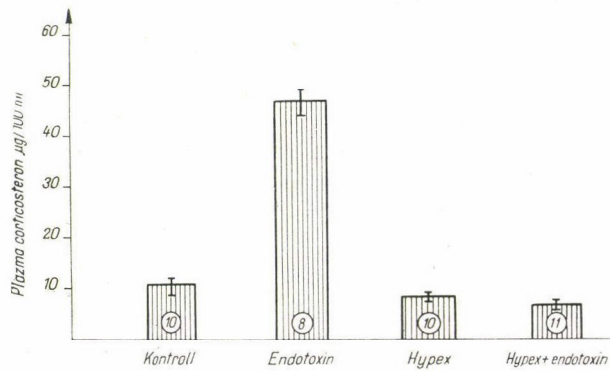
Az MBH-től megfosztott állatban a formalin kis dózisa, a műtéti stressz nem idézett elő ACTH szint emelkedést a plazmában (11. ábra).

A nagy dózisu formalin, az endotoxin szignifikánsan emelte, bár kisebb mértékben mint a normál állatban (12. ábra), amit a hypothalamus közvetítés hiánya, vagy az adenohypophysishen levő infarktus magyarázhat.

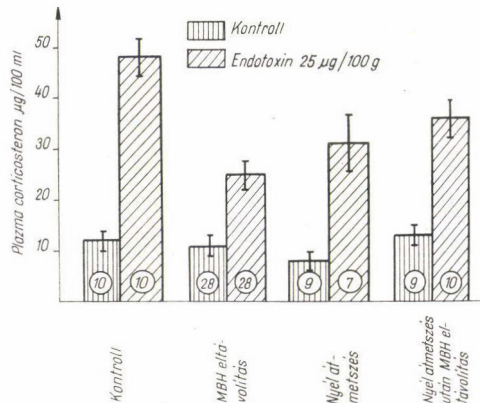
A 13. ábra mutatja, hogy az endotoxin a paraméterként használt plazma corticosteront az ACTH-n keresztül fokozta. E kísérletek szerint egyes stressz-



12. ábra. Formaldehid és endotoxin hatása az MBH eltávolítása után.



13. ábra. Endotoxin (25 µg/100 g ip) hatása hypophysectomia után.



14. ábra. Endotoxin hatása a hypophysisnyél átmetésére és az MBH eltávolítása után.

szorok a hypothalamus mediális területének és az eminencia mediának közvetítése nélkül is tudja fokozni a hypophysis ACTH elválasztását (Stark és mtsai, 1970a, Stark és mtsai 1973/74).

Ha szem előtt tartjuk kiindulási feltételezésünket, hogy a stresszorok CRF-en keresztül idéznek elő fokozott ACTH elválasztást, akkor az endotoxin, és a nagy dózísú formalin hatásával kapcsolatban felmerül hogy,

1. a neurohypophysisből szabadítanak fel raktározott CRF-t, vagy ACTH-t, amire egyes irodalmi adatok (Mialhe-Voloss, 1958, De Wied, 1961) alapján gondolni lehet, vagy

2. a hypothalamikus CRF közvetítése nélkül is serkenteni tudják az ACTH elválasztást.

Megvizsgáltuk, hogy az MBH irtott állatban fokozza-e az endotoxin az ACTH release-t, ha nyélátmetszés után 4 héttel végezzük a kísérletet. Ismeretes, hogy nyélátmetszés után ennyi idővel a neurohypophysis kiürül, secretiós granulumai eltűnnek.

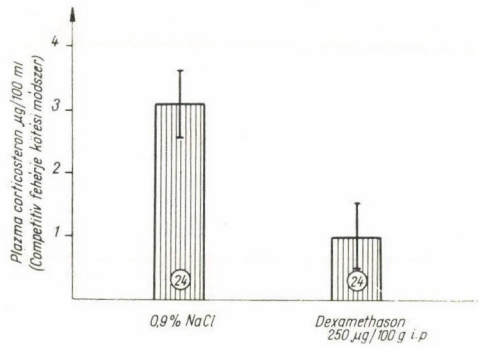
Ha az MBH eltávolítását megelőzően 4 héttel a hypophysis nyelet átmetsettük, az endotoxin akkor is jelentős ACTH elválasztás fokozódást idéz elő (14. ábra). Tehát az MBH eltávolítása után megfigyelt fokozott ACTH elválasztásban a neurohypophysis mint CRF vagy ACTH forrás aligha játszik szerepet (Marton, és mtsai, in press).

Ismeretes, hogy a stressz okozta ACTH elválasztás corticoiddal gátlható. Az a tény, hogy a corticoid visszajelentés helye a hypothalamus, általánosan elfogadott, de nyitott kérdés, hogy a hypophysis szintjén érvényesül-e a corticoid ACTH gátló hatása. Természetesen vetődött fel a kérdés, hogy a hypothalamusától megfosztott állat nyugalmi ACTH elválasztása, ill. a stressz okozta fokozott ACTH elválasztás gátlható-e dexamethazonnal. Kísérleteink szerint a dexamethazon mind a nyugalmi (15. ábra), mind a stressz ACTH elválasztást (16. ábra) jelentősen gátolta az MBH eltávolítása után is. okozta

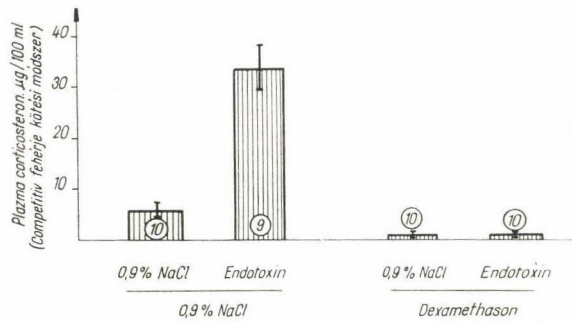
Tekintettel arra, hogy a hypothalamusától megfosztott állatokban az MBH mint a visszajelentés helye nem jöhet szóba, megvizsgáltuk, hogy a dexamethazon gátolja-e az ACTH elválasztást in vitro, tenyésztett orgánkultúrában. Az ACTH-t radioimmuno assay-vel, mértük az inkubációs folyadékban. Vizsgálataink szerint a tápfolyadékhoz tett 0,5 és 1,0  $\mu\text{g/ml}$  dexamethazon az ACTH alapsecretióját nem befolyásolja (17. ábra).

Ezen adataink és azon korábbi eredményeink, hogy a hypophysisben corticoid receptorokat kimutatni nem tudtunk, arra engednek következtetni, hogy a nyugalmi ACTH elválasztást szabályozó visszajelentés helye nem a hypophysis. Ez természetesen nem zárja ki, hogy a stressz okozta ACTH elválasztás esetében a hypophysis mint a visszajelentés helye, játszhat szerepet.

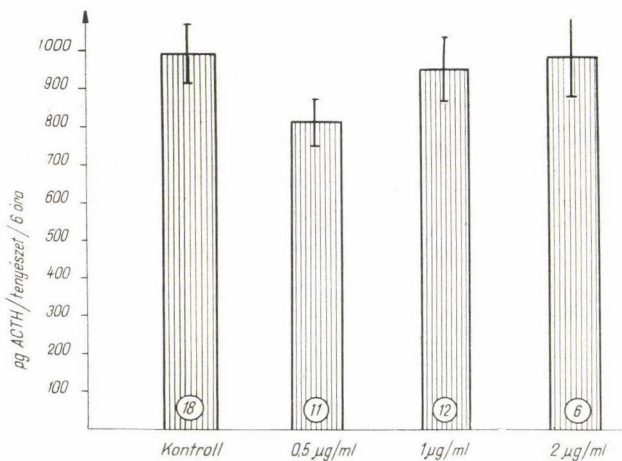
Az ismertetett kísérleti adatok után felvetődik az a lehetőség, hogy



15. ábra. Dexamethason hatása az MBH eltávolítása után.



16. ábra. E. coli endotoxin (25 µg/100 g ip) és dexamethason (20 µg/100 g) hatása az MBH eltávolítása után.



17. ábra. Dexamethason hatása a hypophysis szervtenyészetek ACTH elválasztására.

egyes humorális stresszorok serkenteni tudják az ACTH elválasztást a CRF közvetítése nélkül, esetleg közvetlenül az adenohypophysisre hatva. Ez a lehetőség — bár nem zárható ki — az endotoxin esetében nem valószínű, mert Ando és munkatársai (1964), valamint Allen és mtsai (1973) *in vitro* kísérleteiben az endotoxin nem fokozta a hypophysis szeletek ACTH elválasztását. Fel kell tételeznünk tehát, hogy egyes humorális stresszorok ACTH elválasztást fokozó hatásukat extra-hypothalamikusan felszabadított CRF vagy CRF-szerű anyagok útján fejtik ki, melyek a szisztémás keringés útján érik el a hypophysist.

Lymangrover és Brodish (1973/74) nemrég közölt adatai is hasonló következtetésre vezettek; nevezetesen, hogy egyes stresszorok az ACTH elválasztást fokozó gyors neurális mechanizmust követően egy szöveti CRF felszabadítás útján ható mechanizmussal is rendelkeznek.

Emlékeztetnék arra, hogy *neurálisnak* neveztünk minden olyan stresszort, mely az MBH CRF termelő sejtjeit közvetlen idegi pályákon érik el, *humorálisnak* azokat, amelyek nem idegi úton is képesek a hypothalamus-hypophysis egységet aktiválni.

Figyelembevée újabb kísérleteinket, valamint Lymangrover és Brodish (1973/74) adatait, elméleti megfontolásokon alapuló felosztásunkat ki kell egészíteni: a humorális stresszorok egy olyan alcsoportjával is számolni kell, amelyek az ACTH elválasztást a hypothalamikus CRF-től függetlenül fokozni képesek, feltehetően extrahypothalamikusan agyi vagy más szövetekből felszabaduló CRF és/vagy CRF hatású anyagok útján.

Az ACTH elválasztás szabályozásának különböző modelleken történt tanulmányozása során szükségesnek bizonyult, hogy megismerjük a megterhelések okozta fokozott ACTH elválasztáshoz vezető afferens pályák természetét.

Az ismertetett kísérletek kezdeti célja az volt, hogy minél közvetlenebb módszerekkel vizsgáljuk az ACTH-t serkentő afferens pályákat, vagyis, hogy megtölthető-e valós tartalommal a stresszorok pályáik szerinti elméleti felosztása. Az eredmények hangsúlyosan rámutatnak arra, hogy a sokféle ACTH elválasztást fokozó megterhelést nem szabad egyszerűen közös tulajdonságú nem-specifikus ingernek tekinteni még, az ACTH-mellékvese nem-specifikus reakciója szempontjából sem, mert nem-specifikus hatásuk csak annyiban közös, hogy egyszeri alkalmazásuk után, akutan, érintetlen állatban sztereotíp módon fokozott ACTH, ill. corticoid elválasztáshoz vezetnek.

A kísérletek rávezettek arra a felismerésre, hogy az ACTH elválasztás — legalább ideig-óráig — a medialis hypothalamus nélkül is folyik és egyes stresszorok az MBH távollétében is kiváltanak ACTH kidobást és az extra-hypothalamikusan corticoiddal gátolható. A pályák és a visszajelentés kapcsolatát vizsgálva specifikus glycocorticoid kötő receptorokat találtunk az agy néhány körülírt területén.

Alapul véve az elmondottakat valószínű, hogy a jövőben

1. elsősorban az idegi úton ható stresszorok segítségével lesz érdemes vizsgálni a CRF elválasztás szabályozásában szerepet játszó hypothalamikus transzmittereket és megkeresni a CRF termelő sejteket serkentő anyagokat.

2. A hormonreceptor és a neurotranszmisszió kapcsolatának kutatásával viszont az ACTH elválasztást szabályozó ideghálózatban lezajló gátlás megértéséhez juthatunk közelebb.

3. A humorális stresszorok hatásmechanizmusának részletesebb vizsgálata esetleg a nem hypothalamikus, peripheriás szövetekből érkező mediátorok azonosítását eredményezheti, míg a közvetlen hypophyseális támadáspont lehetőség elemzése a peptid-hormonok termelésének és kibocsájtásának celluláris mechanizmusai felé vezet. Ezek a lehetőségek ma még tudásunk horizontján vagy azon túl vannak és további évek szorgos munkájával közelíthetők csak meg.

#### IRODALOM

- Ácsi Zs., Starki E., Hajtmani B.: *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **36**, 63 (1969).
- Allen, J. P., C. F., Greer, M. A., és Jacobs., I. J.: Stress-induced secretion of ACTH. In: *Brain Pituitary Adrenal Interrelationships*. (Ed. A. Brodich, E. S. Redgate Karger, Basel pp. 99–127. (1973.)
- Ando, S., Guze, L. B., és Gold., E. M.: *Endocrinology*, **74**, 894 (1964).
- Brodich, A.: *Endocrinology*, **74**, 28 (1964).
- Costoff, A.: *Ultrastructure of rat hypophysis Correlation with function*. Acad. Press. N. Y. 1973).
- De Wied, D.: *Endocrinology*, **68**, 956 (1961).
- Fortier, C.: *Endocrinology*, **49**, 782 (1951).
- Halász B., és Pupp, L.: *Endocrinology*, **77**, 553 (1965).
- Halász B.: The trophic dependence of the anterior pituitary on the diencephalon: The Hypohyseotropic area of the hypothalamus. In: *Hypothalamic control of the anterior pituitary*. (Szentágothai J., Flerkó B., Mess, B., Halász, B.): Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 110–155 (1968).
- Harris, G. W. és George, R.: Neurohumoral control of the adenohypophysis and the regulation of the secretion of TSH, ACTH and growth hormone. In: *The hypothalamus*. (Ed. Haymaker, W., Anderson, E., Nauta, W. J. H., Charles C. Thomas. Publisher. Springfield, Illinois, USA (1969.)
- Harris, G. W.: „Neural Control of the Pituitary Gland”. *Monographs of the Physiologica Society*. E. Arnold Ltd., London. 1955.
- Lymangrover, J. R. és Brodich, A.: *Neuroendocrinology*, **13**, 234 (1973/74).
- Makara, G. B., Stark, E., Palkovits, M., Révész, T., és Mihály, K.: *J. Endocr.*, **44**, 187 (1969).
- Makara, G. B., Stark, E., és Palkovits, M.: *J. Endocr.*, **47**, 411 (1970).
- Makara, G. B., Stark, E., és Mészáros, T.: *Endocrinology*, **83**, 412 (1971).
- Mangili, G., Motta, M., és Martini, L.: Control of adrenocorticotrophic hormone secretion. pp. 297–370 (1966) In: *Neuroendocrinology*. (Ed. Martini, L., Ganong, W. F.) Acad. Press, New York
- Marton, J., Stark, E., Makara, G. B., és Palkovits, M.: *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* (in press).
- Mialhe—Voloss, C.: *Acta endocr. (Kbn.)* **28** Suppl. **35**, 1 (1958).
- Sayers, G., és Sayers, M. A.: The pituitary-adrenal system. *Recent Progr. Hormon. Res.* **2**, 81 (1948).
- Smelik, P. G.: *Acta Endocrinol.*, **44**, 36 (1963).
- Stark, E., és Fachet, J.: *Acta Med. Sci. Hung.*, **19**, 367 (1963).
- Stark, E., Fachet, J., és Mihály, K.: *Endokrinologie*, **49**, 27 (1965).



- Stark, E., Fachet, J., Makara, G. B., és Mihály, K.*: Acta Med. Acad. Sci. Hung., **25**, 251 (1968a).  
*Stark, E., Ács, Zs., Makara, G. B., és Mihály, K.*: Can. J. Physiol. Pharmacol., **46**, 567 (1968b).  
*Stark, E., Ács, Zs., és Szalay, K. Sz.*: Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., **36**, 55 (1969).  
*Stark, E., Makara, G. B., Mészáros, T., és Ács, Zs.*: Excerpta Medica Int. Congr. **210**, (1970a).  
*Stark, E., Makara, G. B., Palkovits, M., és Mihály, K.*: Acta Phys. Acad. Sci. Hung., **38**, 43 (1970b).  
*Stark, E.*: Acta Med. Acad. Sci. Hung. **29**, 77 (1972).  
*Stark, E., Makara, G. B., Marton, J., és Palkovits, M.*: Neuroendocrinology, **13**, 224 (1973/74).  
*Yates, F. E., Leeman, S. E., Glenister, D. W., és Dallman, M. F.*: Endocrinol., **69**, 67 (1961).  
*Yates, F. E.*: Physiological control of adrenal cortical hormone secretion.  
In: The adrenal cortex. (Ed. Eisenstein, A. B.) Little, Brown Boston pp. 133. (1967).



## SCANNING ELEKTRONMIKROSKÓPOS VIZSGÁLATOK KEZELETLEN ÉS 20-METHYLCHOLANTHRENNEL IN VITRO MALIGNUSAN TRANSFORMÁLT EGÉR EMBRIÓ FIBROBLAST SEJTEK TENYÉSZETEIN

FERENCZ GÉZA, SZENDE BÉLA, LAPIS KÁROLY az MTA levelező tagja és  
PODMANICZKY ERZSÉBET

Közlésre érkezett: 1975. VII. 10.

In vitro fenntartott sejtek malignusan transformálhatók különböző kémiai carcinogén anyagokkal (Berwald és Sachs, 1963, 1965; Chen és Heidelberg, 1969). A malignus transformatio hatására a sejtek tulajdonságaiban beálló, eddig ismert és leírt változások egyike sem egyértelműen elfogadott a transformatio bekövetkeztének igazolására (kontakt gátlás felfüggesztődése: Edwards, 1971; Agglutinatio Concanavalin-A-val: Fox, 1971; csökkent szérumigény: Dulbecco, 1970; stb.). Az in vitro malignus transformatio bekövetkeztének bizonyítására az egyetlen elfogadott módszer az állatba való, daganatot eredményező visszaoltás (Eagle, 1970). A carcinogén kémiai anyagok hatására in vitro bekövetkező morfológiai változásokat egyre több oldalról vizsgálják (Sanford, 1974). A morfológiai vizsgálatok sorában új lehetőséget teremtett a scanning elektronmikroszkóp használata (Schaff és Lapis, 1974). Segítségével mód nyílik a kezeletlen, az onkogén vírussal, kémiai carcinogénnel kezelt, illetve a spontán malignusan transformálódott sejt-kultúrák felszíni képződményeinek tanulmányozására (Porter, 1973).

### *Vizsgálati anyag és módszerek:*

*Kezeletlen sejtenyészet:* CBA T6T6 egér 20 napos embrióiból homogenizálással nyert sejteket 10% borjúsavót tartalmazó Parker médiumban, Falcon edényekben tenyésztettünk. A kultúrák passzálása 5 naponként ( $5 \times 10^5$  sejt (10 ml), 0,25% trypsint tartalmazó oldattal történt (K-kultúra).

### *20-methylcholanthrennel (MC) kezelt sejtenyészet:*

A kialakított egér embrió fibroblast kultúrákat a 8. passzáláskor kétfelé osztottuk. A tenyészetek egyik része nem kapott kezelést, a másik része (5 edény,  $5 \times 10^4$  sejt(edény), 14 napon keresztül 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  koncentrációban MC kezelést kapott. A kezelt kultúrákat a leírt módon passzáltuk (MC-kultúra).

*Visszaoltás:* A kezelt és a kezeletlen fibroblast sejteket egynapos CBA T6T6 egerekbe [s.c.,  $4 \times 10^6$  sejt(állat)] oltottuk. A visszaoltás a K-kultúra eseté-

ben 9—21 passzálás között összesen 13 állatba, MC-kultúra esetében a kezelés utáni 3—9 passzálás között összesen 12 állatba történt. 3 héttel az oltás után a keletkezett tumorokat szövettani vizsgálatnak vetettük alá, illetve a tumorsejteket trypsinos homogenizálás után a leírt módszerrel *in vitro* tovább tenyésztettük (MCR-kultúra).

*Scanning elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálat:* Mindhárom sejttípus (K-, MC-, MCR-kultúra) scanning elektronmikroszkópos vizsgálatnak vetettük alá. A sejteket Falcon petricsészébe helyezett fedőlemezen, 37 °C-on Heraeus szén-dioxidtermosztátban történő 2 napos inkubálással tenyésztettük, majd a kitapadt sejteket fiziológiás konyhasóoldattal történő mosás után 2,5% glutaraldehidet tartalmazó oldatban 48 órán át 4 °C-on fixáltuk. (Az utófixálást 30 percig végeztük 2%-os OsO<sub>4</sub>-ben (pH 7,2). A sejteket pufferrel történő mosás után acetonnal dehidráltuk. A preparátumok szárítása kritikus pont módszerrel, folyékony CO<sub>2</sub>-ben történt (Boyde és Wood 1969). Ezután az anyag felszínét szénréteggel és 200—300 Å vastagságú aranyréteggel fedtük (Hochvacuum-Technik Dresden B301 típusú készülék). A preparátumokat JSM-50A scanning elektronmikroszkóppal 20-kV gyorsító feszültség mellett vizsgáltuk.

### *Eredmények*

A scanning elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz felhasznált kezeletlen és MC-nel *in vitro* kezelt sejteket szövettenyészeti módszerekkel és egérbe történő visszaoltással hasonlítottuk össze. A sejttenyészetek morfológiai különbségeit fénymikroszkóppal, a sejtek növekedését alacsony koncentrációjú savót tartalmazó médiumban, a kolóniaképzést lágyagarban vizsgáltuk. Ezen kísérletekben a kezelt és a kezeletlen sejtek között jelentős különbségeket találtunk. Az eredmények — melyeket más helyen részletesen közlünk — arra utalnak, hogy a MC-nel kezelt sejtek malignusan transformálódtak. A malignus transformatio igazolását az jelentette, hogy a kezelt sejtek CBA T6T6 egerekre visszaoltva orsósejtes sarcomát okoztak. A kezeletlen kultúrák esetében, azonos számú sejttel történt oltás után nem fejlődtek ki tumorok. A tumorokból trypsinos homogenizálással nyert sejtek újratenyésztésekor szövettenyészetben ismét intenzíven szaporodtak.

A scanning elektronmikroszkópos morfológiai összehasonlító vizsgálat is a malignus transformatio bekövetkeztére utal. A közölt képek a kezeletlen kultúra esetében a 17., az MC-nel kezelt kultúra esetében a kezeléstől számított 7., a szövettenyésztésbe visszavitt (MCR-kultúra) sejteknél pedig az újratenyésztéstől számított 2. passzálásból nyert SEM preparátumoknak felelnek meg.

A kezeletlen kontroll sejtek tenyésztésében (K-kultúra) a sejtek közel párhuzamos elhelyezkedésűek, nem nőnek egymásra, közöttük bizonyos távolság van. Ez megfelel a fénymikroszkóposan észlelt állapotnak. A sejtek

ilyen, viszonylag rendezett növekedése a malignusan nem transformált kultúrák jellemző képe, a sejtek további osztódásának, egymásránövésének a kontakt gátlás jelensége szab határt. A sejtek felszínén változó alakú, részben gracilis mikrovillus-szerű, szélesebb nyelű, lángnyelvyszerű nyúlványok figyelhetők meg és azok alakulásában, eloszlásában bizonyos rendezettség látható. A sejtnyúlványok többnyire párhuzamosak, számuk viszonylag kevés (1. és 2. ábra).

A MC-nel kezelt, malignusan transformált kultúrákban jól megfigyelhető a sejtek sokirányú és többrétegben történő (multilayer, criss-cross) növekedése. A K-kultúrákban gátat szabó kontakt inhibíció itt nem érvényesül, a közvetlenül egymás mellett levő, vagy egymást keresztező sejtek is képesek osztódni. Az osztódásra készülő sejtek tagolt felszínű gömbalakokat öltönek. Úgy tűnik, hogy a sejtek volumene megnőtt. Jelentős változást mutat a sejtfelszín is. A sejtnyúlványok vaskosabbak, szélesebbek és lényegesen rendezetlenebb elhelyezkedésűek, mint a kezeletlen kultúra esetében, helyenként szinte lebernyegszerű, unduláló jellegűek. Az osztódáskor kötelékeiből kiszabaduló, lekerekedett sejtek felszíne a többiekéhez képest kevésbé tagolt (3. és 4. ábra).

Az állatokban 3 hét alatt kialakult tumorok reexplantált sejtjei malignus voltuknak megfelelően sűrűn egymás mellé és fölé burjánoznak, a kontakt inhibíció hiányának megfelelően többrétegű, keresztbe-kasul történő (multilayer, criss-cross) növekedést mutatnak.

Emellett a sejtek scanning elektronmikroszkóppal a sejtnyúlványok tekintetében jellegzetes képet adnak. Szembetűnő, hogy a sejtfelszín a kezeletlen, K-kultúrákhoz képest, de az *in vitro* malignusan transformált sejtek felszínéhez képest is tagoltabbá vált. A nagyszámú, gracilis mikrovillus-jellegű, egymást keresztező nyúlványoktól a sejtfelszín valósággal hollyossá vált. Érdekes jelenség, hogy az osztódásra készülő, lekerekedett sejtek felszíne is sokkal tagoltabb, mint az *in vitro* transformált, de állatban nem passzált kultúrák esetében (5. és 6. ábra).

### *Megbeszélés*

A CBA T6T6 egér embrió fibroblast sejtekből kialakított *in vitro* rendszerünkben egymás mellett vizsgálhatjuk a kezeletlen és a methylcholanthrenel malignusan transformált fibroblast sejtek morfológiai sajátosságait. A malignus transformatio bekövetkezését többféle módszerrel követtük és állatba való visszaoltás segítségével igazoltuk. Az egerekben kifejlődött tumorok sejtjeit ismét szövettani körülmények között vizsgálva összehasonlítottuk azokat az eredeti és a transformált kultúrákkal. A kísérletekben igen hasznos információt nyújtottak a scanning elektronmikroszkópos vizs-

gálatok. Megállapíthattuk, hogy a malignusan transformált sejtek tenyészetiben — a kezeletlen kultúra monolayer növekedésével szemben — jellegzetes a kontakt gátlás megszűnésével magyarázható korlátlan és több rétegben történő rendezetlen sejtnövekedés. Bár erről a jelenségről felvilágosítást nyújt a fénymikroszkópos vizsgálat is, a sejtek egymáshoz viszonyított térbeli elhelyezkedése és a sejtfelszíni képződmények, a scanning elektronmikroszkópos módszerrel lényegesen jobban tanulmányozhatók. Megfigyelhető, hogy a sejtnyúlványok sűrűségében, orientációjában és vastagságában a háromféle tenyészet sejttei között jelentős különbségek vannak. Az MCR-kultúra sejttei felszíni képződményeinek igen jellegzetes volta — de különösen a sejtfelszínen a malignus transzformációval párhuzamosan végbemenő változások gazdagsága — valószínűleg a közbeiktatott *in vivo* növekedésével együttjáró, megváltozott körülmények hatásával függ össze. Elképzelhető, hogy ezek a morfológiai változások nemcsak a vizsgált sejtvonalon, hanem más sejtkultúrák malignus transzformációja esetén is jelentkeznek. Az ilyen irányban kiterjesztett vizsgálatok alapot jelenthetnek a malignus transzformáció scanning elektronmikroszkópos jellemzéséhez.

Köszönetünket fejezzük ki Dr. Schaff Zsuzsának és Csikós András mérnöknek a SEM vizsgálatokban és preparálási technikában nyújtott irányításukért és segítségükért, valamint Dr. Kovács János tanszékvezető docens úrnak a scanning elektronmikroszkópos kapacitás biztosításért.

### Összefoglalás

A szerzők CBA T6T6 egér embrióból kialakított kultúrákat 20-methyl-cholanthrénnel *in vitro* malignusan transformáltak. Scanning elektronmikroszkóp segítségével hasonlították össze a kezeletlen és az MC-kezeléssel transformált, valamint a kezelt sejtekből származó tumorok szövettenyészetbe re-explantált sejteit. A 3 sejttípus jelentős eltérést mutatott a sejtek egymáshoz viszonyított helyzetében, valamint a felszíni képződmények számában és alakjában.

### IRODALOM

- Berwald Y. és Sachs L.: *Nature* (London) **200**, 1182, (1963).  
 Berwald Y. és Sachs L.: *J. Nat. Cancer Inst.* **35**, 641 (1965).  
 Boyde, A. és Wood C. J.: *Microscopie* **90**, 221 (1969).  
 Chen T. T. és Heidelberger C. J.: *Nat. Cancer Inst.* **42**, 903 (1969).  
 Dulbecco R. és Stoker M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **66**, 204 (1970).  
 Eagle H., Foley G. E. és Koprowski H.: *J. Exp. Med.* **131**, 863 (1970).  
 Edwards J. G. és Campbell J. A.: *J. Cell Sci.* **8**, 53 (1971).  
 Edwards J. G. és Williams J. P.: *Nature* (New Biol.) **231**, 147 (1971).  
 Fox T. C. Sheppard J. R. és Burger M. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 244 (1971).  
 Porter K. R. Todaro G. J. és Virginia Fonte: *J. Cell. Biol.* **50**, 633 (1973).  
 Sanford Katherine K. és *J. Nat. Cancer Inst.* **53**, 1481 (1974).  
 Schaff Zsuzsa, Lapis K. Berezesky Irene K.: *Orvosi Hetilap* **115**, 1236 (1974).

## MC-29 VÍRUSSEL FERTŐZÖTT CSIRKE-EMBRYÓ FIBROBLAST (CEC) KULTÚRÁKBAN MEGFIGYELHETŐ SAJÁTOS SEJTFELSZÍNI VÁLTOZÁSOK

PODMANICZKY ERZSÉBET, SZENDE BÉLA, LAPIS KÁROLY  
az MTA levelező tagja és FERENC GÉZA

Közlésre érkezett: 1975. VII. 10.

Porter, Todaro és Fonte (Porter, 1973) 1973-ban vírussal transformált Balb/3T3 egér-fibroblast kultúrák sejtfelszíni változásairól számoltak be. Scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján, szerzők megfigyelései szerint, SV-40 vírussal való fertőzés hatására megszűnik a kontakt inhibíció, eltűnnek a felszíni mikrovillusok és helyettük 1,0—5,0  $\mu\text{m}$  nagyságú „rügyek” (bleb-ek) jelennek meg különböző számban.

Egér-sarcoma vírussal transformált tenyészetekben 0,1  $\mu\text{m}$ -nál kisebb átmérőjű fonalakat figyeltek meg, melyek a sejtekből és a sejtek között futnak 10—15  $\mu\text{m}$  távolságra. Ezek természete nem tisztázott (Porter, 1973; Rubin, 1973).

de Harven és munkatársai (de Harven, 1973) a scanning elektronmikroszkóppal kimutatható „rügyeket” kvantitatív víruskimutatásra használták. Egér Friend erythroleukaemia sejteket vizsgáltak és megállapították, hogy a fertőzött sejtvonalon 2—3-szor nagyobb a „rügyszám”, mint a kontroll vonalakon.

Saját vizsgálataink célja volt vírussal fertőzött CEC sejtek felszíni változásának vizsgálata.

### *Anyag és módszer*

Kísérleteinket csirke-embryó fibroblast (CEC) tenyészeteken végeztük, melyeket MC-29 vírussal fertőztünk. A Phylaxia Baromfitenyésztő Vállalattól vett fogoly színű leghorn tyúktól származó, fehér tenyész-tojásból kapott vírusmentes embriókat használtuk. Az embriókból nyert fibroblast tenyészeteket 40 passage-on keresztül tartottuk fenn. A fertőzést az 5. passagekor végeztük el. Fertőző anyagként MC-29 vírusconcentratumot használtunk, melynek készítését A. J. Langlois és munkatársai (Langlois, 1974) írták le. A fertőzéshez használt eredeti MC-29 vírust a Department of Surgery, Duke University (Medical Center Durham, N. C.)-ből kaptuk (Lapis, 1975.).

A fertőzést egyrészt a 100%-os sűrítménnyel, másrészt annak 10— és 40-szeres hígításával végeztük (Lapis, 1973; Lapis, 1974; Lapis, 1974).

Anyagunkat a transmissios elektronmikroszkópos vizsgálathoz 2,5%-os glutaraldehidben fixáltuk, cacodyllal pufferezve (pH 7,2) 2%-os  $\text{OsO}_4$ -ban

utófixáltuk és Durcupánba ágyasztuk. Scanning elektronmikroszkópos vizsgálat hoz a sejteket in situ üveg fedőlemezen fixáltuk 48 órán át 2,5%-os — cacodylattal pH 7,2-re pufferezett — glutaraldehidben. Az utófixálást 30 percig végeztük OsO<sub>4</sub>-ban (2%) — Veronallal és 0,10 N sósavval pH 7,2-re puffereztük. A vizsgált sejtek 72 órás confluáló kulturából származtak a kontroll sejtekkel együtt.

### *Eredmények*

Transmissios elektronmikroszkóppal a fertőzött sejtekben nagyszámú vírus-particulumot találtunk és olykor megfigyelhettük a budding jelenséget is (1. ábra).

Ugyanabból a tenyészetből származó, de vírussal nem fertőzött sejtekben vírus-particulumokat kimutatni nem tudtunk.

Scanning elektronmikroszkóppal a kontroll sejtek felszínén számos microvillust figyelhettünk meg (2. ábra). A fertőzött sejtek felszínén — a microvillusok mellett — megtaláltuk a Porter (Porter, 1973) által is leírt blebeket. Ezek elrendeződése szabálytalan, törvényszerűséget nem mutat. Gömbalakúak, sok helyen a sejttel csak látszólag vékony kocsánnyal függenek össze, máshol csak kezdődő — félgömbszerű — kidomborodás látható. Átmérőjük 29 700 szoros össznagyítás mellett 3—6 mm, átlagosan 4,5 mm.

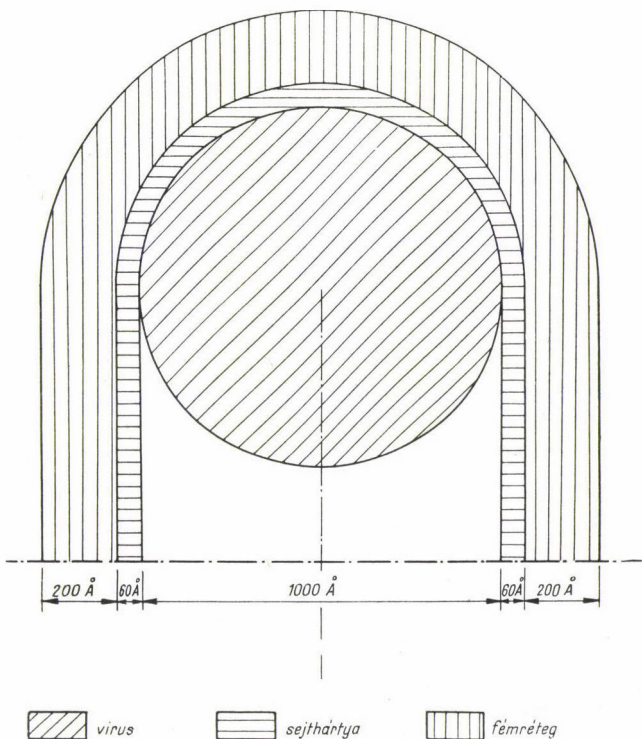
A koncentrált vírussal fertőzött esetekben egy-egy sejt felett átlagban 25 „rügy” található. A tízszeresen hígított víruskészítménnyel fertőzött esetekben átlagban 5. Már e számokból is kitűnik az összefüggés a vírus-concentratio és a „rügyszám” között.

### *Megbeszélés*

Megállapíthatjuk, hogy míg a nem fertőzött 72 órás confluáló monolayert alkotó CEC tenyészetekben transmissios elektronmikroszkóppal nem találtunk vírust, sem scanning elektronmikroszkóppal „rügyet”, a fertőzött tenyészetekben találtunk. Scanning elektronmikroszkóppal — mint Porter és de Harven (Porter, 1973; de Harven, 1973) — mi is meg tudtuk figyelni a „rügyek” jelenlétét a sejtek felszínén.

Jelentősnek tartjuk, hogy a „rügyek” száma egyenes arányban változott a vírus koncentrációjával. A „rügyek” jelenléte a fertőzött és hiánya a kontroll kultúrákban mindenképpen arra utal, hogy összefügg a vírusfertőzéssel. Másik bizonyíték az összefüggésre az, hogy a fertőzésre használt víruskészítmény felhígításával arányosan csökken a fertőzött kultúrákban a sejtek felszínén megjelenő „rügyek” száma. A „rügyek” nagyságrendje átlagosan 150 Å (Lapis, 1973). A preparálás folyamán 200 Å vastagságú réteg kerül a





5. ábra. A fertőzött sejtek felszínén található „rügy” elképzelt szerkezetének sémás ábrája.

sejtek és így a „rügyek” felszínére. Térbeli megjelenésük miatt ezt a réteget kétszer kell figyelembe venni (5. ábra). Elképzélhető, hogy ezen „rügyek” centrumában maga a vírus foglal helyet. További szisztematikus adatgyűjtés szükséges ahhoz, hogy a vírus titrálására ez a módszer alkalmas lehessen, ahogy ezt de Harven állította (de Harven, 1973).

Megemlítjük, hogy Porter és mtsai (1973) valamint Hale és mtsai (1975) normál kínai hörcsög, illetve normál csirke embrió fibroblastok felszínén nagyméretű „rügyeket” találtak, miután ezen tenyészetek sejtjeit thymidin túladagolásával  $G_1$  fázisba hozták. Az említett szerzők által közölt képeken látható „rügyek” azonban nagyságrendileg nagyobbak, mint az általunk vírus-fertőzés után megfigyelt sejtfelszíni kiemelkedések. Figyelemre méltó, hogy ugyancsak fenti szerzők nem találtak sejtfelszíni „rügyeket” confluens kultúrákban helyet foglaló,  $G_1$  fázisban levő sejtek felszínén. Tekintettel arra, hogy azon időpontban, melyben saját vizsgálatainkat végeztük, a sejtek már confluens monolayer kultúrát alkottak, nem meglepő, hogy a kontroll sejtek felszínén sem kis-, sem nagyméretű „rügyeket” nem tudtunk megfigyelni.

### Összefoglalás

MC-29 vírussal fertőzött CEC kultúrák transmissió és scanning elektronmikroszkópos vizsgálatát elvégezve azt találtuk, hogy a fertőzött kultúrák tápfolyadékában, a fertőzött sejtekben intracellularis vacuolumokban C-typusú vírustestek jelennek meg. Észleltük a budding jelenségét is. Scanning elektronmikroszkópos vizsgálatokkal a fertőzött sejtek felszínén úgynevezett „rügyek” észlelhetők, melyek száma arányban áll a fertőzésre használt víruskészítmény hígítási fokával, nagyságuk alapján pedig feltételezhető, hogy centrumukban vírus helyezkedik el. A kontroll sejtekben sem vírust, sem „rügyet” nem tudunk kimutatni.

Fenti megfigyeléseink megerősítik de Harven korábbi észleléseit. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a vírussal fertőzött kultúrákban a sejtfelszínen megjelenő „rügyek” számára vonatkozó meghatározások alkalmasak lehetnek a víruskészítmények koncentrációjának hozzávetőleges, vagy megközelítő meghatározására.

Szerzők köszönetüket fejezik ki dr. A. J. Langloisnak a vírus rendelkezésre bocsátásáért, dr. Schaff Zsuzsanna adjunktusnőnek a scanning elektronmikroszkópos technikára vonatkozó hasznos tanácsaiért, Molnár Sándornénak és Beczner Kálmánnak a technikai segítségért, valamint dr. Kovács János tanszékvezető docens úrnak a scanning elektronmikroszkópos kapacitás biztosításáért.

### IRODALOM

- De Harven, E., Lampen, N., és Sato, T.,: *Virology* **51**, 240 (1973).  
 Hale, A. H., Winkelhake, J. L. és Weber, M. J.,: *J. Cell Biol.* **64**, 398 (1975).  
 Langlois, A. J., Lapis, K., Ishizaki, R., Beard, J. W., és Bolognesi, D. P.,: *Cancer Res.* **34**, 1457 (1974).  
 Lapis Károly: *Orvostudomány* **25**, 277 (1974).  
 Lapis K., Beard, Dorothy, és Beard, J. W.,: *Orvostudomány* **24**, 229 (1973).  
 Lapis K., Beard, Dorothy és Beard, J. W.,: *Orvostudomány* **25**, 151 (1974).  
 Lapis K., Beard, Dorothy és Beard, J. W.,: *Cancer Res.* **35**, 132 (1975).  
 Porter, K. R., Todaro, G. J., és Virginia Fonte.,: *J. Cell Biol.* **50**, 633 (1973).  
 Porter, K. R., Prescott, D., és Frye, J.,: *J. Cell Biol.* **57**, 815 (1973).  
 Rubin, R. W., és Everhart, L. P.,: *J. Cell Biol.* **57**, 837 (1973).

## A TESZTOSZTERON 19. METIL CSOPORTJÁNAK JELENTŐSÉGE AZ ANDROGÉN HATÁS BIOKÉMIAI MECHANIZMUSÁBAN

TÓTH MIKLÓS, az orvostudományok kandidátusa,  
ZAKÁR TAMÁS, ANTONI FERENC, a biológiai tudományok doktora

Közlésre érkezett: 1975. XII. 15.

A tesztoszteron 19-dezmetil származéka, a 19-nortesztoszteron<sup>1</sup> az ún. anabolikus szteroidok csoportjába tartozik. Ez volt az első kémiai úton előállított tesztoszteron származék, amelyről kimutatták, hogy ivaréretlen vagy kasztrált hím patkánynak adagolva a m. levator ani<sup>2</sup> jelentős súlynövekedését okozza, de a járulékos hím nemi mirigyek (vesicula seminális, prosztata) súlynövekedésére alig van hatással (Hershberger és mtsi, 1953). Bár ebből az eredményből az anabolikus hatásra *per se* következtetni elvileg kifogásolható (Nimni és Geiger, 1957, Hayes, 1965) mégis érdekes az a probléma, hogy miért okozza a tesztoszteron e csekély szerkezeti módosítása az említett szervekre gyakorolt hatásában észlelt igen jelentős különbséget.

Figyelembe véve a tesztoszteron hatásmechanizmusáról az utóbbi évtizedben végzett kutatásokat, meg kívántuk vizsgálni, hogy a 19-nortesztoszteron patkány vesicula seminálisában észlelt, de a tesztoszteronnal összehasonlítva jelentősen csökkent androgén hatásának mi a biokémiai magyarázata. Számos vizsgálat eredménye támasztja alá, hogy a tesztoszteron a patkány járulékos nemi mirigyeiben részben dihidrotesztoszteronná alakul át, ami először nagy affinitással a citoplazmában található specifikus receptor fehérjéhez kötődik, majd ezt követően a szteroid-receptor komplex bekerül a sejtmagba, ahol a kromatin DNS-éhez és ún. „akceptor” fehérjéihez kapcsolódik (Bruchovsky és Wilson 1968, 1968 a, Anderson és Liao 1968, Mainwaring 1969, Tveter és Unhjem 1969, Unhjem és Tveter 1969, Fang és mtsi 1969, 1971, Baulieu és Jung 1970, Tymoczko és Liao 1971, Mainwaring és Peterken 1971, Steggles és mtsi 1971, Rennie és Bruchovsky 1972, 1973, Nozu és Tamaoki 1974). A kromatinhoz kötött komplex eddig még nem tisztázott módon az RNS polimeráz aktivitásának (Hancock és mtsi 1962, Liao és mtsai 1965) és az RNS szintézis sebességének (Wicks és Kenney 1964, Ito és mtsi 1966, Tóth 1968) fokozódásához vezet. Különösen a nukleoláris RNS polimeráz aktivitása nő (Davies és Griffiths 1973) és a riboszóma RNS szintézise gyorsul

<sup>1</sup> A következő triviális szteroid elnevezéseket használjuk: tesztoszteron = 17 $\beta$  hidroxil-4-androsztén-3-on; dihidrotesztoszteron = 17 $\beta$  hidroxil-5 $\alpha$ -androsztán-3-on; 19-nortesztoszteron = 17 $\beta$  hidroxil-4-ösztén-3-on; dihidro-nortesztoszteron = 17 $\beta$  hidroxil-5 $\alpha$ -ösztán-3-on

<sup>2</sup> Pontosabb neve: m. bulbocavernosus dorsalis (Hayes, 1965).

(Liao és mtsi 1966, Liao és Lin 1967). Nő a sejtek mRNS tartalma (Liao és Williams-Ashman 1962, Liao 1965, Mainwaring és mtsi 1974, 1974 a) de különösen nagy mértékű a túlnyomóan poliszóma formában található riboszómák felhalmozódása (Szirmai és mts 1965, Tóth 1970, Mainwaring és Wilce 1973).

Közleményünkben beszámolunk azokról a vizsgálatokról, amelyekben a vesicula seminális specifikus citoplazmatikus és magi androgén kötőhelyeinek szerepét a 19-nortesztozteron és a tesztoszteron RNS szintézisre kifejtett eltérő mértékű hatásában kívántuk meghatározni.

### Módszerek és anyagok

Vesicula seminálisokat felnőtt hím patkányokból (Wistar törzs) nyertünk a kasztrálást követő 5. vagy 6. napon. A vesiculák vagdalékát Krebs-féle foszfát pufferes médiumban (Krebs 1950) inkubáltuk, 10–500 nM szteroid kompetitor jelenlétében 10 nM  $^3\text{H}$ -tesztoszteronnal vagy 4 nM  $^3\text{H}$ -dihidrotesztozteronnal 60 percig 37 °C-on. A kontrolrendszer kompetitort nem tartalmazott. Az inkubálás oxigén atmoszférában, állandó rázatással történt. Ezt követően a reakcióelegyet jeges fürdőben lehűtöttük, a vagdaléket hideg fiziológiás sóoldattal leöblítettük, homogenizáltuk 0.33 M szaharóz, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 3 mM  $\text{CaCl}_2$  tartalmú médiumban (A médium). A homogenátot szűrtük 4 réteg gézen. A szűrletet centrifugáltuk 10 percig 900 g-vel (Beckmann J-21 centrifugán), így nyers cytoszól és magfrakciót nyertünk.

A nyers cytoszól frakciót 60 percig 230 000 g-vel centrifugáltuk (Beckmann-Spenco L2 65B centrifugán), az így kapott felülülő a *cytoszól frakció*. A nyers magfrakciót A médiummal mostuk és szuszpendáltuk 34 ml 2,4 M szaharóz, 3 mM  $\text{CaCl}_2$  oldatban (B oldat). A szuszpenziót 5 ml tiszta B oldat fölé rétegeztük és 60 percig centrifugáltuk 22 500 pecenkénti fordulatszámmal a Spenco SW 27 rotort használva (Chauveau és mtsi 1956, Liao és mtsi 1973). A tisztított magfrakciót C oldattal (Rennie és Bruchofsky, 1972 : 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM EDTA, 1 mM merkaptotanol, 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) kétszer mostuk, végül 2 ml 1 M NaCl tartalmú C oldatban szuszpendáltuk. A szuszpenzió egy éjjelen át állt +5 °C-on, majd ultrahang kezeléssel (ARTEK, Sonic 300 Dismembrator, medium tip, 60% teljesítményállásban, 2 percig 0 °C-on) a magokat dezintegráltuk és *homogenizált magfrakcióhoz* jutottunk.

*A cytoszól frakció feldolgozása* — A cytoszól frakciót 30 szoros térfogat D oldattal (2 mM merkaptotanol, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) szemben egyensúlyig dializáltuk +5 °C-on 45 órán át. Feleslegben adott nem jelölt dihidrotesztozteron ez alatt az idő alatt nem cserélte ki a kötött  $^3\text{H}$ -dihidrotesztozteront. A dializált cytoszól fehérjetartalmát meghatároztuk (Lowry és mtsi, 1951) és mind a dializált oldat, mind pedig a dializáló puffer aliquot részéből

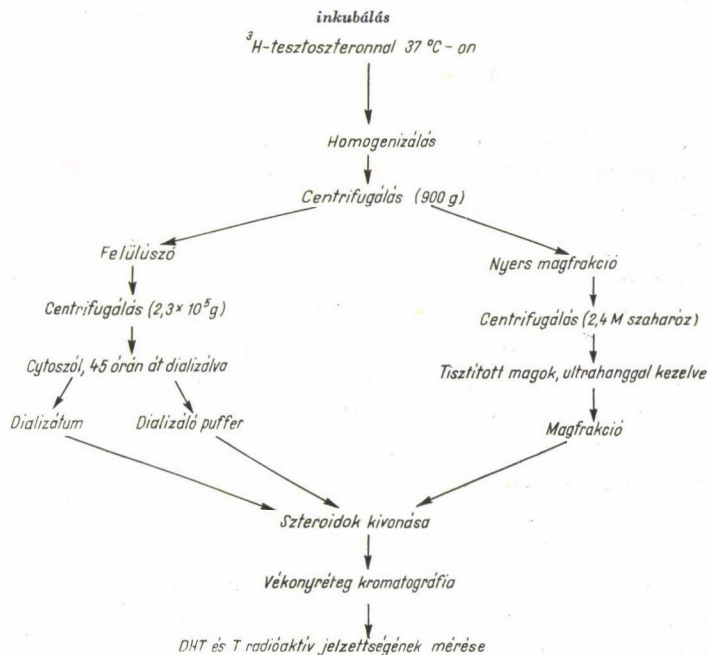
kvantitatív szteroid kivonást végeztünk,  $2 \times 3$  térfogat dietiléterrel és  $1 \times 3$  térfogat kloroformmal (Buric és mtsi 1972).

**A magfrakció feldolgozása** — Aliquot részekből DNS (Dische 1955) és fehérje tartalmat határozunk meg. Fehérjemeghatározásnál lószérum-albumint, DNS meghatározásnál lazac sperma DNS-t használtunk standardként. Magpreparátumainkban a fehérje/DNS arány 3,0—6,0 között változott. A frakció többi részét extraháltuk  $1 \times 3$  tf. éterrel,  $2 \times 3$  tf. kloroformmal és  $3 \times 3$  tf. diklórmétánnal.

**Vékonyrétegekromatográfia** — A cytoszól dializissel elválasztott két frakciójának és a magfrakciónak az extraktumát vákuumban bepároltuk majd Kieselgél HF<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt NSZK) vékonyrétegen kromatografáltuk tesztoszteron és dihidrotesztoszteron karrierekkal. Futtatószernek kloroform-éter 90 : 10 vagy 85 : 15 elegyét használtuk (Anderson és Liao 1968). A foltok lokalizálását ultraibolya fényben illetve jódgőz adszorpcióval végeztük. A karriereket hordozó gélrészeket lekapartuk, 2 percig 1 ml metanollal ráztuk, szcintillátor koktélt mértünk hozzá és mértük a radioaktivitást.

**Rádióaktivitás mérése** — A mintákhoz 10 ml szcintillátor koktélt (0,4% PPO, 0,005% POPOP toluolban) adtunk. A radioaktivitást Packard Tri-Carb 2425 spektrométerrel, 43% hatásfokkal mértük.

**Számítások a mért értékekből** — A dializált cytoszól és a dializáló puffer egységnyi térfogataiban mért radioaktivitások különbsége felelt meg a fehérjé-



I. ábra. A kísérleti módszer sémája.

hez kötött radioaktivitásnak. A magból mosással el nem távolítható radioaktivitást maghoz kötöttnek tekintettük. A megkötött radioaktívan jelzett dihidrotesztoszteron és tesztoszteron mennyiségét a magban cpm/mg DNS, a cytoszól esetében pedig cpm/mg fehérje értékekre számítottuk ki. Módszereinket vázlatosan az 1. ábra foglalja össze.

*Tesztoszteron és 19-nortesztoszteron hatása az RNS/DNS hányadosra* — Kasztrált patkányok különböző csoportjait kezeltük a levágás előtt 4 napon át tesztoszteron fenilpropionát illetve nortesztoszteron fenilpropionát különböző dózisaival. A szteroid észtereket etilalkohol-etilénglikol 1 : 1 arányú keverékében oldottuk és 0,2 ml-t adagoltunk intraperitoneálisan. A kasztrálás után 17. napon levágott állatok vesiculáinak RNS és DNS tartalmát Schmidt-Tannhauser-Schneider egyesített módszerével (v. ö. Leslie 1955) határoztuk meg. Az orcin reakció (Mejbaum 1939) értékelésében alkalmaztuk a Dische és mtsi (1953) által kidolgozott korrekciós eljárást.

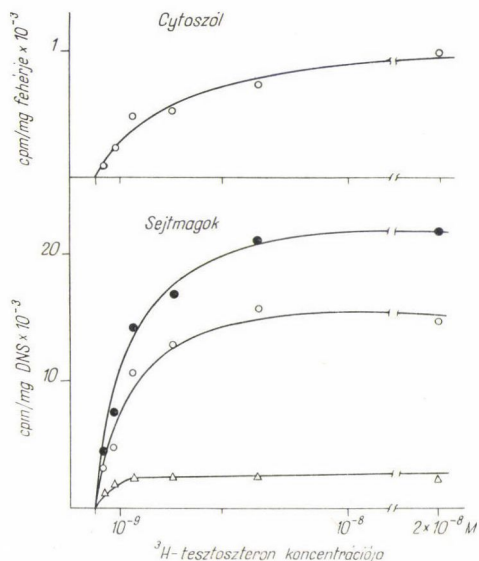
*Felhasznált szteroidok* — 1,2,6,7 (n)  $^3\text{H}$ -tesztoszteron (87 Ci/mmól) és  $5\alpha$ -dihidro ( $1\alpha$ ,  $2\alpha/\text{n}$ - $^3\text{H}$ ) tesztoszteron (47 Ci/mmól) The Radiochemical Centre (Amersham, Anglia) termékei. Tesztoszteront és 19-nortesztoszteront, valamint ezek fenilpropionát észtereit a Kőbányai Gyógyszerárúgyár bocsátotta rendelkezésünkre. Dihidrotesztoszteront Szentirmai A. (Gyógyszeripari Kutató Intézet, Budapest), dihidro-nortesztoszteront W. Klyne professzor és D. N. Kirk (Westfield College, London) ajándékként kaptunk. Valamennyi szteroid kromatográfiásan vizsgálva tisztának bizonyult.

### Eredmények

Vesicula vagdalék 1.0—1.5 gramját inkubáltuk  $37^\circ\text{C}$ -on különböző koncentrációjú  $^3\text{H}$ -tesztoszteronnal 60 percig és vizsgáltuk az inkubálás során képződött  $^3\text{H}$ -dihidrotesztoszteron kötődését. A 2. ábra mutatja, hogy mind a cytoszól fehérjék mind a sejtmagok dihidrotesztoszteron-kötő képessége limitált, és már alacsony, kb. 6 nM tesztoszteron koncentrációnál telítődik. Feltűnő, hogy a cytoszól fehérjék és a sejtmagok dihidrotesztoszteron kötése a különböző tesztoszteron koncentrációknál párhuzamosan változik, és a magfrakcióban mindig található  $^3\text{H}$ -dihidrotesztoszteron mellett kis mennyiségű  $^3\text{H}$ -tesztoszteron is. A  $^3\text{H}$ -tesztoszteron a cytoszól fehérjékhez viszont gyakorlatilag nem kötődik.

Telítési (10 nM)  $^3\text{H}$ -tesztoszteron koncentrációnál inkubálva — mint az 1. táblázat mutatja — azt találtuk, hogy a magfraakcióban visszkapott illetve a cytoszól fehérjékhez kötött jelzett szteroidok túlnyomó részét a  $^3\text{H}$ -dihidrotesztoszteron képezi. Ez a kötődés szelektív, mivel a cytoszól szabad szteroid frakciójában csak kb. 30%  $^3\text{H}$ -dihidrotesztoszteront találtunk. A táblázat adataiból következik az is, hogy a dihidrotesztoszteron mennyiségének aránya a magban, a cytoszól szabad és kötött frakciójában kb. 2:4:1, tehát a  $^3\text{H}$ -

dihidrotesztoszteron jelentékeny része kötött formában van. Figyelembe véve a <sup>3</sup>H-dihidrotesztoszteron specifikus radioaktivitását kiszámítható, hogy a megkötött szteroid mennyisége a cytoszól fehérje esetében 0,4 pmól/g szövet, a magok esetében pedig 1 pmól/g szövet.



2. ábra. A cytoszól fehérjék és a sejtmagok dihidrotesztoszteron (-o-) kötése különböző <sup>3</sup>H-testoszteron koncentrációknál végzett, 60 percig tartó inkubálás után. A sejtmagok összes szteroid (-●-) és tesztoszteron (-△-) felvételét is feltüntettük.

Tekintettel arra, hogy a kis kapacitású, de nagy affinitású dihidrotesztoszteron kötőhelyek a cytoszól és a sejtmag receptor fehérjéire jellemzők, megvizsgáltuk, hogy 10 nM, tehát telítési koncentrációban adott <sup>3</sup>H-testoszteron-

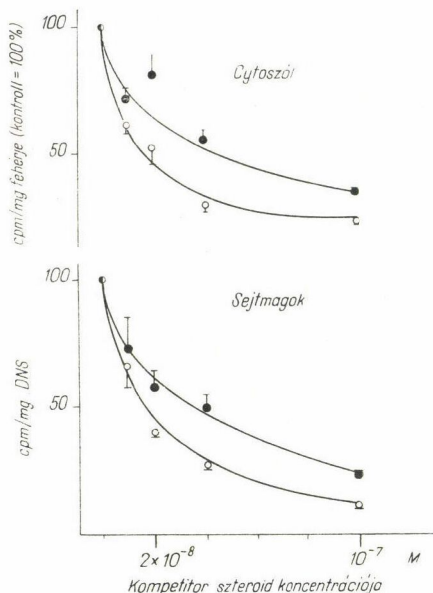
I. táblázat

A magfrakció és a cytoszól frakció <sup>3</sup>H-dihidrotesztoszteron és <sup>3</sup>H-testoszteron tartalma vesicula vagdalék 10 nM <sup>3</sup>H-testoszteronnal 1 órán át történt inkubálása után. (átlag ± S.D.; n = 6)

	DPM/g szövet	% DHT	% T
MAG	2,33 × 10 <sup>5</sup> ± 3,1 × 10 <sup>4</sup>	83 ± 4	7 ± 0,7
CYTOSZÓL			
a) szabad	1,35 × 10 <sup>6</sup> ± 1,65 × 10 <sup>5</sup>	29 ± 3	11 ± 2
b) kötött	1,05 × 10 <sup>5</sup> ± 1,2 × 10 <sup>4</sup>	73 ± 11	<5

DHT = Dihidrotesztoszteron  
T = Tesztoszteron

nal együtt a rendszerbe vitt 10—100 nM 19-nortesztozsteron hogyan befolyásolja a cytoszól és a magi  $^3\text{H}$ -dihidrotesztozsteron-receptor komplexek kialakulását. Kontrollként a nortesztozsteron helyett nem jelzett tesztozsteront tartalmazó reakcióelegyet állítottunk be. Az eredményeket a 3. ábra foglalja össze.



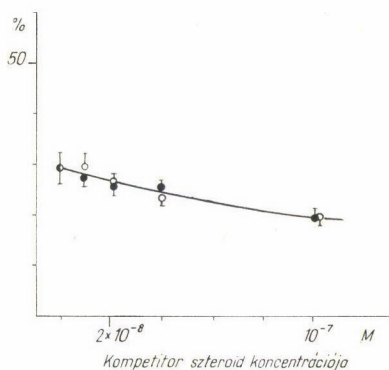
3. ábra. Különböző koncentrációjú 19-nortesztozsteron (●) illetve tesztozsteron (○) hatása  $^3\text{H}$ -dihidrotesztozsteron kötődésére a cytoszól és magi receptorokhoz. A vesicula vagdalékot 60 percen át inkubáltuk 10 nM  $^3\text{H}$ -tesztozsteron és az ábrán jelzett koncentrációjú kompetitor szteroid jelenlétében. Három kísérlet alapján az átlag  $\pm$  S. D. van feltüntetve.

A tesztozsteron hozzáadásával kapott kompetíciós görbék összevetése az elméletileg várható kompetícióval lehetővé teszi annak meghatározását, hogy az aspecifikus, azaz nagy kapacitású és kis affinitású, nem telíthető kötőhelyek kötése mekkora részét képezi a mért kötési értékeknek. Ez a rész a cytoszól fehérjék esetében a kontroll rendszerben mért kötésnek 15%-át, sejtmagok esetében pedig mindössze 5%-át teszi ki.

Az ábrából látható, hogy 19-nortesztozsteron hatására mind a cytoszól mind a magi receptor- $^3\text{H}$ -dihidrotesztozsteron komplexek képződése visszaszorul, de nem annyira, mint azonos koncentrációjú tesztozsteron hatására. Mind a cytoszól mind a magi receptor esetében 50%-os kompetíció eléréséhez mintegy kétszer akkora (30—40 nM) 19-nortesztozsteron koncentrációra van szükség mint az ugyanezt az effektust eredményező tesztozsteron koncentráció (15—20 nM). Megfordítva, ez azt jelenti, hogy a szövetmintában akkor keletkezik ugyanannyi 19-norszteroid-receptor és dihidrotesztozsteron-receptor komplex amikor az inkubáló médiumban a nortesztozsteron-tesztozsteron koncentrációk aránya kb. 2 : 1.



Mint említettük, kísérleteinkben a  $^3\text{H}$ -tesztoszteron egyik metabolitjának a kötődését vizsgáltuk. Ezért lehetséges, hogy a mért különbség részben vagy egészben arra vezethető vissza, hogy a metabolit képződésének sebessége a 19-nortesztoszteront illetve a tesztoszteront tartalmazó elegyekben nem egyforma. A 4. ábrából azonban az látható, hogy a cytoszól szabad

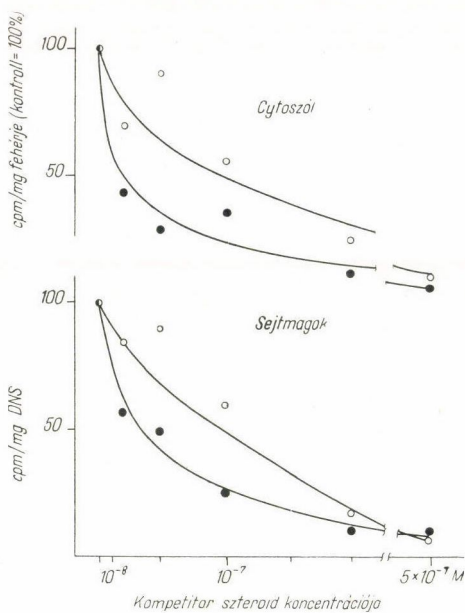


4. ábra. A  $^3\text{H}$ -dihidrosztoszteron százalékos aránya a cytoszól szabad szteroid frakciójában a vesicula vagdalék 10 nM  $^3\text{H}$ -tesztoszteron és az ábrán jelzett koncentrációjú 19-nortesztoszteron (-●-) illetve tesztoszteron (-○-) jelenlétében 60 percen át végzett inkubálása után. Három kísérlet alapján az átlag  $\pm$  S. D. értékeket tüntettük fel.

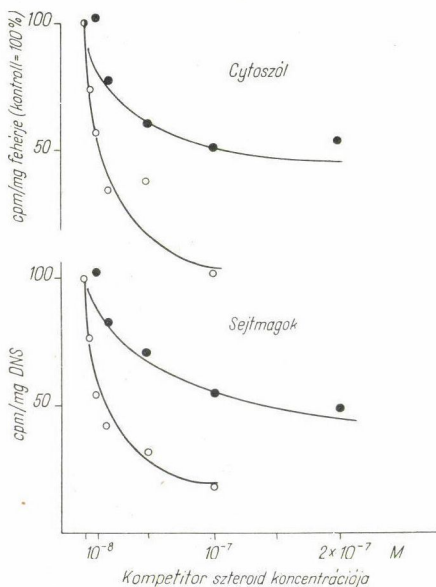
szteroidokat tartalmazó frakciójában visszanyert  $^3\text{H}$ -dihidrotesztoszteron mennyisége megközelítően azonos, akármelyik kompetitorral is végeztük az inkubálást. Arra kell tehát gondolnunk, hogy a nortesztoszteron és/vagy valamelyik metabolitja kötődik a cytoszól receptorhoz.

Ez elsősorban a nortesztoszteron  $5\alpha$ -redukált származékáról feltételezhető, ezért összehasonlítottuk 19-nortesztoszteron és dihidro-nortesztoszteron kompetitív hatását a  $^3\text{H}$ -dihidrotesztoszteron kötődésére a receptorhoz a  $^3\text{H}$ -tesztoszteronnal inkubált vesicula szövetben (5. ábra). Azt találtuk, hogy a dihidro-nortesztoszteron mintegy háromszor kevésbé hatékony kompetitor. Valószínű tehát, hogy akárcsak a prosztata receptor esetében (Liao és mtsi 1973) a vesicula seminálisban is a 19-nortesztoszteron nagyobb affinitással kötődik a cytoszól és magi receptorhoz mint  $5\alpha$ -dihidro származéka.

Azzal a céllal, hogy közvetlenül összehasonlítsuk a 19-nortesztoszteron és a dihidrotesztoszteron affinitását a receptorokhoz, a vesicula vagdalékokat 4 nM  $^3\text{H}$ -dihidrotesztoszteronnal inkubáltuk és megvizsgáltuk különböző koncentrációjú nortesztoszteron illetve nem jelzett dihidrotesztoszteron kompetitív hatását a  $^3\text{H}$ -dihidrotesztoszteron kötődésére (6. ábra). Mind a cytoszól mind a magi receptor esetében a kötés 50%-os gátlását a dihidrotesztoszteronhoz képest mintegy tízszer magasabb koncentrációjú nortesztoszteronnal lehetett elérni. Ha figyelembe vesszük, hogy a  $^3\text{H}$ -tesztoszteronból az inkubáláskor keletkező 20–30%  $^3\text{H}$ -dihidrotesztoszteron képes csak kötődni a



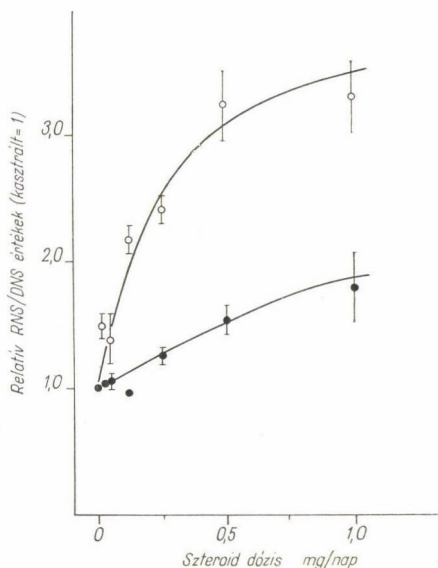
5. ábra. Különböző koncentrációjú dihidro-norteszteszteron (-○-) illetve 19-norteszteszteron (-●-) hatása  $^3\text{H}$ -dihidroteszteszteron kötődésére a receptorhoz. A vesicula vagdaléket 60 percen át inkubáltuk  $7,5 \text{ nM}$   $^3\text{H}$ -tesztoszteron és az ábrán jelzett koncentrációjú kompetitor szteroid jelenlétében.



6. ábra. Különböző koncentrációjú 19-norteszteszteron (-●-) és dihidroteszteszteron (-○-) hatása  $^3\text{H}$ -dihidroteszteszteron kötődésére a receptorokhoz. A vesicula seminális vagdalékát 60 percen át inkubáltuk  $4 \text{ nM}$   $^3\text{H}$ -dihidroteszteszteron és az ábrán feltüntetett koncentrációjú kompetitor szteroid jelenlétében.

receptorhoz, a 3. ábrán és a 6. ábrán bemutatott kísérletek egyaránt arra mutatnak, hogy a 19-nortesztozsteronnak mintegy tízszer kisebb az affinitása a receptorokhoz mint a dihidrotesztozsteronnak.

A következőkben arra kívántunk információkat kapni, hogy a tesztozsteron és a 19-nortesztozsteron hogyan befolyásolják a kasztrált állat vesiculá-



7. ábra. Tesztozsteron (○) és 19-nortesztozsteron (●) fenilpropionát észtereinek hatása kasztrált patkányok vesicula seminálisának RNS/DNS hányadosára. Az állatok különböző csoportjait (4–6 állat) 4 napon át kezeltük az ábrán jelzett adagokban adott szteroid észterekkel. 4–8 meghatározás átlagát ( $\pm$  S. D.) tüntettük fel.

jában az RNS szintézis sebességét. Mint már említettük, androgén hatásra a vesicula sejtekben fokozódik az RNS szintézis sebessége és ennek eredményeképpen növekszik a sejtek RNS tartalma. A vesicula sejtek RNS tartalmának növekedése — ami az RNS/DNS hányados mérésével nyomonkövethető — az RNS szintézis fokozódásának mértéke (Tóth 1968). Ennek alapján hasonlítottuk össze a tesztozsteron és a 19-nortesztozsteron kezeléseket hatásukat kasztrált patkányok vesicula seminálisainak RNS/DNS hányadosára. A kétféle szteroid fenilpropionát észtereinek adásával dóziszválasz görbéket vettünk fel (7. ábra). A dózis-válasz görbékből leolvasható, hogy azonos RNS/DNS hányados fokozódás eléréséhez a tesztozsteronhoz képest mintegy nyolcszor nagyobb 19-nortesztozsteron dózissra volt szükség, az RNS szintézis fokozásában a tesztozsteron tehát kb. nyolcszor hatékonyabb mint 19-dezmetil származéka.

### Megbeszélés

Kísérleteinkben a receptorhoz történő kötődés vizsgálatára a kompetíciós módszert használtuk, így a drága  $^3\text{H}$ -nortesztozsteronra nem volt szükség. A kötési kísérleteket szövetvagdalékkal végeztük, ami azzal a hátránnyal jár, hogy a szteroid metabolizmust is figyelembe kell venni, előnye viszont az, hogy a feldolgozás során receptor-szteroid komplexszel dolgozhatunk, ami a receptornál stabilabb. Így értük el, hogy eredményeink reprodukálhatóak és jól értékelhetők voltak.

Kimutattuk, hogy a cytoszól fehérjék és a sejtmagok az inkubáláskor szelektíven, kis kapacitással és nagy affinitással kötik a dihidrotesztozsteront. E kötődés kimutatását elősegítette a kismértékű aspecifikus kötődés, ami részben annak köszönhető, hogy kasztrálás után 5—6 nappal a mirigyek fehérjetartalma erősen csökkent. A cytoszól kötőkapacitására viszonylag alacsony értéket kaptunk, aminek oka az lehet, hogy a fehérjetartalom csökkenése alól — úgy látszik — a cytoszól receptor fehérje sem kivétel (Bruchovsky és Craven, 1975). A magi kötőhelyek száma, figyelembe véve, hogy 1 g vesicula szövetben 3,4 mg DNS (Tóth, 1971) és 1 magban 9,6 pg DNS (Verderly 1955) található, az 1 pmól/g szövet értékből számítva kb. 1900 kötőhely/sejtmag. Ez összhangban van azzal, hogy az androgén (Fang és mtsi 1971, Rennie és Bruchovsky 1972, Mainwaring és Peterken 1971), ösztrogén (Maurer és Chalkley 1967, Baulieu és mtsi 1972) és progreszteron (O'Malley és Means 1974) kötőhelyek számát a célszervek sejtmagjaiban magonként néhány ezerre becsülik.

Kompetíciós kísérleteink eredményeit és a belőlük levont következtetéseket az alábbiakban foglalhatjuk össze: a) Azonos koncentrációjú tesztozsteron illetve 19-nortesztozsteron jelenlétében a  $^3\text{H}$ -tesztozsteron átalakítása  $5\alpha$ -dihidro származékká hasonló sebességgel folyik, ami arra mutat, hogy a vesicula seminálisban található  $5\alpha$ -reduktáz, akárcsak a prosztata hasonló enzime (Shimazaki és mtsi 1971), nem tesz különbséget a tesztozsteron és a 19-nortesztozsteron között.

b) A dihidrotesztozsteron, a 19-nortesztozsteron és a dihidronortesztozsteron relatív affinitása a vesicula receptorokhoz 100 : 10 : 3. Hasonló kísérleti feltételek mellett a prosztata magok esetében ugyanezt az affinitási sorrendet de kisebb arányokat (100 : 70 : 60) találtak (Liao és mtsi 1973). Az eltérés magyarázatát a két vizsgálathoz felhasznált szövetminták eltérő szteroid metabolizmusában kereshetjük. Erre utal az is, hogy a prosztata vagdalékot mintegy húszszor magasabb  $^3\text{H}$ -tesztozsteron koncentrációnál kell inkubálni ahhoz, hogy a magok dihidrotesztozsteronnal telítődjenek, mint kísérleteinkben a vesiculák vagdalékát (Fang és mtsi 1969).

A 19-nortesztozsteronról kimutatták, hogy prosztata receptorhoz közvetlenül képes kapcsolódni, mégpedig nagyobb affinitással mint  $5\alpha$ -dihidro

származéka (Liao és mtsi 1973). Úgy látszik, ez a vesicula receptorra is érvényes, mivel kevésbé valószínű, hogy valamilyen egyéb norszteroid legyen a legjobban kötődő metabolit. A 3-oxo- és 17  $\beta$ -hidroxi csoportok szóbajöhető enzimatisz átalakítása ugyanis tesztoszteron esetében mindig az androgenitás nagymértékű csökkenésével járt (Murphy, 1969, Liao és mtsi 1973).

c) A receptorok dihidrotesztoszteron kötésének vizsgálata különböző tesztoszteron koncentrációknál azt mutatta, hogy a cytoszól receptor és a magi receptor kötése között párhuzam van. Ezért a kompetíciós kísérletek nem zárják ki azt a lehetőséget, hogy a cytoplazmában képződött nortesztoszteron-receptor komplex nem jut be a sejtmagba.

Arra, hogy a nortesztoszteron-receptor komplex bejut a magba, és ott fejti ki hatását, közvetve, az RNS szintézis sebességének növekedéséből következtethettünk. A 19-nortesztoszteron kísérleteinkben kimutatott, tesztoszteronhoz képest mintegy nyolcszor kisebb RNS szintézist fokozó hatását kisebb affinitása a receptorhoz csak részben magyarázza, hiszen a 3. ábrán bemutatott kísérlet alapján mintegy kétszeres különbséget várnánk a tesztoszteron javára. Liao és mtsi (1973) más módszerrel és prosztatára nyert adataiból ugyanez a következtetés vonható le: a nortesztoszteron kisebb affinitása a receptorhoz csökkent androgenitását csak részben magyarázza. Mivel az androgén hatás mérése kísérletünkben *in vivo* módszerrel történt, a két szteroid hatása közti viszonylag nagyobb eltérés okaként nem zárható ki esetleges különbség a felszívódásban, a transzportban, a metabolizmus sebességében. Döntő lehet az, hogy a receptorhoz való kisebb affinitása miatt a 19-nortesztoszteront a célszerv nem képes olyan hosszú ideig visszatartani, mint a dihidrotesztoszteront. Végül arra is gondolnunk kell, hogy a nortesztoszteron-receptor komplex transzlokációja a cytoplazmából a sejtmagba lassúbb illetve a magba bekerült komplex kevésbé hatékony az RNS szintézis sebességének fokozásában mint a dihidrotesztoszteron-receptor komplex

### Összefoglalás

Kasztrált patkányokból nyert vesicula seminálisok vágdálékát 60 percig inkubáltuk  $^3\text{H}$ -tesztoszteront tartalmazó médiumban. Azt találtuk, hogy a cytoszól fehérjék és a sejtmagok a  $^3\text{H}$ -dihidrotesztoszteront szelektíven, kis kapacitással és nagy affinitással kötik. Telítési (10 nM) $^3\text{H}$ -tesztoszteron koncentrációnál összehasonlítottuk 10–100 nM 19-nortesztoszteron és nem jelzett tesztoszteron kompetitív hatását a  $^3\text{H}$ -dihidrotesztoszteron képződésének sebességére továbbá a cytoszól receptorhoz és sejtmaghoz való kötődésére. Nem találtunk különbséget a két kompetitor azonos koncentrációinál az inkubáláskor képződő szabad  $^3\text{H}$ -dihidrotesztoszteron mennyiségében. Ezzel szemben 19-nortesztoszteron jelenlétében kevésbé szorult vissza a  $^3\text{H}$ -dihidrotesztoszteron-receptor komplex képződése mint tesztoszteron jelenlété-

ben. Azonos mértékű kompetíció eléréséhez mind a cytoszól receptorhoz mind a maghoz való kötődés esetében megközelítőleg kétszer nagyobb nortesztozsteron koncentrációra volt szükség. Kísérleteink szerint a 19-nortesztozsteron mintegy háromszor hatékonyabb kompetitor mint a dihidro-nortesztozsteron és kb. tízszer gyengébb mint a nem jelzett dihidrotesztoszteron.

In vivo, a vesicula seminális RNS/DNS hányadosának azonos mértékű emeléséhez kb. nyolcszor annyi 19-nortesztozsteron mint tesztoszteron szükséges. Ezt az adatot a kompetíciós kísérletek eredményeivel összevetve arra következtetünk, hogy a tesztoszteronnak és a 19-nortesztozsteronnak a vesicula seminális RNS anyagcseréjére kifejtett eltérő hatását különböző affinitásuk a cytoszól illetve a magi receptorokhoz részben magyarázza.

### Köszönetnyilvánítás

Ezúton is köszönetet mondunk dr. Fekete György igazgatóhelyettesnek (Kőbányai Gyógyszerárugyár), dr. Szentirmai Attila osztályvezetőnek (Gyógy-szeripari Kutató Intézet), W. Klyne professzornak és D. N. Kirk-nek (West-field College, London), akik a kísérletekben felhasznált szteroidokat rendelkezésünkre bocsájtották. A kísérletek elvégzésében nyújtott lelkiismeretes és szakértő segítségért Szabó Irén laboratoriumi asszisztensnek tartozunk köszönettel.

1. A következő triviális szteroid elnevezéseket használjuk:  
 tesztoszteron = 17  $\beta$  hidroxi-4-andosztén-3-on  
 dihidrotesztoszteron = 17  $\beta$  hidroxi-5 $\alpha$ -androsztan-3-on  
 19-nortesztozsteron = 17  $\beta$  hidroxi-4-ösztén-3-on  
 dihidro-nortesztozsteron = 17  $\beta$  hidroxi-5 $\alpha$ -ösztán-3-on

### IRODALOM

- Anderson, K. D. és Liao, S.: *Nature*, **219**, 277 (1968).  
 Baulieu, E.E. és Jung, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 599 (1970).  
 Baulieu, E. E., Alberga, A., Raynaud-Jammet, C. és Wira, C. R.: *Nature New Biol.*, **236**, 236 (1972).  
 Bruchovsky, N. és Wilson, J. D.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 2012 (1968)  
 Bruchovsky, N. és Wilson, J. D.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 5953 (1968a).  
 Bruchovsky, N. és Craven, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 837 (1975).  
 Buric, L., Becker, H., Petersen, C. és Voigt, K. D.: *Acta Endocrinol.* (Kopenhága), **69**, 153 (1972).  
 Chauveau, J. Moule, Y. és Royiller, C.: *Exp. Cell. Res.*, **11**, 317 (1956).  
 Davies, P. és Griffiths, K.: *Biochem. J.* **136**, 611 (1973)  
 Dische, Z.: In: *The Nucleic Acids*, (Chargaff, Ed. E., Davidson, J. N.): Acad. Press, N. Y. 1. 285 (1955).  
 Dische, Z., Ehrlich, G., Munoz, C. és von Sallmann, L.: *Am. J. Ophthalmol.*, **36**, 54 (1953).  
 Fang, S., Anderson, K. M. és Liao, S.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 6584 (1969).  
 Fang, S. és Liao, S.: *J. Biol. Chem.* **246**, 16 (1971).

- Hancock, R. L., Zelis, F., Shaw, M. és Williams-Ashman, H. G.: *Biochem. Biophys. Acta*, **55**, 257 (1962)
- Hayes, K. J.: *Acta Endocrinol. (Koppenhága)*, **48**, 337 (1965).
- Hershberger, L. G., Shipley, E. G. és Meyer, R. K.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.)*, **83**, 175 (1953).
- Ito, Y., Yamanaka, H. és Shida, K.: *Gunma J. Med. Sci.*, **15**, 142 (1966).
- Krebs, H. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **4**, 249 (1950).
- Leslie, I.: In: *The Nucleic Acids*, (Chargaff, E., ed. Davidson, J. N.: *Acad. Press*, N. Y. **2**, 1 (1955).
- Liao, S. és Williams-Ashman, H. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1956 (1962).
- Liao, S.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 1236 (1965).
- Laio, S., Leininger, K. R., Sagher, D. és Barton, R. W.: *Endocrinology* **77**, 763 (1965).
- Liao, S., Barton, R. W. és Lin, A. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **55**, 1593 (1966).
- Liao, S. és Lin, A. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **57**, 379 (1967).
- Liao, S., Liang, T., Fang, S., Castaneda, E. és Shao, T.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 6154 (1973).
- Louvy, O. H., Rosenbrough, N. I., Farr, A. L., Randall, A. L.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- Mainwaring, W. I. P.: *J. Endocrinol.*, **45**, 531 (1969).
- Mainwaring, W. I. P. és Peterken, B. M.: *Biochem. J.*, **125**, 285 (1971).
- Mainwaring, W. I. P. és Wilce, P. A.: *Biochem. J.*, **134**, 795 (1973).
- Mainwaring, W. I. P., Wilce, P. A. és Smith, A. E.: *Biochem. J.*, **137**, 513 (1974).
- Mainwaring, W. I. P., Mangan, F. R., Irving, R. A. és Jones, D. A.: *Biochem. J.* **144**, 413 (1974a).
- Maurer, H. R. és Chalkley, G. R.: *J. Mol. Biol.*, **27**, 431 (1967).
- Mejbaum, W. Z.: *Physiol. Chem.*, **258**, 117 (1939).
- Murphy, B. E. P.: In: *Recent Progress in Hormone Research*, **25**, 501 (1969).
- Nimni, M. E. és Geiger, E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.*, **94**, 606 (1957).
- Nozu, K. és Tamaoki, B. I.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**, 145 (1974).
- O'Malley, B. W. és Means, A. R.: *Science*, **183**, 610 (1974).
- Rennie, P. és Bruchovsky, N.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 1546 (1972).
- Rennie, P. és Bruchovsky, N.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 3288 (1973).
- Shimazaki, J., Horaguchi, T., Ohki, Y. és Shida, K.: *Endocrinol. Japon.*, **18**, 179 (1971).
- Steggles, A. W., Spelsberg, T. C., Glasser, S. R. és O'Malley, B. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **68**, 1479 (1971).
- Szirmai, J. A. és Van der Linde, P. C.: *J. Ultrastruct. Res.* **12**, 380 (1965).
- Tóth, M.: *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* **19**, 519 (1968).
- Tóth, M.: *FEBS Letters*, **8**, 337 (1970).
- Tóth, M.: *Kandidátusi értekezés*, (1971).
- Tveter, K. J. és Unhjem, O.: *Endocrinology* **84**, 963 (1969).
- Tymoczko, J. L. és Liao, S.: *Biochem. Biophys. Acta*, **252**, 607 (1971).
- Unhjem, O. és Tveter, K. J.: *Acta Endocrinol. (Koppenhága)*, **60**, 571 (1969).
- Venderly, R.: In: *The Nucleic Acids*. (Chargaff, E., Ed Davidson, J. N.: *Acad. Press*, N. Y., **2**, 155 (1955).
- Wicks, W. D. és Kenney, F. T.: *Science*, **144**, 1346 (1964).





## KRÓNIKUS PARA-BROM-METAMFETAMIN (V-111) KEZELÉS HATÁSA PATKÁNYOK TANULÁSI ÉS MEMÓRIATÁROLÓ KÉPESSÉGÉRE

KNOLL BERTA, a biológiai tudományok kandidátusa

Közlésre érkezett: 1975. XII. 20.

Az elmúlt években végzett kutatásaink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az agyi catecholaminerg tónust fokozó és a szerotonerg tónust csökkentő vegyületek serkentik a patkányok tanulási és memóriatároló képességét (Knoll J., 1972, 1973, 1974). Knoll és munkatársai által kifejlesztett para-Br-metamfetamin (V-111) mely akut hatásában a pszichotomimetikumokra jellemző viselkedési zavart okoz macskán, egéren és patkányon (Knoll Berta 1972) tartós kezelés után (30 napon át naponta egyszer 15/mg/kg s.c.) ellentétes hatást váltott ki, fokozta patkányokon a tanulást és retentiót (Knoll Berta 1974).

Részletes biokémiai mérések alapján megállapítottuk, hogy a V-111 akut hatásában az agyban szerotonint szabadít fel, tartós kezelés során szerotonint depletál. (Knoll J., 1970; Knoll Berta 1974 a, b). A krónikus V-111 kezelés tanulásra kifejtett hatását két olyan módszerrel vizsgáltuk, melyek lehetőséget nyújtanak sok állaton gyorsan keresztülvihető kísérletekre, reprodukálhatók és statisztikailag jól kezelhetők, vagyis megfelelnek a farmakológiai screening céljainak.

Mindkét módszerünkkel az állatokon menekülési reflexet váltottunk ki, a kísérletek egy részében elektromos áramütéssel, (Screening teszt I.) másik részében hőingerrel (Screening teszt II.) és kvantitatív módon követtük, hogy a naiv állatok hogyan fedezik fel a fájdalmas ingertől való megszabadulás útját, (feltétlen menekülési reakció) hogyan épül ki a feltételes reflex az előbbi reakcióra és milyen mértékben retineálódik az együlési kondicionálás során kiépült feltételes reflex.

Módszereinkkel megvizsgáltuk különböző vegyületek hatását patkányok viselkedésére, összehasonlító vizsgálatokat végeztünk különböző törzsből származó patkányok tanulás és memóriatároló képessége között. (Knoll Berta 1972a) Kísérleteinkhez nem beltenyésztett, kereskedelmi forgalomban levő 120—220 gr-os Wistar, CFY és Long-Evans hím és nőstény patkányokat használtunk. Biokémiai meghatározásokat Bogdanszki szerint, fluorimetriás módszerrel végeztük el. (Bogdanski 1956).

Vizsgálatra az alábbi vegyületek kerültek:

Para-Br-metamfetamin HCL (V-111) Chinoin (30 × 15 mg/kg s.c.)

Para-Cl-fenilalanin (pCPA), Sigma (3 × 100 mg/kg. i. p.)

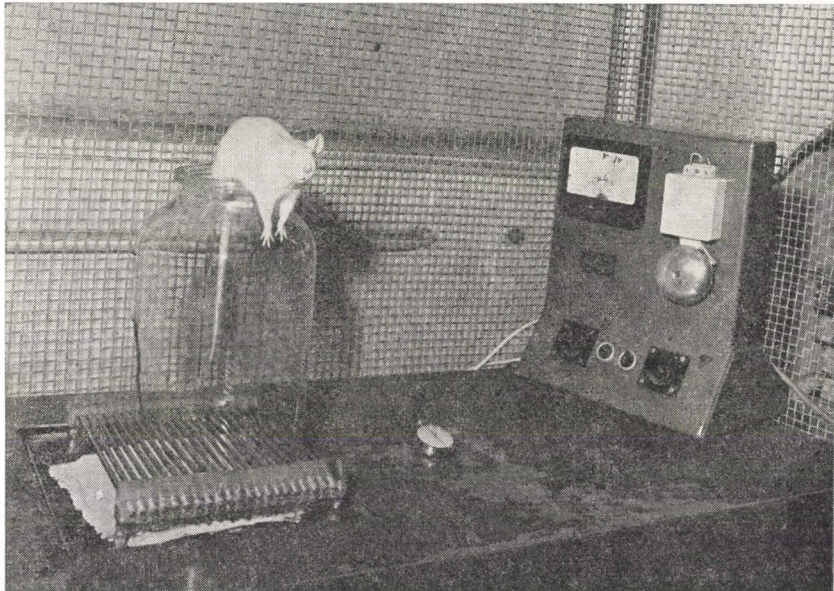
Orotsav, Fluka ( $4 \times 100$  mg/kg i. p.)

Amfetamin inj. 1% Chinoin ( $1 \times 2$  mg/kg s. c.) A vegyületeket 0,9% fiziológias konyhasó oldatban oldottuk.

Amfetamin után 30 perc múlva, a többi vegyülettel való kezelés után 24 órával kerültek az állatok a kísérleti berendezésekbe. A kapott eredményeket a Screening teszt I. esetében  $4 \times 2$  mezős, a Screening teszt II.-nél  $3 \times 2$  mezős,  $\chi^2$  tesztben értékeltük.

*Áramütéssel kiváltott menekülési reflex vizsgálata. Screening teszt I.*

A kísérleti berendezés fémrácsból és erre helyezett 30 cm magas, alul, felül és oldalt nyitott üvegbúrából áll. A fémrácsba vezetett elektromos (110 V) áram mint feltétlen inger hatására a búra alá helyezett kísérleti állat tájékozódó kutató reflexes viselkedése révén felugrik a búra tetejére. Ha 2''-en belül



1. ábra. Elhárító reflex kiépítésére alkalmas elektromos berendezés. Scherening teszt I.

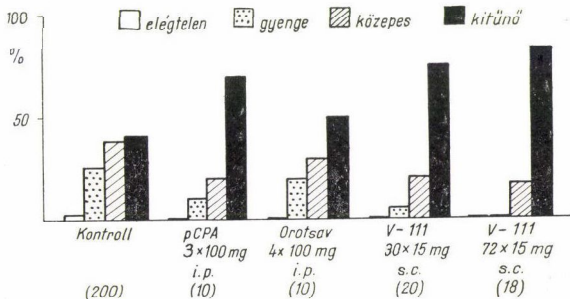
feladatát nem oldja meg, kikapcsoljuk az áramot és a műveletet 5''-es szünetekkel mindaddig ismételjük (de legfeljebb 20 alkalommal) míg az állat a menekülés egyetlen útját fel nem fedezi. Az első sikeres felugrás után (feltétlen reflex) az ismétléskor már következetesen pozitív feltétlen reakciót néhány alkalommal kiváltjuk. Ezután a már „szilárd” feltétlen reflexet 10 alkalommal — 10''-es szünetekkel — indifferens csengőhanggal (feltételes inger) társítva váltjuk ki, majd ellenőrizzük a feltételes reflex kialakulását. Feltételes reflexnek tekintjük, ha az állat áramütés nélkül, csak a csengőhang

hatására 30"-en belül felugrik a búra tetejére. Az ilyen feltételek mellett kísérletbe kerülő állatokat viselkedésük alapján négy kategóriába soroljuk.

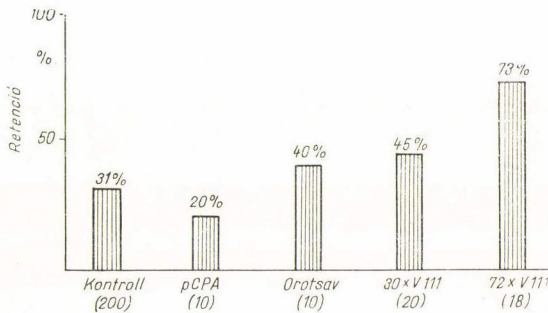
**Elégtelen:** ha 20 próbálkozáson (5''-es szünetekkel, 2''-es áramütés) belül nem ugrik fel a búra tetejére.

**Gyenge:** ha áramütésre felugrik (feltétlen reflex pozitív), de 10 társítás és 4 járulékos megerősítés után sem ugrik fel a feltételes inger hatására (feltételes reflex negatív).

**Közepes:** feltételes reflex kiváltható 10 alkalommal, de csak 2—4 járulékos megerősítés után.



2. ábra. Különböző vegyületek hatása Wistar patkányok tanulási képességére Screening teszt I



3. ábra. Különböző vegyületek hatása Wistar patkányok 24 órás retenciójára. Screening teszt I.

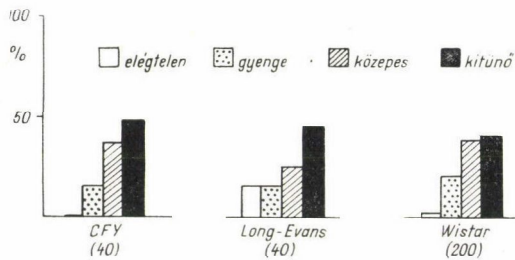
**Kitűnő:** ha 10 társítás után közvetlenül 10 alkalommal szilárd feltételes reflex váltható ki.

A feltételes reflex retencióját 24 órával az utolsó reakció kiváltása után ellenőrizzük és pozitívnak tekintjük, ha az állat csengő inger hatására 30''-en belül egy alkalommal felugrik.

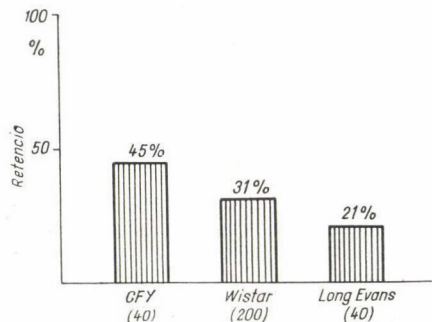
200 db kezeletlen (kontroll) Wistar patkány problémamegoldási és memóriatároló képességét illusztrálja a 2. és 3. ábra. Az állatoknak 39,5%-a került a kitűnő kategóriába, ennyi állatnál lehetett a közvetlen megerősítés után kiváltani 10 pozitív feltételes reflexet, ugyanakkor elenyészően kevés (2%) állat tanulása bizonyult elégtelennek. Ennek oka valószínűleg az igen erős (110 V) feltétlen inger.

Ha különböző vegyületekkel való előkezelések után kerülnek a patkányok a Screening teszt I. feltételek közé, viselkedésük lényegesen megváltozik a kontrollokéhoz viszonyítva (2. és 3. ábra). Mind a pCPA mind az orotsav hatására megszűnt az elégtelen kategória, nem volt olyan patkány, melynél a feltétlen reflex nem alakult volna ki, sőt a pCPA hatására igen jelentősen (70%) fokozódott a kondicionált állatok száma. Matematikailag szignifikáns tanulás fokozást csak a V-111-gyel való előkezelés után kaptunk ( $P < 0,01$ ). Hasonló a helyzet a retenció esetében is, míg a kontroll állatoknak csak 31%-a (retenciót csak a 3. és 4. kategóriába tartozó állatoknál mértünk, mivel csak ezeknél alakult ki szilárd feltételes kapcsolat) addig az orotsavval és para-Br-metamfetaminnal előkezeltek 40—45 százaléka retineálta a csengő hangjára kiépített feltételes reflexet. Legmagasabb értéket (73%) 72 napos V-111 kezelés után kaptunk.

Screening teszt I. módszerünkkel a Wistar, CFY és Long-Evans patkányok tanulás és memóriatároló képessége között szignifikáns különbséget nem észleltünk, valószínűleg az igen erős feltétlen inger és erős feltételes inger alkalmazása miatt az állatok válaszreakciója lényegében azonos. (4., 5. ábra).



4. ábra. Különböző patkánytörzsek tanulási képessége Screening teszt I. módszerrel vizsgálva.



5. ábra. Különböző patkánytörzsek 24 órás retenciája. Screening teszt I.

*Hőingerral kiváltott menekülési reflex vizsgálata. Screening teszt II.*

Az eljárás lényegében megegyezik az előző módszerben leírtakkal; az eltérés a feltétlen ingerben van, mely ebben az esetben 60 °C hőinger. A már ismertetett üvegbúra 60 fokra felfűtött fémlapon áll, azaz az állat menekülését a rendkívül heves védekezési reakciót kiváltó 110 V áramütés helyett az enyhébb és lokalizáltabb hatású hőinger váltja ki. Az első feladat az állat

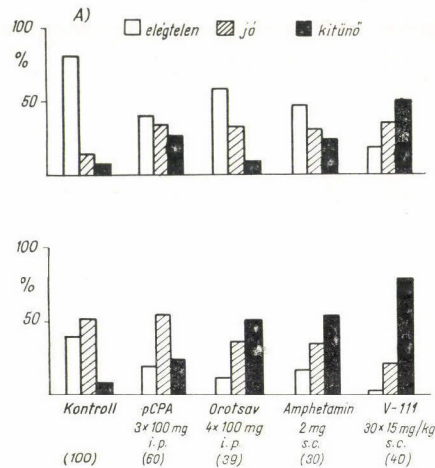


6. ábra. Elhárító reflex kiépítésére alkalmas hőingerteljes berendezés. Screening teszt II.

számára ebben az esetben is a menekülés egyetlen útjának felismerése (a feltétlen reflex kiépítése), majd ugyanebben a kísérleti ülésben feltételes reflex elsajátítása (felugrás szobahőmérsékletű fémlapra). Az enyhébb feltétlen inger alkalmazása miatt a kontroll állatok teljesítménye ebben a kísérleti szituációban kisebb, mint a Screening teszt I. esetében. (6. ábra)

A kísérlet menete a következő: a naiv patkányt a 60 fokos fémlapra az üvegbúra alá helyezük és 5''-ig ott tartjuk. Az állat körbefut, talpát nyalja, fújja, ugrál, míg végül megtalálja a búra felső peremére való felugrás mozdulatát, mint a menekülés egyetlen célra vezető útját. Ha ez a reakció

nem következnek be, az állatot levesszük a meleg lemezről és 10 másodpercre a búra peremére helyezjük, majd a kísérletet hasonló módon ismételjük összesen 30 alkalommal. Ha ezalatt a patkány nem ugrik fel egyszer sem a búra peremére „feltétlen” reflexaktivitását negatívnak tekintjük. A 30. ismétlés után az állatot szobahőmérsékletű lemezre tesszük és ellenőrizzük a feltételes reflex kialakulását a környezeti ingerekre (üvegbúra alatti helyzet,



7. ábra. Különböző vegyületek hatása Wistar patkányok tanulási és memóriatároló képes ségére. Screening teszt II.

az állat megfogása, a búra észlelése), csengőingert ebben a kísérletben nem használunk. Amennyiben az állat 30"-en belül felugrik a búra tetejére (egy másután 10 alkalommal próbálkozunk), akkor feltételes reflexét pozitívnak értékeljük, ha hőinger hiányában nem ugrik, akkor negatívnak. Teljesítményük alapján a patkányokat három kategóriába soroljuk.

**Elégtelen:** ha a feltétlen és feltételes reflex egyáltalán nem jelenik meg.

**Jó:** amikor a feltétlen kapcsolat kiépül, a feltételes nem.

**Kitűnő:** ha mindkét elhárító reflexes forma megjelenik. Ezen a teszten a retenciót az adott kísérleti feltételeknek megfelelően egy vagy két hét múlva ellenőrizzük. A kísérletek közötti szüneteket az állatok lakóketrecükben töltik, majd másodszorra is az első tanuláshoz megfelelő szituációba kerülnek és az egész kísérletsorozatot megismétljük velük. A 7. ábra mutatja 100 db naív Wistar patkány viselkedését százalékos megoszlásban tanulási képességük alapján. Az A oszlopsorok az első, a B oszlopsorok a második tanulás eredményeit reprezentálják, ez utóbbit 14 nap szünet után ellenőriztük.

A gyenge feltétlen és feltételes ingerek hatására az állatok túlnyomó többsége (80%) az első, elégtelen kategóriába került és csak kis hányada (7%) oldotta meg kitűnően feladatát. A második tanulás már lényegesen

csökkentette a rosszul tanulók számát, a feltételes reflexet kiépítő állatok száma viszont még mindig alacsony maradt (8%). Alapvetően megváltozott az állatok tanulás és memória készsége krónikus V-111, valamint a már előzőekben is alkalmazott centrális hatású vegyületekkel való előkezelés után. A retenció vizsgálatát ezekben az esetekben is 14 nappal később végeztük el (7. ábra).

A krónikus V-111 kezelés igen jelentősen fokozta ( $P < 0,01$ ) az állatok teljesítményét a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az elégtelenek aránya 17%-ra csökkent, a kitűnő kategória 49%-ra emelkedett. A kontroll és V-111-gyel kezelték retenciója is szignifikánsan különbözött ( $P < 0,001$ ) holott a két hét szünet alatt semmilyen kezelést nem kaptak a patkányok, sőt összehasonlítva a többi vegyület hatásával a 30 napos V-111 előkezelés után emelkedett legnagyobb mértékben a feltételes reflexet kiépítő állatok száma. A jelenség oka valószínűleg a V-111 tartós szerotonin depletáló hatása. Ennek igazolására a szokásos módon 30 napig kezeltünk V-111-el patkányokat melyeket csak biokémiai mérésekhez használtunk fel, tanulási képességüket nem vizsgáltuk. A kezelés befejezése után különböző időpontokban (1 óra — 3 hét) dekapitáltuk őket és Bogdanszki módszerével mértük az egészagy (cerebellumot eltávolítottuk) szerotonin szintjét. A kontroll állatokat 30 napig fizioiógias konyhasóval (0,1 ml per 100 gr per die) kezeltük és a V-111-hez hasonlóan 1 óra usqve 3 hét múlva az injekciózás után dekapitáltuk őket. Eredményeink egyrészt megerősítették korábbi adatainkat melyek szerint a krónikus V-111 kezelés hatására az agyi szerotonin szint lényegesen csökken (Knoll J. 1972)

### I. táblázat

Patkányagy szerotonin koncentrációjának ( $\eta$ gr per g  $\pm$  S. E.) változása, krónikus V-111 kezelés után. Meghatározás Bogdanszki módszerével.

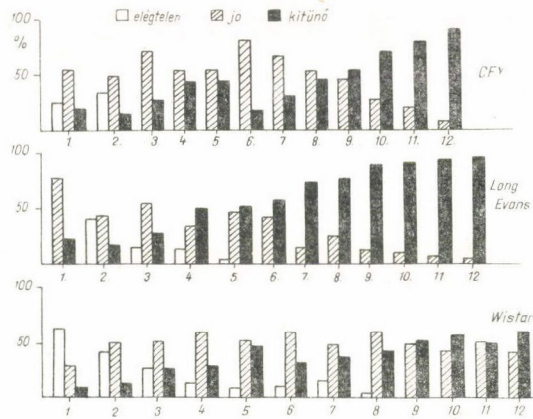
Kísérletben résztvevő állatok	1 óra	24 óra	1 hét	2 hét	3 hét
Kontroll (30 x fiz. só)	0,2364 $\pm$ 0,015	0,370 $\pm$ 0,028	0,215 $\pm$ 0,014	0,297 $\pm$ 0,02	0,2496 $\pm$ 0,045
V-111 (30 x 15 mg)	0,1442 $\pm$ 0,007***	0,238 $\pm$ 0,024**	0,1331 $\pm$ 0,013**	0,175 $\pm$ 0,012**	0,01612 $\pm$ 0,010*
Változás %	-40	-36	-39	-42	-32

\*\*\*  $p < 0,001$

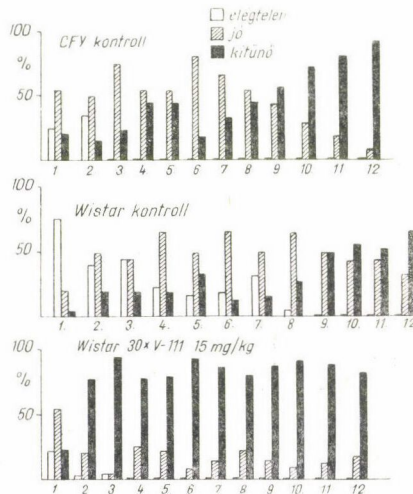
\*\*  $p < 0,01$

\*  $p < 0,05$

Módszer = Student 2 mintás  $t$  próba



8. ábra. CFY, Long—Evans és Wistar patkányok tanulás és memóriatároló képességének összehasonlítása Screening teszt II. módszerrel.



9. ábra. Krónikus (30 napos) V-111 kezelés tanulásfokozó hatása Wistar patkányokon a kezeltlen Wistar kontroll és CFY kontroll aspektusában. Screening teszt II.

másrészt azt is kimutattuk, hogy még 3 héttel a kezelés befejezése után is alacsony az egészagy szerotonin tartalma a kontrollhoz képest.

A továbbiakban megvizsgáltuk különböző patkánytörzsek tanulási és memóriatároló képességét Screening teszt II. módszerünkkel. Ezekben a kísérletekben az első és második tanulás között csak egy hetes szünetet tartottunk, majd tovább folytattuk a tanulás vizsgálatát olymódon, hogy a 3 hónapos periódus alatt hetente egyszer mindig azonos napokon a Screening teszt II. kautéláknak megfelelően kondicionáltuk a patkányokat, összesen tehát 12 tanulást váltottunk ki. A Long-Evans, Wistar és CFY patkányok 12 hetes



viselkedését összehasonlítva kiderült, hogy az állatok nem egyformán tanulnak. Legaktívabbaknak a CFY törzsből származó patkányok bizonyultak. Már a 3. héttől kezdve nem volt olyan patkány, amely ne találta volna meg a 60°-os fájdalmas ingertől való megszabadulás lehetőségét. A Long-Evans patkányok a 6. héten a Wistarok viszont csak a 9. héten érték el a CFY állatok teljesítményének színvonalát. (8. ábra)

Felmerült a kérdés, lehet-e 30 napos V-111 előkezelés után a Wistar törzset a nála jobban tanuló törzsek valamelyikének színvonalára felhozni. E célból Wistar patkányokat a szokásos módon egy hónapig V-111-gyel kezeltünk és az utolsó injekciózás után 24 órával megvizsgáltuk az első tanulásukat majd további 11 héten át hetente egyszer ezt megismételtük. Természetesen a 30 napos előkezelés befejezése után már több kezelést az állatok a 3 hónapos kísérleti periódus alatt nem kaptak (9. ábra).

Az eredmény meglepő volt, a kezelt Wistar állatok ugyanúgy tanultak mint a CFY törzsből származók, a 4. héttől kezdve már nem volt olyan állat, melyen az elhárító reflexes viselkedés valamilyen formája ne alakult volna ki, tehát az elégtelen kategória megszűnt. Sőt összehasonlítva a 8. ábra eredményeivel, a V-111 kezelés igen erősen fokozta a feltételes reflex kiépítését is.

### Megbeszélés

Egy irányú (one-way) kondicionáló módszereinkkel különböző centrális vegyületek tanulásra és memóriára kifejtett hatását vizsgálva pozitív eredményeket kaptunk. Az amfetamin az agyban direkt módon noradrenalin (NA) mobilizál és ezáltal központi idegrendszeri izgalmat okoz (Moore 1964, Moore és mt. 1970, Carlsson 1970) különféle tanulási teszteken fokozza az állatok tanulási képességét. Az amfetamin facilitáló hatása NA szintézist gátló anyagokkal alfa-metiltizozin ( $\alpha$ -MT) megszüntethető. Ezek a farmakológiai vizsgálatok alátámasztják egyrészt azt, hogy az amfetaminok stimulatív hatásai catecholaminerg tónus fokozásán alapszanak, másrészt azt, hogy a NA a központi idegrendszer aktiváló transzmitter anyaga (Weissman és mt. 1966, Dingell és mt. 1967).

A para-Cl-fenilalanin (pCPA) facilitálja egyes teszteken a feltételes elhárító reflexes viselkedést, s ezen tulajdonsága 5-hydroxi-triptofánnal (5-HTP) meggátolható (Tenen 1967). A jelenség oka a pCPA szerotonin depletáló hatása, az agyi triptofan hydroxiláz inaktiválása révén gátolja a szerotonin szintézist (Koe 1966), a kontroll értéknek mintegy 10–20 százaléka csökkenti az agyi szerotonin szintet, ugyanakkor nem befolyásolja vagy csak minimálisan a catecholamin szintet. Az orotsav az agyi ribonuklein sav (RNA) szintézist fokozza s bizonyítja a fehérjeszintézis szerepének fontosságát a tanulási folyamatokban, különös tekintettel a memóriára. (Ott és mt. 1970). Magnezium pemolin, mely RNA szintézist fokozó hatású vegyület, ugyan-

csak fokozza a tanulást rágeszélőkon (Plotnikoff 1966). Mindhárom típusú vegyület hatékony volt kísérleti feltételeink mellett. A pCPA 3 napos előkezelés után 24 órával fokozta a patkányok tanulását mind az áramütéses, mind a hőingerléses kísérleti feltételeink mellett, (2. és 7. ábrák) a memória megszilárdulását Screening teszt I. módszerünk esetében kevésbé fokozta (3. ábra). Az orotsav memória konszolidáló hatása mindkét módszerrel bizonyítható volt, különösen a Screening teszt II. esetében kaptunk a kontrollhoz képest szignifikáns ( $P < 0,001$ ) különbséget (7. ábra). Amfetamin kezelés után 30 perccel a várt eredményt kaptuk.

Krónikus V-111 előkezelés után mindkét „egy-irányú” módszerünkkel nagymértékű tanulás és memória fokozást kaptunk. Screening teszt I. módszerünkben 72 napos V-111 kezelés hatását is megvizsgáltuk. Mivel ugyanolyan szignifikáns különbséget kaptunk, mint 30 napos előkezelés után ( $P < < 0,01$ ) és a kettő között szignifikáns különbség nem volt, a kísérletek meggyorsítása miatt továbbiakban már csak az utóbbi hatását vizsgáltuk. Hatásmódját illetően a krónikus V-111 kezelés szerotonin depléciót okoz. Hatására a központi idegrendszer egy sajátos állapotba kerül, amelyre jellemző a szerotonerg rendszer igénybevehetőségének csökkenése, valamint a relatív catecholamin túlsúly. Ezek a tények felvetik egyrészt azt a kérdést, hogy a V-111 a patkányagy mely terület, ill. területeire fejt ki hatását, másrészt ezen terület(-ek) eltávolítása roncsolásos eljárással mennyiben módosítják a V-111 5HT depletáló hatását ill. a patkányok tanulási képességét.

### Összefoglalás

Krónikus (1 hónapos) para-Br-metamfetamin (V-111) kezelés, egyirányú (one-way) elhárító reflexes kísérleti feltételek mellett (Screening teszt I. és II.) Wistar patkányok tanulás és memóriáróló képességét jelentősen fokozza. Biokémiai mérések azt mutatják, hogy az agyi 5HT szint tartósan alacsony (40%) még 3 héttel a krónikus V-111 kezelés befejezése után is. Különböző törzsből származó patkányok tanulási szintje eltérő, CFY a kísérleti feltételek mellett „okos” a Wistar patkány „buta”. Krónikus V-111 kezelés az utóbbit a CFY patkány szintjére hozza.

### IRODALOM

- Bogdanski, D. F.: *J. Pharmacol., exp. Ther.*, **117**, 82 (1956).  
 Carlsson, A.: Amphetamines and related compounds. In: *Amphetamines and brain catecholamines*. (Ed: E. Costa) pp. 289–300 Raven Press N. Y. (1970).  
 Dingell, J. V., Owens, M. L., Norvich, M. R. és Salser, F.: *Life Sciences* **6**, 1155 (1967).  
 Knoll, Berta, Vizi, E. Sz. és Knoll, J.: Comparison of the psychotomimetic effect of p-bromomethylamphetamine (V-111) and LSD In: *First international congress on higher nervous activity* (Ed: Cazzullo C. L.) pp. 433–439 Pacini, Pisa (1972).  
 Knoll, Berta: *Activ. nerv. sup.* (Praha) **14**, 293 (1972a).

- Knoll, Berta, Held, Katalin és Knoll, J.*: Rapid screening of drug-action on learning and memory In: Symposium on pharmacology of learning and retention (Ed.: Knoll Berta) pp. 43—47. Akadémiai Kiadó, Budapest (1974).
- Knoll, Berta, Timár, Julia, Jóna, Gabriella és Knoll, J.*: Neunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **285**, Suppl. 44 (1974 a).
- Knoll, Berta, Timár, Julia, Jóna, Gabriella és Knoll, J.*: Proc. of the Int. Union of Physiol. Scienc. **11**, 217 (1974 b).
- Knoll, J., Vizi, E. Sz. és Knoll, Berta*: Acta Phys. Hung. **37**, 151 (1970).
- Knoll, J., Magyar, K., Vizi, E. Sz., Knoll, Berta, Török, T. és Jóna, Gabriella*: Orvostud., **23**, 99 (1972).
- Knoll, J.*: Proc. 5<sup>th</sup> Int. Congr. Pharmacol., **455**, (1973).
- Knoll, J.*: Modulation of learning and retention by amphetamines. In: Symposium on pharmacology of learning and retention. (Ed.: Knoll, Berta) pp. 73—81. Akadémiai Kiadó, Budapest (1974).
- Koe, B. K. és Weissman, A.*: J. Pharmacol. exp. Ther. **154**, 499 (1966).
- Moore, K. E.*: J. Pharmacol. exp. Ther. **144**, 45 (1964).
- Moore, K. E., Carr, L. A. és Dominic, J. A.*: Functional significance of amphetamine-induced release of brain catecholamines. In: Amphetamines and related compounds (Ed.: E. Costa). pp. 371—384 Raven Press N. Y. (1970).
- Ou, T. és Mathies, H.*: Acta biol. med. germ. **25**, 181 (1970).
- Plotnikoff, N.*: Science **151**, 703 (1961).
- Tenen, S. S.*: Psychopharmacologia **10**, 204 (1967).
- Weissman, A., Koe, B. K. és Tenen, S. S.*: J. Pharmacol. exp. Ther. **151**, 339 (1966).



## AZ MC-29 VÍRUS ÁLTAL OKOZOTT MÁJRÁKBÓL KIALAKÍTOTT TRANSZPLANTÁLHATÓ HEPATOMA BIOKÉMIAI VIZSGÁLATA I.

### A CSIRKEMÁJ ÉS A HEPATOMA DNS, RNS, FEHÉRJE ÉS FOSZFOLIPID TARTALMÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

KOVALSZKY ILONA, JENEY ANDRÁS, ASBÓT RICHARD és LAPIS KÁROLY az  
MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1976. II. 6.

Az elmúlt években a daganatok víruseredetével kapcsolatban egyre több közlemény látott napvilágot és szaporodnak egyes humán tumorok víruseredetét feltételező adatok is (Klein 1972, Lapis és Schaff 1974, Sarkar és Moore 1972). A világszerte kiterjedten vizsgált onkogén vírusok hatására elsősorban mesenchymalis tumorok alakultak ki a kísérleti állatokban, és bár ezek tanulmányozása számos adatot szolgáltatott a vírus karcinogenezis mechanizmusára vonatkozóan, nem adhatott választ arra a kérdésre, mi történik egy magasan differenciált szövet sejtjeivel a malignus transzformáció során. A kémiai karcinogénnel előidézett transzplantálható patkányhepatomák — elsősorban a Morris hepatomák — vizsgálata, és a májszövet malignus transzformációja során végbemenő anyagsere változások felderítése a daganatok kialakulásának és biokémiájának számos lényeges sajátosságára mutatott rá (Morris 1965, Morris és Wagner 1968, Weber 1961, Weber 1968). Így a Morris 5123-as hepatoma vizsgálata során derült fény arra, hogy több, addig a daganatos sejtanyagcsere lényegi elváltozásaként elismert biokémiai jelenség nem szükségszerű velejárója a malignus transzformációnak.

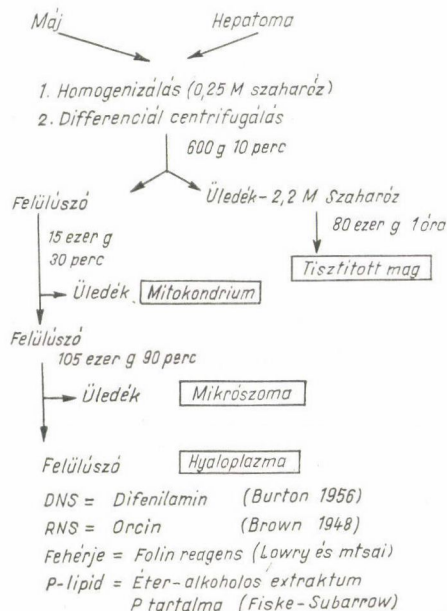
E tumor biokémiai sajátosságok tekintetében nagyon hasonlított a májhoz, glikolitikus aktivitása közel azonos a májéval, májspecifikus enzimeinek aktivitása szintén jól megőrzött volt (Pitot 1962). A különböző növekedési sebességű és malignitású hepatomák tanulmányozása során derült fény arra is, hogy egyes anyagsere folyamatok intenzitása a malignitás fokával párhuzamosan fokozódik, míg másoké progresszíven csökken (Weber 1968).

Felmerül azonban a kérdés, hogy azok a jelenségek, melyek a kémiai karcinogénnel előidézett transzplantálható hepatomákban törvényszerűnek tűnnek, kialakulnak-e vírussal előidézett malignus transzformáció esetén is? E kérdés megválaszolására nyílt meg az első lehetőség, mikor 1972-ben Lapis a Beard által már korábban megfigyelt (Beard 1970), MC-29 vírus által előidézett hepatomából transzplantálható daganatot alakított ki. A primer,

valamint a transzplantálható tumor biológiai, fény- és elektronmikroszkópos morfológiai sajátosságairól Lapis több cikkben számolt be (Lapis és mtsai 1973, Lapis és mtsai 1974, Lapis és mtsai 1975). Jelen vizsgálatunk célja az újonnan kialakított transzplantálható csirke hepatoma alapvető biokémiai, jellemzése, a tumor lényeges makromolekuláinak meghatározása volt.

### Anyag és módszer

A transzplantálható tumor fenntartása, átoltása Lapis és mtsai (1974) által leírt módon történt. Vizsgálatainkat mindkét nembeli naposcsibébe subcután oltott 10 napos tumoron végeztük, a tumorok a 4–15. átoltásokból származtak. Kontrollként 10 napos egészséges csirkék máját vizsgáltuk. Az állatok a leölésig szabadon fogyaszthattak táplálékot és vizet. A csirkéket dekapitálással öltük meg, az eltávolított máj és tumor súlyát megmértük. A szövetszövetmintákat, ha azonnal nem kerültek felhasználásra,  $-25^{\circ}\text{C}$ -on hűtöttük és legkésőbb három napon belül feldolgoztuk. A tumor és májszövetet ötszörös térfogat 0,1 M-os (pH 7,5) K-foszfát pufferben homogenizáltuk. A homogenátumból orcein festés segítségével meghatároztuk az 1 g nedves súlyra eső sejtszámot, majd a szövetek makromolekuláinak mennyiségi meghatározásához mintát vettük. A megmaradt homogenátumot 600 xg-vel 10 percig centrifugáltuk — az üledékből izoláltuk a sejtmagokat (Busch és mtsai 1968), a felülúszóból pedig a citoplazma frakciókat (Hogeboom 1955, 1. ábra).



1. ábra. A szövetek frakcionálásának és a makromolekulák meghatározásának vázlatos menete.

A szövethomogenátumból és a differenciál centrifugálással nyert 4 frakcióból az alacsony molekulású komponenseket 4 °C-on 0,5 N perklórsavval mosva távolítottuk el. A zsíroldékony anyagokat éter-alkohol 1 : 3 arányú keverékével 2 × 10 percig szobahőn kezelve a mintáinkat, nyertük ki. A visszamaradt üledékből a nukleinsavakat 0,5 N perklórsavval 2 × 20 percen át hidrolizálva vontuk ki. A fennmaradó csapadékot, mely a fehérjét tartalmazta, 0,1 N NaOH-ban oldottuk fel. A 70 °C-on történt perklórsavas hidrolízis során nyert extraktumból a DNS-t difenilamin (Burton 1956), az RNS-t orcín (Brown 1946) reagenssel határoztuk meg. A fehérje tartalom meghatározásához Folin reagenst (Lowry 1951) használtunk. Az éter-alkoholos extraktumból a foszfolipid tartalmat kénsavas roncsolás után az anorganikus foszfor tartalom alapján Fiske és Subbarow (1925) módszere szerint határoztuk meg. Eredményeinket 1 sejtre számítva pikogrammban tüntetjük fel ( $10^{-12}$  g).

*Eredmények*

Vizsgálataink során a csirke hepatomában 2-szer magasabb DNS tartalmat találtunk, mint a májban. A tumor fehérjetartalma ugyanakkor csak 62%-a az egészséges májszövetének. A foszfolipid tartalom csökkenése még a fehérjénél is kifejezettebb (1. táblázat).

I. táblázat

A csirkemáj és hepatoma DNS, RNS, fehérje és foszfolipid tartalma.

	Csirkemáj	Hepatoma	A tumor értékei a kontroll máj %-ban
DNS	2,57 ± 0,38	5,01 ± 0,19	194
RNS	11,42 ± 2,19	8,44 ± 1,30	73,9
Fehérje	154,9 ± 11,80	95,60 ± 7,60	61,7
Foszfolipid	4,60 ± 0,13	1,90 ± 0,27	41,3

Az eredmények 1 sejtre számítva pikogrammban lettek feltüntetve.  
A tumorban mért változások szignifikánsak,  $p < 0,001$

A tumor és májmintákból nyert izolált és tisztított sejtmagok makromolekula tartalma szintén eltér egymástól (2. táblázat). A hepatoma sejtek magjában nemcsak a DNS, hanem az RNS és fehérje tartalom is lényegesen magasabb, mint a májban. A makromolekulák mennyiségének változása egymással párhuzamos, így egymáshoz viszonyított arányuk lényegesen nem változik. A magban észlelt változással szemben a tumor mitokondrium ( $15\ 000 \times g$  üledék) frakciójának RNS, fehérje és foszfolipid tartalma jelentősen csökkent (3. táblázat). Az RNS tartalom csaknem 3-szor, a fehérje tar-

## II. táblázat

*A csirkemáj és hepatoma magjának DNS, RNS és fehérje tartalma*

	Csirkemáj	Hepatoma	A tumor értékei a kontroll máj %-ban
DNS	2,33 ± 0,28	4,65 ± 0,16	200
RMS	0,57 ± 0,19	1,18 ± 0,09	204
Fehérje	8,16 ± 0,65	13,88 ± 0,83	171

Az eredmények 1 sejtre számítva pikogrammban lettek feltüntetve.  
A tumorban mért változások szignifikánsak,  $p < 0,001$

## III. táblázat

*A csirkemáj és hepatoma mitokondrium (15 000xg-vel ülepedő) frakciójának RNS, fehérje és foszfolipid tartalma*

	Csirkemáj	Hepatoma	A tumor értékei a kontroll máj %-ban
RNS	0,97 ± 0,12	0,33 ± 0,06	33,8
Fehérje	45,82 ± 4,76	20,97 ± 6,01	45,7
Foszfolipid	1,37 ± 0,12	0,28 ± 0,005	20,4

Az eredmények 1 sejtre számítva pikogrammban lettek feltüntetve.  
A tumorban mért változások szignifikánsak,  $p < 0,001$

talom pedig hozzávetőlegesen 2-szer több a máj hasonló frakciójában. A hepatomában észlelt csökkenést nem lehet egyszerűen a mitokondriumok számának megfogyatkozásával magyarázni, mivel a makromolekulák egymáshoz viszonyított aránya is megváltozott.

A hepatoma mikroszóma frakciójának (105 000 × g üledék) fehérje tartalma 18%-kal kisebb a májénál, hasonló mérvű az RNS és foszfolipid tartalom csökkenése is. A máj és a tumor mikroszóma frakciójában a számított fehérje-RNS arány hasonló (4. táblázat).

## IV. táblázat

*A csirkemáj és hepatoma mikroszóma (105 000xg-vel ülepedő) frakciójának RNS, fehérje és foszfolipid tartalma*

	Csirkemáj	Hepatoma	A tumor értékei a kontroll máj %-ban
RNS	4,36 ± 0,21	3,57 ± 0,71	81,8 a
Fehérje	17,40 ± 2,30	15,95 ± 3,41	91,6 b
Foszfolipid	1,29 ± 0,07	1,04 ± 0,15	80,6 a

Az eredmények 1 sejtre számítva pikogrammban lettek feltüntetve  
a:  $p < 0,05$   
b: nem szignifikáns



A hepatoma hialoplazma frakciójában (5. táblázat) az RNS és fehérje mennyiségi kifejezetten csökkent. A máj hialoplazmában számított 15,7 fehérje-RNS arány az alacsony fehérjetartalom miatt 12,6-re csökken a hepatoma ezen frakciójában.

V. táblázat

A csirkemáj és hepatoma hialoplazma (105 000xg szupernatáns) frakciójának RNS, fehérje és foszfolipid tartalma

	Csirkemáj	Hepatoma	A tumor értékei a kontroll ámj %-ban
RNS	5,14±0,28	3,34±0,83	64,9 a
Fehérje	81,23±8,92	42,48±3,70	52,3 a
Foszfolipid	1,50±0,76	0,81±0,08	53,8 b

Az eredmények 1 sejtre számítva pikogrammban lettek feltüntetve.

a:  $p < 0,05$

b: nem szignifikáns

Az RNS és fehérje megoszlását a sejtmag és a citoplazma között a 6. táblázat mutatja. Látható, hogy míg az egészséges csirke májában 18-szor több RNS és fehérje van a citoplazmában mint a magban, ez az arány a hepatomában 6,2-re csökken. A változásért az RNS esetében elsősorban a mag megnövekedett RNS tartalma, a fehérje esetében a mag fehérjetartalmának növekedése és a citoplazma fehérje tartalmának csökkenése egyaránt felelős.

VI. táblázat

A fehérje és RNS megoszlása a mag és citoplazma között csirkemájában és hepatomában

		Fehérje			RNS		
		pg/sejt	%	arány	pg/sejt	%	arány
Máj	Mag	8,16	5,26	1	0,577	5,22	1
	Citoplazma	144,42	94,74	18	10,470	94,77	18,1
Hepatoma	Mag	13,88	14,50	1	1,18	13,90	1
	Citoplazma	79,40	85,50	5,9	7,24	86,10	6,2

### Megbeszélés

Az ismertett vizsgálatok célja egy újonnan kialakított transzplantálható tumor DNS, RNS, fehérje és foszforlipid tartalmának meghatározása volt. A munka jelentőségét az adja meg, hogy ismereteink szerint ez az egyetlen transzplantálható hepatoma, melyet vírussal létrehozott májrákból alakított-

tak ki. Vizsgálataink során a máj és az MC-29 vírus által indukált májtumorból kialakított transzplantálható hepatoma között számos különbséget figyelhettünk meg.

A differenciál centrifugálással nyert frakciók makromolekuláinak mennyiségét vizsgálva megállapíthattuk, hogy a hepatoma megváltozott összetételéért részben a magi RNS, DNS és fehérje tartalom emelkedése, részben pedig a citoplazma fehérjéinek megfogyatkozása a felelős.

A hepatoma körülbelül 2-szeresre növekedett DNS tartalma összhangban áll Weber (1961) adataival, aki Novikoff hepatomában, és Molnár (1965) adataival, aki májrákban hasonló mérvű emelkedésről számolt be. Elektronmikroszkópos vizsgálattal Lapis szintén a mag-plazma arány mag javára történő eltolódását figyelte meg (Lapis, 1976, megjelenés előtt). Kézenfekvő, hogy egy gyorsan növő tumor sejtjeinek nagy része  $G_2$  fázisban van. Így magyarázza Weber is a Novikoff hepatoma DNS tartalmának emelkedését. Elképzelhető azonban az is, hogy a sejtek egy része a kóros oszlások következtében oktaploid, vagy ennél is magasabb számú kromoszóma garnitúrával rendelkezik. A magi RNS és fehérje tartalom emelkedett voltát a fokozott szintézis és a csökkent lebontás mellett a következők magyarázhatják.

Lehetséges, hogy a sejtmagban kóros RNS-ek szintézise folyik, melyek a magból kijutni már nem képesek, valamint vírus eredetű tumorról lévén szó, felmerül a vírus RNS termelésének lehetősége is. A magi fehérje tartalom emelkedését magyarázhatja egyszerűen az a tény is, hogy a megnövekedett nukleinsav tartalom következtében több, a nukleinsavak proteinburkaként szolgáló fehérjére van szükség. A jelenség értékelése szempontjából kétségtelenül figyelemre méltó az az irodalmi adat, mely felhívja a figyelmet, hogy egyes kísérletes tumorokban az anyagcsere szisztematikusan a DNS és RNS szintézis javára tolódik el, míg a lebontásukban szerepet játszó enzimek aktivitása csökken (Weber 1974).

A sejtplazmában észlelt változásért, mely legkifejezettebben a mitokondrium és a hialoplazma fehérjetartalmának megfogyatkozásában nyilvánult meg, szintén a csökkent szintézis, vagy a fokozott lebontás tehető felelőssé. A mitokondriális frakció fehérje tartalmának változása összhangban áll Ohe és mtsai megfigyelésével, akik 1967-ben különböző növekedési rátájú hepatomák mitokondriumának tanulmányozása során rámutattak arra, hogy a tumorok mitokondriális fehérjéinek mennyisége annál jobban csökken, minél gyorsabban növő tumorról van szó. Adataik alapján a patkánymáj mitokondriumának fehérjetartalma 50 mg/g/ nedves súly volt, mely érték a gyorsan növő hepatomák esetén akár 14—9 mg-ra is lecsökkent. Ha saját adatainkat 1 g nedves súlyra számítva tüntetjük fel, azt látjuk, hogy a csirke hepatomában mért mitokondriális fehérje tartalom a májban mért 30 mg/g értékről 17,1 mg/g-ra csökkent. A csökkenés mértéke megfelel a kémiai karcinogénekkal előidézett gyorsan növő hepatomáknál leírtaknak. Lapis elektronmikroszkópos

vizsgálattal a mitokondriumok számának csökkenését és szerkezeti károsodását figyelte meg (Lapis 1975, megjelenés előtt). A fehérje szintetizáló rendszer biokémiai szubsztrátumának megfelelő mikroszóma frakció fehérje, RNS és foszfolipid tartalma a tumorban és a májban hasonló volt, számottevő mennyiségi különbséget nem tudtunk kimutatni.

A mag fokozott és a citoplazma csökkent fehérje tartalma felveti a lehetőséget, hogy a tumor mikroszomális rendszerének működése a magi fehérjék szintézisének irányába tolódik el, a sejt plazma differenciált működéséhez szükséges fehérjék szintézise pedig visszaszorul. Ezt a feltevést támasztják alá azok az adatok, melyek a Morris hepatomák növekedési ütemével párhuzamosan fokozódó aminosav beépülésről számolnak be. Ezzel ellentétben pedig számos, a máj differenciált működéséhez szükséges enzim aktivitása csökken (Lea és mtsai 1966, Morris 1965, Ohe és mtsai 1967, Weber 1968, Weber 1974). Ezek az adatok saját eredményeinkhez hasonlóan a szabályozó rendszer zavarára utalnak és rámutatnak arra a tényre, hogy a differenciált működést végző citoplazma organellumok fehérje tartalmának csökkenése fokozott fehérje szintetizáló aktivitás mellett jön létre. A foszfolipid tartalom csökkenését a tumor citoplazma organellumokban való elszegényedése magyarázhatja (Lapis 1976).

Adataink arra utalnak, hogy a vírus által indukált transzplantálható hepatoma számos, a kémiai karcinogénekkal előidézett hepatomákéhoz hasonló sajátossággal rendelkezik. A mag dominanciája, a csökkent citoplazmatikus fehérje és foszfolipid tartalom tehát a daganatkeltő ágenstől függetlenül megfigyelhető, és a változás mértéke a vizsgált paraméterek vonatkozásában úgy tűnik, valóban a növekedés sebességétől függ, mivel az általunk vizsgált igen gyors növekedésű hepatomában mért változások a gyorsan proliferáló Morris hepatomákban, valamint a Novikoff hepatomában észleltekhöz hasonlíthatók.

### Összefoglalás

Szerzőnk egy olyan új transzplantálható hepatoma DNS, RNS, fehérje és foszfolipid tartalmát vizsgálták, melyet vírussal indukált májrákból alakítottak ki, és az első ismertén víruseredetű transzplantálható hepatoma. A tumor és máj homogenizátum, valamint a mag, mitokondrium, mikroszóma és hialoplazma frakciók összehasonlító vizsgálata alapján megállapították, hogy a hepatomasejtek magjának DNS, RNS és fehérjetartalma jelentősen megnőtt, míg a mitokondrium és hialoplazma RNS és fehérje tartalma lecsökkent a máj azonos frakcióihoz viszonyítva. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a hepatomában a makromolekulák megoszlása a mag javára tolódik el.

## IRODALOM

- Beard, D., Chabot, J. F., Langlois, A. J., Hillman, E. A. és Beard, J. W.*: Arch. Geschwulstforsch **35**, 315 (1970).
- Brown, A. M.*: Arch. Biochem. **11**, 269 (1946).
- Busch, H., Hodnett, J. L., Morris, H. P. és Unuma, T.*: Methods in Cancer Research IV. 179 (1968).
- Burton, K.*: Biochem J. **62**, 315 (1956).
- Fiske, H. G. és Subbarow, Y.*: J. Biol. Chem. **66**, 375 (1925).
- Hogeboom, G. H.*: Methods in Enzymology I. 16 (1955).
- Klein, G.*: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **69**, 1056 (1972).
- Lapis, K., Beard, D. és Beard, J. W.*: Orvostudomány **24**, 229 (1973).
- Lapis, K., Beard, D. és Beard, J. W.*: Orvostudomány **25**, 151 (1974).
- Lapis, K. és Schaff, Zs.*: Orvosi Hetilap **19**, 1081 (1974).
- Lapis, K., Beard, D. és Beard, J. W.*: Cancer Res. **35**, 132 (1975).
- Lapis, K.*: Orvostudomány (1976) megjelenés alatt.
- Lea, M. A., Morris, H. P. és Weber, G.*: Cancer Res. **26**, 465 (1966).
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. és Randall, R. J.*: J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).
- Molnár, F. és Daoust, R.*: Cancer Res. **25**, 213 (1965).
- Morris, H. P.*: Advances in Cancer Res. **9**, 228 (1965).
- Morris, H. P. és Wagner, B. P.*: Methods in Cancer Res. IV. 125 (1968).
- Ohe, K., Morris, H. P. és Weinhouse, S.*: Cancer Res. **27**, 1360 (1967).
- Pitot, H. C.*: Fed. Proc. **21**, 1124 (1962).
- Sarkar, N. H. és Moore, D. H.*: Nature **236**, 103 (1972).
- Weber, G. és Cantero, A.*: Endocrinology **61**, 701 (1957).
- Weber, G.*: Advances in Cancer Res. **6**, 403 (1961).
- Weber, G.*: Naturwissenschaft **55**, 418 (1968).
- Weber, G.*: Differentiation and Control of Malignancy of Tumour Cells. 151—180 University Tokyo Press, Tokyo 1974.

## AZ MC-29 VÍRUS ÁLTAL OKOZOTT MÁJRÁKBÓL KIALAKÍTOTT TRANSZPLANTÁLHATÓ HEPATOMA BIOKÉMIAI VIZSGÁLATA II.

### ÖSSZEHASONLÍTÓ ENZIMINDUKCIÓS VIZSGÁLATOK A HEPATOMA ÉS MÁJSZÖVETBEN

KOVALSZKY ILONA, JENEY ANDRÁS, ASBÓT RICHARD és LAPIS KÁROLY az  
MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1976. II. 6.

A kémiai karcinogénekkal előidézett transzplantálható hepatomák morfológiai, biológiai és biokémiai tanulmányozása során számos szerző mutatott rá, hogy ezek a tumorok a növekedés ütemének fokozódásával párhuzamosan egyre több májra jellemző tulajdonságot veszítenek el (Morris 1965, Miyaji és mtsai 1968, Shonk 1965, Weber és Lea 1967, Weber 1968, Weber 1974). Fény derült arra is, hogy a biztosan malignus, de lassú növekedésű és jól differenciált H 5123-as hepatoma biokémiai sajátosságai tekintetében alig különbözik a májtól és nem rendelkezik a malignitás eddig elismert biokémiai paramétereivel (Pitot 1963). A különböző növekedési sebességű hepatomák tanulmányozásának eredményeképpen alakította ki Weber a molekuláris korrelációs elméletét, mely szerint a daganatos sejttanyagcsere lényegét az anabolikus és katabolikus folyamatok egyensúlyának progresszív felborulása jelenti. A hepatomákban a növekedés ütemével arányosan csökken a szénhidrátok szintézise, valamint a nukleinsavak és fehérjék lebontása. Ugyanekkor a szénhidrátok lebontása és a nukleinsavak szintézisének üteme növekszik (Weber és Lea 1967, Weber 1968). Weber az átoltás gyakoriságával jellemzett növekedési sebesség alapján a patkány hepatomákat gyors, közepes és lassú növekedésű csoportokra osztotta fel. Az MC-29 vírussal indukált hepatoma transzplantálható formája biológiai és morfológiai sajátosságai alapján a leggyorsabban növő májtumorok közé tartozik (Lapis 1974). Vizsgálataink meglepő módon mégis arra utaltak, hogy bár számos szubcelluláris frakció fehérje tartalma csökkent a májhoz viszonyítva, a fehérjeszintézisben döntő szerepet játszó mikroszóma frakció a hepatomában aránylag jól megőrzött volt. Kérdéses azonban, hogy mennyiben tekinthető az említett frakció — megőrzött fehérje tartalma alapján — minőségileg is változatlanak.

Ismeretes, hogy a máj számos olyan enzimmal rendelkezik, mely más szervben nem, vagy csak igen alacsony aktivitással működik. Ilyen enzimek aktivitásának vizsgálata a hepatomában választ adhat arra a kérdésre, hogy

ez az igen gyorsan proliferáló tumor őrzött-e meg és ha igen, milyen mértékben, májra jellemző tulajdonságokat. Lehetővé válik ilyen módon bizonyos sejtfrakciók mélyebb tanulmányozása is, ha olyan enzimeket választunk vizsgálataink tárgyául, melyek aktivitása bizonyos sejtorganelumokhoz kötött. A fenti megfontolások alapján a következő három kérdésre kerestünk választ:

1. Vannak-e a hepatomában májspecifikus enzimek?

2. Amennyiben vannak, aktivitásuk a májéhoz hasonló-e?

3. Stimulusok hatására a tumorban levő enzimek a máj enzimeihez hasonlóan reagálnak-e?

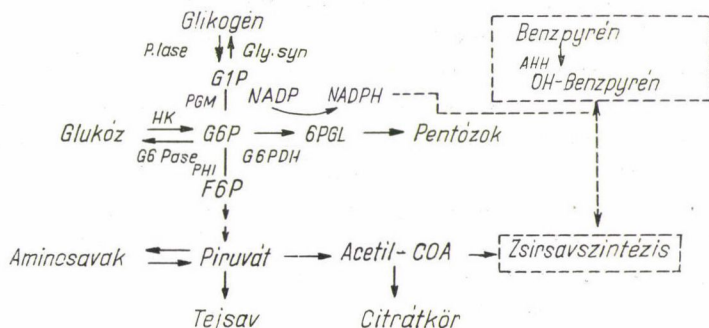
Vizsgálataink tárgyául 2 mikroszomális enzimet, az aril hidrokarbon hidroxilázt (AHH) és a glükóz-6-foszfátázt (G-6-Pase) választottuk. A két enzim a májban található meg legnagyobb mennyiségben, működésük a magas differenciált májszövetre jellemző, aktivitásuk a tumorban, a daganatsejtek élete szempontjából nem szükséges, működésük az egész szervezet szolgálatában áll, mivel a G-6-Pase biztosítja a glükóz kijutását a májsejtekből, az AHH pedig a méregtelenítésben játszik fontos szerepet. Működésüket endogen (hormonok) és exogen (pl. gyógyszerek) anyagok egyaránt befolyásolni képesek. A két mikroszomális enzim mellett figyelmünk a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim vizsgálatára is kiterjedt (G-6-P DH), mivel Weber (1963) és Shonk (1965) kimutatta hogy ezen enzim aktivitása az összes malignus hepatomában magasabb, mint a májban.

Vizsgálati rendszerünk a sejtanyagcsereben centrális szerepet játszó glükóz-6-foszfát köré csoportosult. A G-6-P jelentőségét az a tény emeli ki, hogy az átalakulás során képződő termékek a sejtanyagcsere csaknem minden lépésébe bekapcsolódhatnak. Szerepe van az energia glikogén formájában történő tárolásában, a belőle felszabaduló glükóz a szervezet energia pótlására szolgál, direkt oxidációja során képződő termékek a nukleinsav szintézisbe kapcsolódnak be, ugyanitt képződik a zsírsav szintézishez és a gyógyszerátalakító enzim működéséhez szükséges NADPH, a glikolizisen át kapcsolódik a terminális oxidációhoz, az aminosav és zsírsav szintézishez (1. ábra).

Annak eldöntése érdekében, hogy a tumorban kimutatható májra jellemző anyagcsere folyamatok különböző stimulusok hatására a májhoz hasonlóan változnak-e meg, részben exogen szer, részben pedig a szervezetben fiziológiásan is előforduló, és a szénhidrát anyagcsere befolyásoló két hormon hatását vizsgáltuk. A három alkalmazott stimulálószer kiválasztásához a következő megfontolások vezettek.

Ismeretes, hogy a glükóz-6-Pase kulcsenzim szerepét tölti be a máj glikoneogenetikus tevékenységében (Weber és Lea 1967, Weber 1968). A glikoneogenezis pedig, és ezzel együtt a G-6-Pase aktivitása, szteroiddal fokozható. Ugyanezen enzim diabetesben fokozott aktivitását Langdon és Weakly (1955), valamint Ashmore és Weber (1959) adatai szerint az Insulin normalizálja. Ezen kívül az Insulin hatására a G-6-P direkt oxidációja és így a zsír-

savsintézishez, valamint az AHH működéséhez elengedhetetlenül szükséges NADPH képződés is fokozódik. E folyamat első lépését az általunk is vizsgált G-6-P DH katalizálja. Ismert tény, hogy a policiklikus szénhidrogének csoportjába tartozó metilkolantrén a máj gyógyszerátalakító enzimaktivitását fokozni képes (Gelboin 1967). Másrészt e szer az egyik legismertebb kémiai karcinogén, így a hatására létrejövő változások egy vírussal indukált tumorban, esetleg újabb ismeretek forrását képezhetik.



I. ábra. A kísérleti rendszerben vizsgált enzimek szerepe a glükóz-6-foszfát intermedier anyagcseréjében. Rövidítések: P. lase: foszforiláz, Gly. sin.: glikogén szintetáz, PGM: foszoglukomutáz, HK: hexokináz, G-6-Pase: glükóz-6-foszfátáz, G-6-PDH: glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, PHI: foszfohexoizomeráz, AHH: aril-hidrokarbon hidroxiláz, G-1-P: glükóz-1-foszfát, G-6-P: glükóz-6-foszfát, 6PGL: glükonsav-6-foszfát.

### Anyag és módszer

Vizsgálatainkat mindkét nembeli Hunnia hibrid csirkébe subcutan transzplantált a 30—46. átváltásokból származó 10 napos tumoron végeztük. Összehasonlításként 10 napos egészséges csirkék máját használtuk. A szövetmintákat a dekapitálással megölt állatokból azonnal eltávolítottuk, és ha nem kerültek azonnal felhasználásra, —25 °C-on tároltuk. A vizsgálatainkhoz használt vegyszerek közül a benzpirén Sigma, a metilkolantrén Fluka, a NADP, NADPH és G-6-P Serva gyártmányú volt. A kristályos Insulin és a Hydrocortison a Kőbányai Gyógyszerárugyár készítménye volt. Az AHH aktivitását Nebert és Gelboin (1968) módszere szerint végeztük a Diamond (1972) által leírt módon. A reakcióelegyet 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd a reakciót 1 ml acetonnal állítottuk le. Az átalakulási terméket először hexánba, majd 1 N NaOH-ba ráztuk át, a lúgban oldódó 3-OH-Benzpirént Farrand spektrofotometeren 400 mm gerjesztésnél az 520 mm-en mért fluorescentia intenzitásával mértük. Az értéket ismert mennyiségű OH-Benzpirént tartalmazó hígítási sor fluorescentia görbéjével hasonlítottuk össze. A standard görbe készítéséhez szükséges 3-OH-Benzpirént Dr. Gelboin állította elő, és a Lyoni Rák-

kutató Centrum bocsátotta rendelkezésünkre. Az enzimaktivitást egységekben fejeztük ki, 1 E = az az AHH aktivitás, mely az inkubációs idő alatt 1  $\mu$ M 3-OH-BP keletkezését katalizálja. A G-6-Pase aktivitást Harper (1962) módszere szerint mértük. A reakcióelegy 0,1 ml 0,1 M-os (pH 6,5) citrát-pufferben homogenizált szövetmintát és 0,1 ml 0,08 M-os glükóz-6-P-t tartalmazott. A mintákat 15 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd a reakciót 2 ml 10%-os trklóecetsavval állítottuk le. A képződött anorganikus foszfor mennyiségét Fiske és Subarrow (1925) módszere szerint határoztuk meg. Az enzimaktivitást 1 mg fehérjét tartalmazó homogenát által 1 óra alatt felszabadított anorganikus foszfor mennyiségében fejeztük ki.

A glükóz-6-P-DH aktivitásának meghatározását Löhr és mtsa (1962) módszere szerint végeztük. A fotométer küvettába 2,4 ml (pH 7,5) 0,05 M-os trietanolamin-HCl puffert, 0,5 ml májhomogenizátumot, 0,05 ml 25 mg/ml töménységű NADP-t, majd 5 perc múlva 0,05 ml 0,04 M-os G-6-P-t teszünk. A képződő NADPH intenzitását 340 nm-en mértük. Az enzimaktivitást az 1 óra alatt képződő NADPH mennyiségében fehérjére, vagy nedvessúlyra vonatkoztatva fejeztük ki. Az enzimstimulációs kísérleteinkben a metilkolantrént egyszeri 25 mg/kg testsúly dózis intraperitonealis befecskendezésével, az állatok leölése előtt 24 órával adtuk. A hidrokortizon dózisa 250 mg/kg i.p. volt, a szert 1, 7, 24 órával az ölés előtt adagoltuk. Az Insulint 200 E/kg testsúly dózisban szubkután befecskendezéssel juttattuk az állatok szervezetébe. Az állatokat a kezelést követő 1,3 és 7. órában öltük meg.

### *Eredmények*

Vizsgálataink során először a 3 enzim alapaktivitását mértük meg. Az I. táblázaton látható, hogy a hepatomában az AHH és glükóz-6-Pase aktivitás megtalálható. Ez az eredmény azért figyelemre méltó, mert az általunk vizsgált tumorral azonos növekedési sebességű Morris hepatomákban a két enzim aktivitása gyakorlatilag már nem mérhető (Sugimura 1966, Weber 1968). A G-6-P DH aktivitás hasonlóan Weber (1963) és Shonk (1965) adataihoz, a tumorban jóval magasabb volt, mint a májban.

Összefoglalva tehát az MC-29 vírussal indukált májtumorból kialakított transzplantálható hepatomában két májra jellemző enzim aktivitását és egy, a malignus hepatomákra jellemző enzim aktivitás emelkedést tudtunk megfigyelni.

Stimuláló szereink a három enzim aktivitását a következő módon befolyásolták:

Metilkolantrén befecskendezése után 24 órával az AHH aktivitás az egészséges májban jelentősen fokozódott (2. táblázat). A hepatomában a kezelést követően az eredetileg is nagyon alacsony aktivitás csaknem nullára csök-



I. táblázat

Az aril-hidrokarbon-hidroxiláz, glükóz-6-foszfátáz és glükóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitása a csirkemájban és az MC-29 vírussal indukált hepatómában

Enzim	Mérések száma	Aktivitás pikomól 3-OH-BP/óra					
		per mg fehérje			per 10 <sup>6</sup> sejt		
		Máj	Hepatoma	% <sup>a</sup>	Máj	Hepatoma	% <sup>a</sup>
AHH	10	30,0 ± 4,5 <sup>b</sup>	4,4 ± 2,3	14,6	4,6 ± 0,7	0,42 ± 0,22	9,0
nanomól P <sub>i</sub> /óra							
		per mg fehérje			per 10 <sup>6</sup> sejt		
		Máj	Hepatoma	% <sup>a</sup>	Máj	Hepatoma	% <sup>a</sup>
G-6-Pase	10	1400 ± 182	800 ± 96	5 <sup>c</sup>	217 ± 28,2	76,48 ± 9,1	35,2 <sup>c</sup>
nanomól NADPH/óra							
		per mg fehérje			per 10 <sup>6</sup> sejt		
		Máj	Hepatoma	% <sup>a</sup>	Máj	Hepatoma	% <sup>a</sup>
G-6-P- DH	6	21,3 ± 3,0	121,8 ± 8,6	576 <sup>c</sup>	3,2 ± 0,46	11,5 ± 0,82	359 <sup>c</sup>

a: a tumorban mért aktivitás a máj aktivitásának %-ban kifejezve.

b: ± SE

c: a különbség statisztikailag szignifikáns, p < 0,005

AHH: aril hidrokarbon hidroxiláz

3-OH-BP —: 3-OH-Benzipirén

G-6-Pase: glükóz-6-foszfátáz

P<sub>i</sub>: anorganikus foszfor

G-6-P DH: glükóz-6-foszfát dehidrogenáz

II. táblázat

A metilkolantrén hatása a máj és a hepatoma aril-hidrokarbon-hidroxiláz és glükóz-6-foszfátáz aktivitására

	Kezelés	AHH	G-6-Pase
Máj	—	100	100
Máj	MC	528 <sup>a</sup>	90 <sup>b</sup>
Hepatoma	—	100	100
Hepatoma	MC	1 <sup>a</sup>	112 <sup>b</sup>

a: statisztikailag szignifikáns: p < 0,05

b: statisztikailag nem szignifikáns

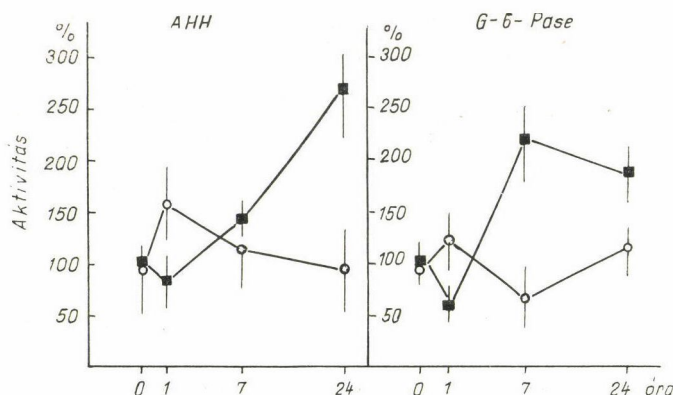
MC = metilkolantrén Dózis: 25 mg/testsúly kg 24 órán át

Eredmények a kezeletlen kontroll %-ában feltüntetve.

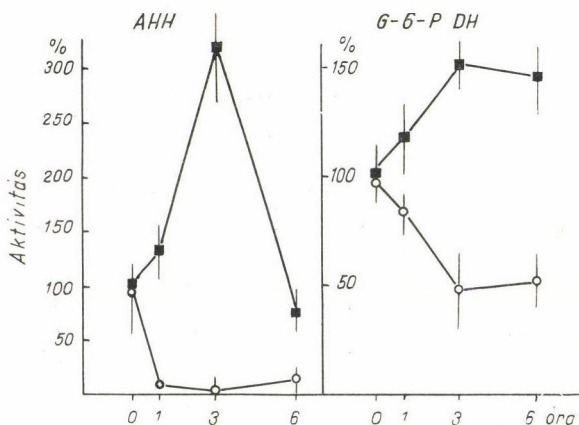
kent. A glükóz-6-foszfataz aktivitását a metilkolantrén érdemlegesen nem befolyásolta.

A szteroid hormonok közül stimuláló szerként kiválasztott hidrokortizon hatását a 2. ábrán tüntettük fel. A májban a kezdeti enyhe aktivitás csökkenést követően az AHH aktivitása nagymértékben fokozódik, hasonló módon emelkedik a G-6-Pase aktivitás is. A szteroid hatására a tumorban sem az AHH, sem a G-6-Pase aktivitása nem változik.

200 E/kg testsúly Insulin subcutan befecskendezése után jellemző változás az AHH és a G-6-P DH aktivitásában volt észlelhető. A májban az AHH és a G-6-P DH aktivitása a szer adását követő 3. órára jelentősen fokozódik,



2. ábra. 250 mg/kg testsúly hidrokortizon hatása a máj és a hepatoma AHH, illetve glükóz-6-foszfataz aktivitására. — máj, o—o hepatoma. Az eredményeket az alapaktivitás %-ában kifejezve tüntettük fel. Az egyes pontok 5-5 párhuzamos vizsgálatnak felelnek meg.



3. ábra. 200 E/kg testsúly Insulin hatása a máj és a hepatoma AHH, illetve glükóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitására. — máj, o—o hepatoma. Az eredményeket az alapaktivitás %-ában kifejezve tüntettük fel. Az egyes pontok 5-5 párhuzamos vizsgálatnak felelnek meg.

majd a továbbiakban az AHH aktivitása rohamosan zuhan, a G-6-P DH lassan, de a 6. órára szintén csökken és közeledik eredeti értékéhez (3. ábra). A tumorban az Insulin hatására az AHH aktivitás csaknem teljesen eltűnik. A kísérlet során gyorsteszt segítségével tájékozódunk az állatok vércukor értékéről, mely szintén a 3. órában bizonyult a legalacsonyabbnak.

### *Megbeszélés*

Vizsgálataink során választ szerettünk volna kapni arra a kérdésre, hogy egy vírus által előidézett májtumorból kialakított transzplantálható hepatoma rendelkezik-e a sejtanyagcsere olyan lépéseivel, melyek a májra jellemzőek, és ha igen, ezek a folyamatok befolyásolhatók-e különböző szabályozó tényezőkkel. A három enzim aktivitását vizsgálva megállapíthattuk, hogy hasonlóan a kémiai karcinogénekkal indukált transzplantálható hepatomákhoz, az MC-28 vírus által indukált hepatoma transzplantálható formájában is jelentősen csökkent a két mikroszomális enzim és nőtt a G-6-P DH aktivitása. Említésre méltónak tartjuk azonban, hogy a vizsgált tumor növekedési ütemét figyelembe véve a mikroszomális enzimek csökkenésének mértéke kisebb, mint a kémiai karcinogénekkal indukált tumorokban, mivel hasonló gyors növekedésű Morris hepatoma a két enzimet már nem tartalmazza (Sugimura 1966, Weber és Lea 1967, Weber 1968). A májspecifikus enzimeken kívül ki tudtuk mutatni a malignus hepatomákra jellemző emelkedett G-6-P DH aktivitást is (Morris 1965, Weber 1963, Shonk 1965). A G-6-Pase és az AHH viszonylag jól megőrzött volta vetette fel a kérdést, vajon stimulusok hatására ezen enzimek működése a májban és a tumorban hasonló módon változik-e meg. A metilkolantrénnel és a két endogén hormonnal, végzett stimulálás hatására vizsgált enzimek aktivitása a májban fokozódott. A hepatomában aktivitás fokozódását egyik szer sem volt képes kiváltani, sőt metilkolantrénnel és hidrokortizon hatására az AHH, Insulin hatására pedig az AHH és a G-6-P DH enzim aktivitása csökkent.

Az AHH és a G-6-Pase aktivitás jelenléte az általunk vizsgált tumorban arra utal, hogy a máj differenciált funkcióiért felelős genetikai információk megtalálhatóak és — legalábbis bizonyos mértékben — képesek a tumorsejtekben is érvényesülni. Klinikai megfigyelések is arra utalnak, hogy számos differenciált tevékenység fokozódhat, vagy akár megjelenthet bizonyos daganatokban (Weber 1974). Ez szintén arra utal, hogy a dedifferenciálódás biokémiai értelemben nem szükséges velejárója a malignitásnak. Vizsgálataink, melyek rámutattak, hogy a tumorsejtek elvesztik érzékenységüket specifikus stimuláló szereik iránt inkább a sejtreguláció károsodásának alapvető szerepére utalnak. Pitot és Cho (1965) számos vizsgálat eredményeképpen szintén azt a következtetést vonták le, hogy a tumorok enzim stimuláló hatásokra sokkal kevésbé reagálnak, mint a normális, egészséges sejtek.

Vizsgálataink bizonyítékot szolgáltatottak arra, hogy a Weber (1974) által kémiai karcinogénekkal előidézett hepatomákban megfigyelt gén-expresszió újra programozódás a vírus karcinogenezis során is kialakul.

### Összefoglalás

Szerzők májspecifikus enzimek viselkedését vizsgálták egy vírussal kialakított májtumor transzplantálható formájában.

Megállapították, hogy a tumorban a máj aril hidrokarbon hidroxiláz aktivitásának kb. 10%-a, a glükóz-6-foszfátáz aktivitásának mintegy 1/3-a mérhető. Kimutatták a malignus hepatomákra jellemző emelkedett glükóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitást is. A májspecifikus enzimek aktivitásának relatíve magas volta ellenére a hepatomában stimuláló szerekekkel aktivitás fokozódását nem lehetett kiváltani.

Szerzők véleménye szerint ezek az adatok arra utalnak, hogy a malignizáció során a genetikai információk megnyilvánulását szabályozó tényezők károsodása fontos szerepet játszik.

### IRODALOM

- Ashmore, J. és Weber, G.: Vitamins and Hormons XVII. 91 (1959).  
 Diamond, L., McFall, R., Miller, J. és Gelboin, H. V. Cancer Res. **32**, 731 (1972).  
 Fiske, C. H. és Subarrow, I. J. Biol. Chem. **66**, 375 (1925).  
 Gelboin, H. V.: Advances in Cancer Res. **10**, 1 (1967).  
 Harper, A. E. és Bergmeyer: Methoden der Enzymatischen Analyse. Verlag Chemie. GMBH. Weinheim/Bergstr. (1962).  
 Langdon, R. G. és Weakley, D. R.: J. Biol. Chem. **214**, 167 (1955).  
 Lapis, K., Beard, D. és Beard, J. W.: Orvostudomány **25**, 151 (1974).  
 Löhr, G., W., Waller, H., D. és Bergmeyer: Methoden der Enzymatischen Analyse. Verlag Chemie. GMBH. Weinheim/Bergstr. (1962).  
 Morris, H. P.: Advances in Cancer Research **9**, 227 (1965).  
 Miyaji, H., Morris, H. P. és Wagner, B. P.: Methods in Cancer Research IV, 153 (1968).  
 Nebert, D. W. és Gelboin, H. W., J.: Biol. Chem. **243**, 6242 (1968).  
 Pitot, H. C.: Cancer Res. **23**, 1474 (1963).  
 Pitot, H. C. és Cho, Y. S.: Progress in Experimental Tumor Res. **7**, 158 (1965).  
 Shonk, C. E.: Cancer Res. **25**, 671 (1965).  
 Sugimura, T.: Cancer Res. **26**, 1711 (1966).  
 Weber, G. és Morris, H. P.: Cancer Res. **23**, 987 (1963).  
 Weber, G. és Lea, M. A.: Methods in Cancer Reserarch. **2**, 523 (1967).  
 Weber, G.: Naturwissenschaft **55**, 418 (1968.)  
 Weber, G.: In: Differentiation and Control of Malignancy of Tumour Cells. Ed: (NAKAHARA) pp. 151. Proc. 4 th international Symposium of the princess Takamatsu Cancer Research Fund, Tokyo: University of Tokyo Press, 1974.



A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója. Műszaki szerkesztő: Agócs András  
A kézirat nyomdába érkezett: 1976. IV. 28. — Terjedelem: 6,2 (A/5) ív  
76.3124 Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György



**TARTALOMJEGYZÉK**

<i>Jellinek Harry: Megemlékezés Haranghy Lászlóról</i> .....	3
<i>Gegesi Kiss Pál: Az orvostudományi egyetemek önállósága kialakításának célja.</i> .....	7
<i>Stark Ervin: Az adrenocorticotroph hormon (ACTH) elválasztást szabályozó mechanizmusok</i> .....	17
<i>Ferencz Géza, Szende Béla, Lapis Károly és Podmaniczky Erzsébet: Scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok kezeletlen és 20-methylcholanthrennel in vitro malignusan transformált egér embrió fibroblast sejtek tenyészetein</i> .....	37
<i>Podmaniczky Erzsébet, Szende Béla, Lapis Károly és Ferencz Géza: MC—29 vírussal fertőzött csirke-embryo fibroblast (CEC) kultúrákban megfigyelhető sajátos sejtfelszíni változások</i> .....	41
<i>Tóth Miklós, Zakár Tamás és Antoni Ferenc: A tesztoszteron 19. metil csoportjának jelentősége az androgén hatás biokémiai mechanizmusában</i> .....	45
<i>Knoll Berta: Krónikus para-brom-metamfetamin (V—111) kezelés hatása patkányok tanulási és memóriatároló képességére</i> .....	59
<i>Kovalszky Ilona, Jeney András, Asbót Richard és Lapis Károly: Az MC-29 vírus által okozott májrákból kialakított transzplantálható hepatoma biokémiai vizsgálata. I. A csirkemáj és a hepatoma DNS, RNS, fehérje és foszfolipid tartalmának összehasonlítása</i> .....	71
<i>Kovalszky Ilona, Jeney András, Asbót Richard és Lapis Károly: Az MC-29 vírus által okozott májrákból kialakított transzplantálható hepatoma biokémiai vizsgálata. II. Összehasonlító enzimindukciós vizsgálatok a hepatoma és májszövetben</i> .....	79

*Megjelent: 1976. XI. 12.*

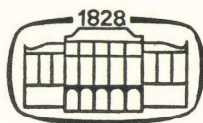


ORVOSTUDOMÁNY

SZERKESZTI: KNOLL JÓZSEF

27.  
KÖTET

A MAGYAR  
TUDOMÁNYOS  
AKADÉMIA  
V. ORVOSI  
TUDOMÁNYOK  
OSZTÁLYÁNAK  
KÖZLEMÉNYEI



AKADÉMIAI KIADÓ, 1976

2.  
SZÁM

# ORVOSTUDOMÁNY

A Magyar Tudományos Akadémia V. Orvosi Tudományok Osztályának  
Közleményei

A SZERKESZTŐ BIZOTTSÁG TAGJAI:

BABICS ANTAL, ERNST JENŐ, GEGESI KISS PÁL, HAYNAL IMRE,  
KERPEL—FRONIUS ÖDÖN, MISKOLCZY DEZSŐ, ZSEBŐK ZOLTÁN

FŐSZERKESZTŐ

KNOLL JÓZSEF

TECHNIKAI SZERKESZTŐ

KNOLL BERTA

SZERKESZTŐSÉG: 1085 BUDAPEST, ÜLLŐI ÚT 26.

KIADÓHIVATAL: 1363 BUDAPEST, ALKOTMÁNY UTCA 21.

*Az Orvostudomány* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Négy füzet alkot egy kötetet. Évenként általában egy kötet jelenik meg.

*Az Orvostudományban* az Osztály rendezvényein elhangzott előadások, az Osztály tagjainak eredeti vagy összefoglaló közleményei, továbbá az MTA saját intézeteinek közleményei jelennek meg. Kéziratok a következő címre küldendők:

*Orvostudomány*

1085 Budapest VIII., Üllői út 26.

A közlésre el nem fogadott kéziratokat a szerkesztőség lehetőleg visszajuttatja a szerzőhöz, de felelősséget a beküldött kéziratok megőrzéséért vagy továbbításáért nem vállal.

*Az Orvostudomány* előfizetési ára kötetenként 60 forint. Megrendelhető belföldre az Akadémiai Kiadónál (1361 Budapest Alkotmány u. 21. Pénzforgalmi jelzőszámunk 215—11488.), külföldre a „KULTÚRA” Könyv és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (1389 Budapest Postafiók 149. Pénzforgalmi jelzőszám: 218-10990 sz.) vagy annak külföldi képviselőinél és bizománysainál.

A Magyar Tudományos Akadémia V. Orvosi Tudományok Osztálya a következő idegen nyelvű folyóiratokat adja ki:

1. *Acta Chirurgica,*
2. *Acta Medica,*
3. *Acta Microbiologica,*
4. *Acta Morphologica,*
5. *Acta Paediatrica,*
6. *Acta Physiologica.*

E lapok hivatottak a magyar orvostudományok eredményeinek legjavát a külfölddel megismertetni.

A cikkek orosz, német, angol vagy francia nyelven jelennek meg a szerző kívánsága szerint, összefoglaló pedig további egy, ill. két nyelven. A dolgozatot magyar vagy a megfelelő idegen nyelven a következő címre kell beküldeni:

*Acta Chirurgica* szerkesztősége, 1082 Budapest VIII., Üllői út 78/b.

*Acta Medica* szerkesztősége, 1083 Budapest VIII., Szigony u. 43.

*Acta Microbiologica* szerkesztősége, Országos Közegészségügyi Intézet, 1097 Budapest IX., Gyáli út 4.

*Acta Morphologica* szerkesztősége, Szövet- és Fejlődéstan Intézet, 1091 Budapest IX., Üllői út 93.

*Acta Paediatrica* szerkesztősége, 1083 Budapest VIII., Bókay J. u. 53.

*Acta Physiologica* szerkesztősége, 7642 Pécs. Rákóczi u. 80. Élettani Intézet.

## AZ IMMUNVÁLASZ KÓROKOZÓ KÖVETKEZMÉNYEI\*

KESZTYŰS LÓRÁND akadémikus

Közlésre érkezett: 1976. VII. 6.

5 évvel ezelőtt próbálták meg felmérni a világon megjelenő orvosi szaklapok számát. A *Pharmazeutische Zeitung AD 1/74/2* jelzésű szerkesztőségi közleményének (1974) nem teljesen megbízható becslése mintegy 10 000—20 000 orvosi folyóirattal számolt, melyek évente 1 500 000 dolgozatot tettek közzé. *Martin* (1967) valamivel régebbi összeállítása úgy véli, hogy 10 év alatt — 1950—1960 között — az orvosi és biológiai nyomdatermékek oldalszáma valamivel meghaladja az időszámításunk kezdete óta 1950-ig megjelent összes ilyen tárgyú kiadványokét. A biológiai és az orvostudományi ismeretanyag e hallatlan bővülésében és fejlődésében a II. világháborút követő periódusban az élenjárók közé került az elméleti és klinikai immunológia, melynek rendkívüli mennyiségben felgyűlt új szempontjai és megállapításai elválaszthatatlanul összefonódnak a molekuláris biológia, a biokémia, a genetika, a pathologia és a pharmacologia különböző korszerű alapkérdéseivel. Az orvostudomány összes hagyományos szakterületeit penetrálják a fejlődésbe lendült immunológia új felismerései, s mindezeknek tagadhatatlan jelentőségük van a korszerű biológiában is. Tükrözik a fentiek realitását *Humphrey és mtsa* (1970), ill. *Waksman* (1971) becslései, melyek szerint a biológia, valamint az elméleti és klinikai orvostudomány területéről publikált nyomdatermékek 10—20%-a — tehát évente mintegy 100 000—300 000 közlemény — immunológiai tárgyú, vagy immunológiai módszereket alkalmaz.

Szaktudománya fejlődésének örül ugyan az immunológus, de ugyanakkor nyomasztónak érzi, hogy az információ-lavina eltemeti, képtelen elkülöníteni a valóban új felismeréseket a régiek reprodukálásától, az alapvetően értékeset a felesleges haszontalantól. Ez a szelektálás a jövőben egyre nehezebb lesz, mert egyfelől az elméleti felfedezések gyakorlati alkalmazása előreláthatóan tovább bővíti és finomítja az ismereteket, ezért az immunológia fejlődése még a görbe felszálló szárán tart csupán, a plátót nem érte el; másfelől a publikációs kereslet meghaladta a „kritikus tömeget”, így a legrangosabb

\* Előadás. Elhangzott a Magyar Tudományos Akadémia 1976. május 4-i ülésén.

immunológiai folyóiratok közlési politikája financiális korlátozásokat vezetett be.

## ANNOUNCEMENTS

*1. Page Charges and Financial Responsibility.* Beginning with the first issue of the *Journal of Immunology* in 1976, there will be a charge of \$30.00 per page for all regular articles and all Communications. There will be no free page allowance. Manuscripts accepted several months before, in 1975, that will appear in 1976 will be subject to the page charge. At the time of acceptance of a manuscript, the author(s) or the financial officer of their institution will commit themselves to pay this charge. No exceptions can be made.

### *1. ábra*

Mint az 1. ábra mutatja, a *Journal of Immunology* 1976 januárjától kezdve a közlemények szerzőivel oldalanként 30 \$-t fizettet — kivétel nincs; ez az anyagi census csökkentheti ugyan az információ-áradatot, de veszélyei is kézenfekvők: pl. érthetetlenre rövidült közleményekkel, az etikailag eddig is kifogásolt hivatkozások továbbromlásával, a dollárfedezet hiányában nem közölt értékes eredményekkel stb. kell számolnunk a jövőben.

E helyzet megértéséhez tudnunk kell, hogy az immunológia tudományos kutatása későn, a XIX. század második felében indult meg. Ezt megelőzően csak sporadikus megfigyelésekkel — hogy ti. némely fertőző betegség átveszélése védettséget ad — és egy-egy empirikus — bár gyakorlatilag nagyjelentőségű — próbálkozással találkozunk (pl. oltások kidolgozásával és bevezetésével a himlő, a veszettség, a lépfene ellen). Ezek következtében és a későbbi eredmények alapján hosszú időn keresztül mindenki általánosan elfogadta, hogy a magasabb rendű állati élőlények: a gerincesek fajlagos immunfolyamatai a kórokozó mikroorganizmusokat a szervezetből kiküszöbölő, a különleges élő kórokozókkal és azok termékeivel szemben megnyilvánuló, célszerű biológiai alkalmazkodást képviselik. Ebből következett, hogy az immunológia a mikrobiológiai és epidemiológiai kutatásokkal szorosan összekapcsolódott, e diszciplínák segédtudományaként eredményeit a fejlett országok egészségügyi gyakorlata a fertőző, járványos állati és emberi betegségek megelőzésére és visszaszorítására alkalmazta. Nem is eredménytelenül, mert a védőoltások bevezetése után az ilyen kórfolyamatok zöme szórványbetegséggé változott; tömeges pusztító járványok nem fordultak elő, vagy jóval enyhébb következményekkel jelentkeztek. Nem vitatható, hogy az immunológia e kezdeti értelmezése és felismerései a civilizált emberi társadalomban oly nagy szerepet játszó százezres—milliók metropolisok létesülésében és fennmaradásában, azaz az urbanizációs tendenciában lényeges, sőt döntő jelentőségűek voltak, bár az immunológia és a társadalomtudományok ennek kritikai

elemzésével és megbízható értékelésével egyelőre még adóssak. Hazánkban az elmúlt évtizedben a járványos gyermekbénulás és a kanyaró ellen szervezett kötelező oltások képviselik e régebbi, de ma is fontos immunológiai irányzatot.

Az immunfolyamatok most vázolt értelmezése azonban csak szélső határeset, már századunk elején kiderült, hogy a gerinces állatokban és az emberben nemcsak a kórokozó mikroorganizmusok és termékeik, hanem a szervezetet közvetlenül nem károsító — látszólag hatástalan, semleges, indifferensnek tűnő —, de nem-saját (idegen) makromolekulák is immunválaszt indukálnak; a kísérletes *anaphylaxia* és az emberi túlérzékenységek, *allergiás betegségek* pathogenesisében fajlagos immunfolyamatok szerepelnek. A teleologikus orvosi gondolkodásmód eleinte képtelen volt elfogadni, hogy az immunválasz egyszer kedvező hatású védettséget eredményez a kórokozóval szemben, máskor viszont súlyos túlérzékenységi tüneteket, sőt halált is okozhat ártalmatlannak látszó ételek, italok és más, a környezetből a szervezetbe kerülő anyagok alkotórészeivel kapcsolatban; ráadásul a kedvező védettség és az allergiás kórtünetek egymás mellett ugyanabban az egyedben párhuzamosan is jelentkezhettek. Évtizedeken át meddő erőfeszítések folytak kiemelkedő tekintélyű kutatócsoportok részéről annak érdekében, hogy elvileg elkülöníthessék a védettséget eredményező immunválaszt a túlérzékenységet okozó allergiás folyamatoktól.

E próbálkozások során azonban egyre több betegség elemzése azt bizonyította, hogy nemcsak idegen sejtek és makromolekuláris komponenseik indítanak el fajlagos immunfolyamatokat, hanem bizonyos körülmények között a szervezet saját sejtjei és makromolekulái is idegenként viselkednek, „elidegenednek” és immunválaszt indukálhatnak, ami sejt- és szövetpusztulást okozhat. Ezekkel az ún. *autoimmun betegségekkel* kapcsolatban az immunológia vetette fel először az *önfelismerés* kérdését: a saját és a nem-saját makromolekulák, ill. sejtjeik eldifferenciálásának alapvető biológiai fontosságát. Az immunválasz leglényegesebb komponenseinek: az immunocytáknak és termékeiknek, az immunglobulinoknak a képződését kutatva — az immunológia a lymphocyták keletkezésének és fejlődésének, valamint a proteinek szintézisének, sorsának törvényszerűségeivel kapcsolatban olyan elvileg új megállapításokra jutott, amelyek a sejtanyagcsere, a reproduktív mechanizmusok szerkezeti és funkcionális részleteiben nélkülözhetetlenek; ezek révén az immunológia a biológiai kutatások centrumába került.

Így új szemlélet alakult ki nemcsak az immunológia, hanem az elméleti és gyakorlati orvostudományi ágazatok és a biológia számára is, e szerint az evolúció során kialakult immunfolyamatok a magasabb rendű gerincesek sejtjeinek, szöveteinek kémiai identitását, állandóságát biztosítják; megakadályozzák, ill. csökkentik a sejtek önreproduktív kódrendszerének makromolekulák által előidézett vagy az életfolyamatok során külső és belső okokból keletkező variációit, mutációját. Más szavakkal: az *immunfolyamatok védik*

a phylo- és ontogenetikus variációs lehetőségek közül kiszelektálódott faji, nemi és egyedi kódrendszert.

A kódvédelmet biztosító immunitás szempontjából teljesen érdektelen: vajon a szervezetbe került vagy ott képződött nem-sajátnak, idegennek felismert sejt vagy makromolekula önmagában kórokozó-e vagy nem, a kódvédelmet az immunrendszer még azon az áron is biztosítja, ha a válasz miatt a szervezet károsodik, ill. esetleg el is pusztul.

Ez a felismerés elvileg új és a réginél jóval bonyolultabb feladatok megoldását állította az immunológiai kutatások gyűjtőpontjába. *Landsteiner* ugyan már 1930-ban megjósolta, hogy „az új kutatási irány mindjobban el fogja téríteni az immunológiát eredeti céljától — ti. a fertőző betegségek elleni védekezés mechanizmusának tanulmányozásától, és az élettan, a biokémia önálló fejezetévé fogja azt átformálni, mely azokkal a sajátosan fajlagos reakciókkal foglalkozik, melyek az életfolyamatok során a legkülönbözőbb formában nyilvánulnak meg”. De valószínűleg *Landsteiner* és hívei sem becsülhették meg reálisan 3—4 évtizeddel ezelőtt az immunológiai kutatások rendkívüli fejlődését.

Ezt próbálják érzékeltetni a következő táblázatok, melyek *Waksman* (1971) joggal kritizálható és több szempontból hiányos összeállítása nyomán „rendszerzik” az új immunológiai szemléletre alapuló legfontosabb kutatási irányokat. Az I. táblázat az immunokémiai kutatásokat foglalja össze.

A régebbi szemlélet alapján is kutatott témákat a szokásos szedés mutatja be, a vastagabb szedés jelzi az immunológia új értelmezése következtében elindult irányokat. Ebbe a csoportba tartoznak az immunogenitás és antigénitás elkülönítése, a carrier és adjuvans hatás, a szintetikus antigének, az immunogenitás genetikai alapja, a histocompatibilis antigének, autoantigének, tumorspecifikus antigének. Az ellenanyagok, a complement és az antigen-antitest reakciók korszerű immunokémiai kutatása majdnem teljes egészében az új szemléleten alapul.

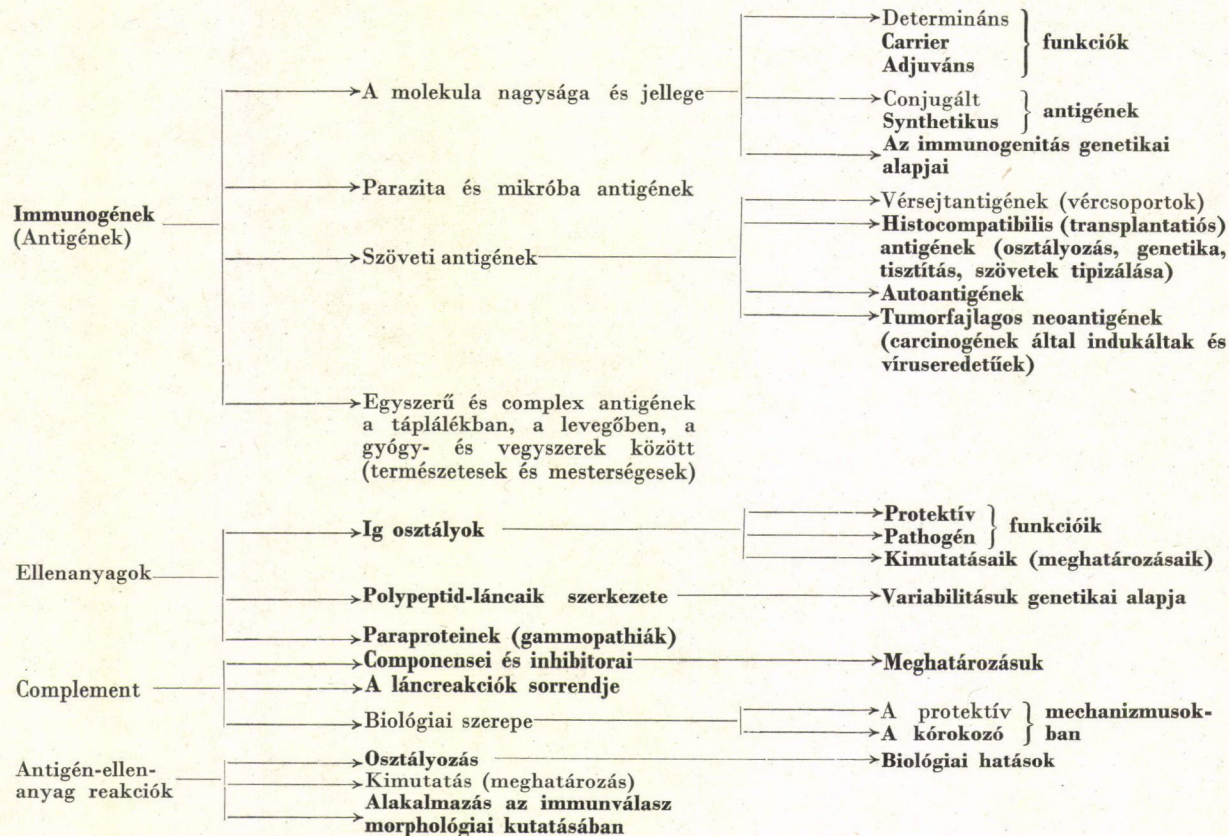
Az immunokémiában a régi szemlélet alapján is maradandó és tovább folytatásra alkalmas eredmények keletkeztek, de a cellularis immunitás kutatását zömében az új értelmezés inspirálta.

A II. táblázatban ennek megfelelően alig látunk szokásos (normál) szedést, a jelenlegi irányoknak alig néhány éves múltjuk van.

A III. táblázat már tulajdonképpen a tágabb értelemben vett immunopathologia részét képezi. Bemutatja, hogy a klasszikus védettséget is csak humoralis szinten kutatta a régi immunológia, az intracellularis fertőzések ellen működő cellularis immunitás és az immunhiányos állapotok korszerű tanulmányozása már az új immunológiai szemlélet eredménye.

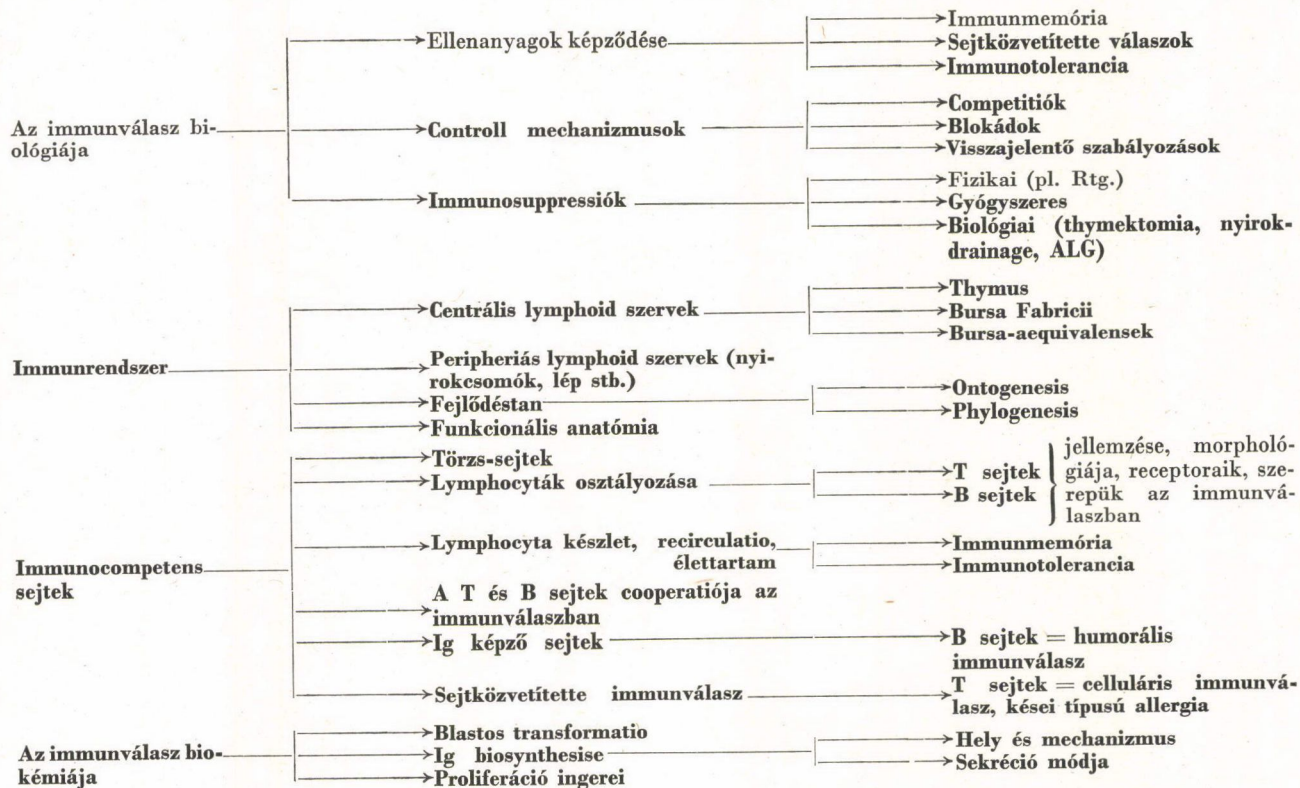
A IV. táblázat foglalja össze azokat a mechanizmusokat, melyek révén az immunválasz betegségeket okoz. A klinikai orvostudomány szempontjából az egészségügy gyakorlatában ma e kutatásoknak van közvetlen jelentősége.

I. Táblázat  
IMMUNOKÉMIA



(fett szedés) = az immunológia új értelmezése nyomán elindult kutatási irány

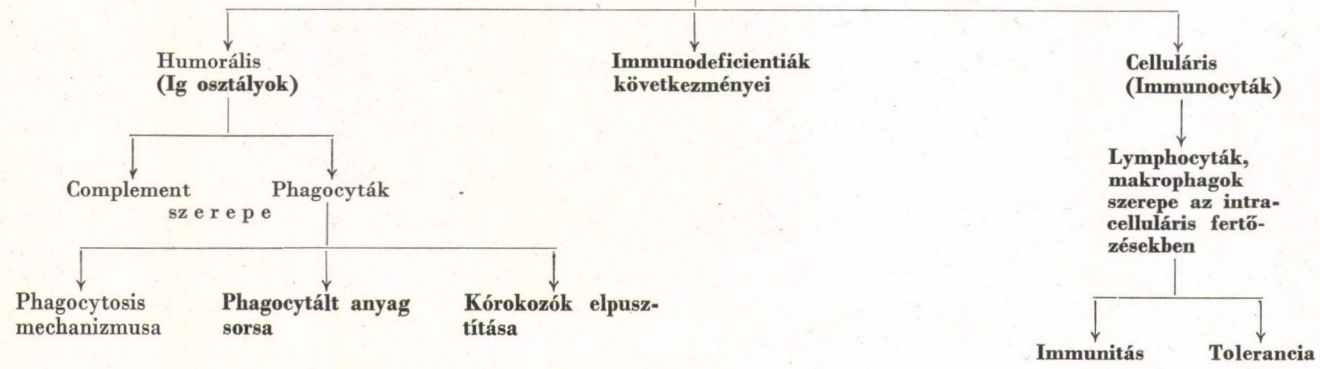
## II. Táblázat CELLULÁRIS IMMUNITÁS



(fett szedés) = az immunológia új értelmezése nyomán elindult kutatási irány



**III. Táblázat**  
**AKTÍV ÉS PASSZÍV IMMUNITÁS**



(fett szedés) = az immunológia új értelmezése nyomán elindult kutatási irány

Már századunk elején feltűnő volt, mennyire rövid időn belül értékesítették az elméleti immunológia eredményeit a kórházi és járványügyi gyakorlatban. Efontosság indokolja azt, hogy az V. táblázatban áttekintést adunk az immunopathologia legfontosabb módszereiről.

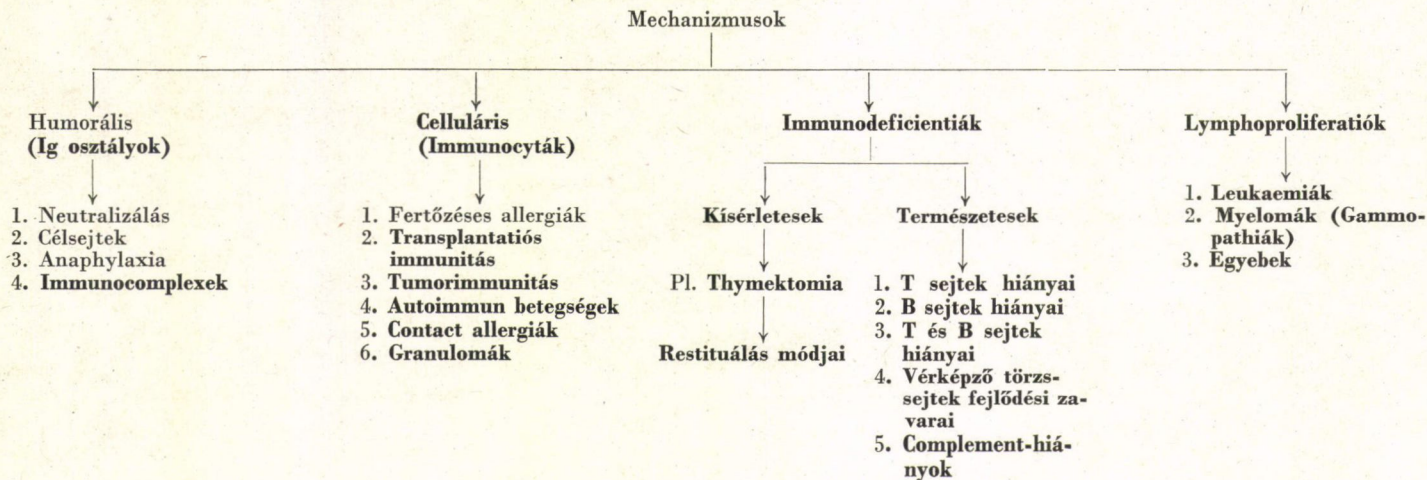
Itt a *klinikai immunológia* területe rendkívül nagy. A serumbetegségtől kezdve ide tartoznak a gyógyszerek, a vértransfúziók által előidézett reakciók, a transplantatumok kilökődése. Kóros immunválasz szerepel az immunodeficientiákban, myelomákban, lymphomákban, leukaemiákban, Hodgkin-kórban, sarcoidosisban. Allergia jelentkezik a fertőző agensek ellen streptococcusok után, tuberculosisban, leprában, brucellosisban, a tüdő és más szervek gombás betegségeiben, féreg-infestációkban, vírusfertőzésekben, syphilisben. Már régen ismertek az „atopiás” szénaláz és asthma, az izeltlábúak által okozott allergiák. A bőr urticariái és angiooedemája, a contact dermatitis, eczemák, anaphylactoid purpurák, erythema nodosum, multiforme háttérben ugyanúgy immunválasz áll, mint a fény, a meleg és a traumák által okozott egyes tünetek mögött. Az autoimmun betegségek közé sorolhatjuk a systemás lupus erythematosust, a periarteriitis nodosát, dermatomyositist, amyloidosist, immunhaemolysiseket, thrombocytopeniákat, glomerulonephritist, myasthenia gravist, a Grave- és a Hashimoto-betegséget, a hypoparathyroidismusok, anaemia perniciosaék jelentős részét. Immunválaszra utaló jellegzetességeket észlelhetünk egyes férfi és női meddőségekben, diabetes mellitusban, a demyelinisatiós folyamatokban, az uveitisekben, a máj különböző betegségeiben, a fekélyes colitisben, a myocardium károsodásaiban stb.

Még hosszan lehetne folytatni ezt a felsorolást: mely betegségek pathomechanismusában játszik elsődleges (domináns) vagy nagyobb, ill. kisebb következményes (másodlagos) szerepet a fiziologiás, esetleg a pathologiás fajlagos immunválasz. Ehelyett egyszerűbb és célravezetőbb, ha megfordítva arra utalunk, hogy csupán az akut halálos traumák és mérgezések pathogenesiséből zárhatjuk ki teljes biztonsággal az immunmechanismust.

Ez is világosan demonstrálja: mennyire nem üres frázis, hogy az immunológia új szempontjai penetrálták az orvostudomány minden ágazatát. Ez egyfelől előnyös, mert a klinikai medicina vagy az elméleti orvostudomány bármely részterületén eredményeket produkáló kutató bekapcsolódhat a régebbi témájával a korszerű immunológia művelésébe, ha vállalja az új immunológiai szemlélet, az új eredmények megismerését és elsajátítását, begyakorolja az adekvát methodikát. Másfelől azonban hátrány is, mert nehéz ma korszerű medicinális stúdiumokat folytatni immunológiai tudás nélkül: a valóban modern tanulmányok ugyanis törvényszerűen találkoznak az immunválasz ilyen vagy olyan formájával, következményeivel. Ezért mondhatjuk, hogy a *jelen orvostudományában az egyik vezérfonal a korszerű immunológia*.

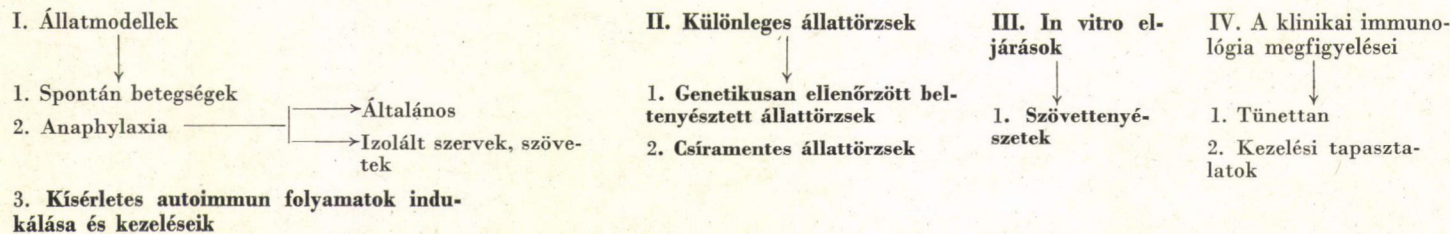
Szükséges ezt kiemelni, hangsúlyozni, mert a korszerű immunológia most vázolt fejlődése annyira gyorsan — néhány év alatt — következett be,

IV. Táblázat  
IMMUNOPATHOLOGIA



(fett szedés) = az immunológia új értelmezése nyomán elindult kutatási irány

V. Táblázat  
AZ IMMUNOPATHOLOGIA MÓDSZEREI



(fett szedés) = az immunológia új értelmezése nyomán elindult kutatási irány

hogy a felelős szervek világszerte megkésttek, és így az Egészségügyi Világszervezet ajánlásainak kellett figyelmeztetniük arra, hogy az egyetemi orvosképzésben sem nélkülözhető az immunológia egészének rendszeres oktatása. Jelenleg hazánkban immunológiát oktató önálló intézet csak az Eötvös Loránd Tudományegyetem TTK-án működik, kedvező kilátások körvonalazódnak az Állatorvosi Egyetemen is, de az orvostudományi egyetemeken a kórélettan, a mikrobiológia, a bel- és a bőrklinikák stb. működésével pótolgatják az önálló immunológiai intézeteket. A szükségmegoldásból származó hátrányok kézenfekvők: a hallgatók csak részleteket kapnak az ismeretekből; tanszéki iskolák nehezebben fejlődnek ki; ha mégis létrejön egy-egy, az monopol helyzetbe kerül stb. Ebből a teendőkre vonatkozó következtetések könnyen levonhatók.

## II.

Az immunológia vázolt tárgyköréből, széles spektrumából az elméleti és a klinikai orvostudomány művelője érdeklődésének és előképzettségének megfelelő kutatásokat választhat magának a felszerelési lehetőségek korlátain belül. Ebből érthető, hogy az előbbi általános vázlat után a pathophysiológus a fajlagos immunválasz kórokozó hatásai közül igyekszik néhányat röviden elemezni.

Az alapvető szemléleti változás itt az, hogy mind a humoralis, mind a cellularis immunválasz lehet pathogen, egyes konkrét betegségekből pedig egymás mellett szerepelhetnek. A cellularis immunválaszért a thymuseredetű T sejtek a felelősek, a humoralis immunválasz viszont a B lymphocytákból származó plasmasejtek által termelt Ig-okon alapul. A T és B sejtek legfontosabb különbségeit összeállításom (1975) alapján a VI. táblázat mutatja be.

### VI. Táblázat

#### ELTÉRÉSEK A T ÉS A B LYMPHOCYTÁK KÖZÖTT

##### *T lymphocytá*

1. Nagyon radiosenzitív
2. Thymektómia, ALG kezelés után számuk csökken
3. Kis immunogén-adagra proliferál
4. A sejtmembránba épült receptorai ismeretlen Ig-k; carrierspecifikusak
5.  $\theta$ -alloantigént tartalmaz
6. Hosszú életű
7. Kései túlérzékenységet okoz

##### *B lymphocytá*

1. Kevésbé radiosenzitív
2. Thymektómia, ALG kezelés után számuk változatlan
3. Proliferálásához 10-szer több immunogén szükséges
4. A sejtmembránon ismert Ig osztályokba tartozó receptorok mutathatók ki; haptenspecifikusak
5.  $\theta$ -alloantigenje nincs
6. Rövid életű
7. Korai túlérzékenységet okoz

A legrégebben ismert és kutatott immunopathogen mechanizmus: az *anaphylaxia*. Lényege, hogy az immunogén (*anaphylactogen*) hatására a B sejtek plasmocytás átalakulással — ehhez *Rajka* és *mtsa* (1974) irodalmi

összefoglalása szerint sokszor a T sejtek segítsége is szükséges — cytophil Ig-okat termelnek, melyek hízósejtekhez és basophil granulocytákhoz (továbbá vérlemezkékhez és eosinophilekhez) fixálódnak. Ez az ún. *sensibilizálás*.

Ezeknek a cytophil ellenanyagoknak a jellemző tulajdonságait mutatja be *Stanworth* (1973) nyomán a VII. táblázat.

### VII. Táblázat

#### *Anaphylaxiás Ig-k*

1. A célsejtek (hízósejtek, basophilek stb.) receptoraihoz affinisek, fixálódnak
2. A homológ fajlagos immunogénnel reagálnak
3. Ezáltal mediatorok felszabadulását indukálják
4. A helyi reakció területére egyéb sejteket (pl. eosinophileket) akkumulálnak

Állatok vagy az ember *aktív* sensibilizálásakor az immunogen indukálta homocytotrop vagy anaphylaxiás ellenanyagok, a *reaginok* az IgE osztályba tartoznak. A human IgE formulája  $\epsilon_2 \kappa_2$ , ill.  $\epsilon_2 \lambda_2$ ; molekulásúlya kb. 200 000, amit a nehéz  $\epsilon$ -lánc feltűnően nagy, 72 500-ra becsült molekulásúlya magyaráz.

$\gamma_1$ -glycoproteid 11% szénhidrat tartalommal. Féléletideje: 2,3 nap. A savó magas IgE szintje (2000 ng, ill. 200 I.E./ml felett) valószínűsíti a betegség allergiás diagnózisát. Eredményes specifikus deszenzibilizálás esetén a serumban az IgE szint a kezdeti érték felére csökken. Egérkísérletek szerint az IgE-t más B-lymphocyták termelik, mint az IgG-t. Immunogen után adott ALS a reaginok képződését fokozza és prolongálja. Az IgE termelésének esetleges („feed back”) visszajelentő mechanizmusa eddig nem ismert, pedig a fajlagos deszenzibilizálás misztikus empíriáját ilyen kutatások tennék objektív, racionális therápiává.

Homocytotrop reagin az IgE mellett *Gergely* és *mtsai* (1974) szerint az IgG4 alosztály. Tengerimalachban és egérben az IgG1, patkányban és nyúlban az IgGa is kötődik a target-sejtekhez, de az IgE-nél kevésbé stabilan.

Szenzibilizálhatunk *passive* is heterocytotrop Ig-okkal. Így *Todorov* és *mtsai* (1968) szerint a human IgG, *White* és *mtsai* (1963) szerint a tengerimalac  $\gamma_2$ -globulinja az egér nyelvének hízósejtjeihez kötődik. A szárnyasok IgG-je és IgM-je *Allan* és *mtsai* (1966) kísérleteiben szenzibilizálta az Ehrlich-ascites tumorsejteket és a HeLa sejteket. A nyúl IgG is heterocytotrop tengerimalacok peritonealis makrophangjain *Csaba* és *mtsai* (1973), továbbá *Kávai* és *mtsai* (1970), valamint *Kesztyűs* és *mtsai* (1972) szerint. Mint látható, a különböző gerincesek homo- és heterocytotrop Ig-jainak affinitása rendkívül variabilis.

A homo- és heterocytotrop Ig-ok Fc részekkel kötődnek a target-sejtek receptoraihoz. A hőmérséklet csökkentése, savanyítása pH 4 alá a kötődést csökkenti *Ishizaka* és *mtsai* (1974) szerint. A savanyítás nem károsítja a recep-

torok szerkezetét, növekvő pH mellett a disszociált IgE újra fixálódik a receptorokon. Ez nem covalens kötődésre utal. Egy human basophilen az Fc receptorok számát *Ishizaka* és *mtsai* (1973) 30 000—90 000-re teszik, így sejtenként 10 000—40 000 IgE molekula fixálódhat. A homo- és heterocytotrop Ig-ok biológiailag teljesen inaktív Fc fragmentumai is kötődnek a target-sejtek Fc receptoraihoz, így *Csaba* és *mtsai*-nak (1971a, 1973) vizsgálatai szerint hatásos antianaphylacticumok, melyek megfelelő mennyiségben competitive meggátolhatják a target-sejteken a reagin fixálódását, azaz a sensibilizálódást. A therapiás alkalmazást egyelőre nehezítik az Fc fragmentum tárolásának problémái, a mennyiségi arányok, mert *Csaba* és *mtsai* (1976), valamint *Schirrmacher* és *mtsai* (1975) kimutatták, hogy az Ig-ok Fc része nemcsak a hízósejtekhez és a basophilekhez kötődik, hanem a lymphocytákhoz, a polymorphonuclearis leukocytákhoz és a makrophagokhoz is.

A sensibilizálódás önmagában nem jár látható tünetekkel, feltűnő kóros jelenségekkel. Ha azonban a target-sejtekhez fixálódott cytophil ellenanyag találkozik homolog antigenjével, az antigen-antitest reactio *mediatorokat* szabadít fel. Maga a liberálódás folyamata igen sokrétű komplex folyamat, melyben a sejtmembrán reguláló enzimjei mellett ion-effectusok, a cyclicus AMP és GMP egyensúlya stb. is részt vesznek. A mediator felszabadulás morfológiájában *Krüger* és *mtsa* (1974) elektronmikroszkópia segítségével is kimutatta a sejtmembrán károsodását és az intracellularis granulomok kiürülését.

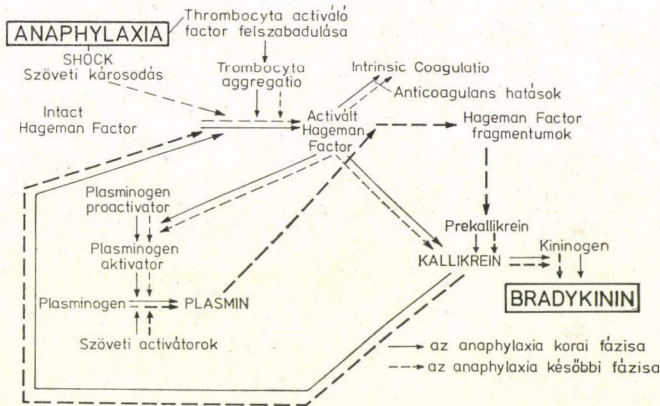
A részleteket mellőzve a VIII. táblázat mutatja, mennyire eltérőek az anaphylaxiában felszabaduló mediatorok állatfajonként. A táblázatban a vas-

#### VIII. Táblázat

	<b>Shockmediatorok különböző speciekben</b>
<i>Histamin:</i>	tengerimalac, ember, majom, kutya, macska, nyúl, egér, patkány
<i>Slow reacting substances in anaphylaxis (SRS-A):</i>	ember, majom, tengerimalac, egér, patkány
<i>5-Hydroxytryptamin (5-HT):</i>	kutya, nyúl, ember, tengerimalac, patkány
<i>Bradykinin:</i>	patkány, egér, kutya, béka, nyúl, tengerimalac, majom, egér
<i>Prostaglandinok:</i>	ember, tengerimalac, béka
<i>Acetylcholin:</i>	tengerimalac, ember
<i>Eosinophil leukocyte chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A):</i>	ember, tengerimalac
<i>Platelet aggregation factor (PAF):</i>	nyúl, ember, majom
<i>Nagymolekulasúlyú shockmediatorok:</i>	lysosomalis enzyme, PMN kationos fehérjék, hyaluronsav, heparin, anaphylatoxinok (C'3a és C'5b), chemotaktikus és permeabilitási faktorok ( $\beta$ - és $\gamma$ -globulinok, Menkin-féle tényezők)

(fett szedés) = domináló mediator az adott fajokban

tagabb szedés emeli ki, hogy egy adott mediator melyik speciesben tekinthető dominánsnak. Intézeti vizsgálataink (Csaba és mtsai 1963, 1968, 1971b, 1972a,b,c, 1974; Szilágyi és mtsai 1973) alapján úgy véljük, hogy a speciesek nagyon eltérő anaphylaxiás syntomatológiájában ugyanolyan mértékben tükröződnek a domináns mediátorok, mint a már régebben ismert shock-szervek, — szövetek különbözőségei. A faji különbségek mellett ugyancsak saját tapasztalataink alapján hangsúlyoznunk kell, hogy az anaphylaxiás shock egy és ugyanazon a vizsgálati objektumon is folyamat, így a shock kezdetén és végén — a szabályozások következtében eltérő mechanizmusokat észlelhetünk. Ezt mutatja be a 2. ábra a patkányok anaphylaxiás shockjában észlelt véralvadási zavarok elemzésével kapcsolatban.



2. ábra

Intézetünkben Fésűs és mtsai (1974, 1975a,b, 1976) kimutatták, hogy patkányokon a shock kezdetén a thrombocyt aggregatio a XII. factort aktiválja, Hageman factor dependens intrinsic coagulatio indul meg. Később azonban aktiválódik a plasminogen-plasmin és a kallikrein-bradykinin rendszer, a fibrinolysis significansan nő, a neutralis proteasék olyan fibrinogen degradatiós termékeket produkálnak, melyek a bélsatorna súlyos vérzéseit, heamorrhagiáját hozzák létre. Az elmondottak alapján az immunopathológiában rendkívül fontos, hogy a kutató kerülje az elhamarkodott általánosításokat, gondoljon a mediátorok specieskülönbségeire, a pathogen folyamat időtől függő, regulációkon alapuló változásaira.

Az emberi betegségek közül e csoportba tartoznak az általános anaphylaxiás shockok ismételt fajidegen savóbefecskendezésekre, egyes antibiotikumokra (pl. penicillinre), az urticariák, a szénaláz, az asthma és egyes tápszer-allergiák.

A humoralis immunválasz által okozott másik mechanizmusban, a *cytotoxikus reactióban*, az immunogen vagy hapteneje fixálódik a target-sejtekhez, esetleg maga a sejtalkatrész válik immunogénné, és a képződött Ig-okkal a sejt felületén egyesül. A kialakult *antigen-antitest complex* egyes esetekben complementet köt meg, ami ismert módon a sejtet elpusztítja. Ebbe a csoportba tartoznak a transfúziós reakciók, az autoimmun haemolysisek, gyógyszerallergiás purpurák stb.

Az antigen-antitest complex azonban complement fixálása nélkül is károsíthatja a sejteket. Különösen az antigen-túlsúlyban képződő, oldható, kisméretű complexek veszélyesek, melyek a szövetrésekben lerakódhatnak, majd a kiserekben vagy azok körül képződött ilyen depozitumok közvetlenül károsíthatják a sejteket. Érdekes, hogy állatkísérletekben az *in vitro* képzett és *i.v.* beadott complexek kevésbé hatásosak, mint az *in vivo* képződött complexek. Ebben a különbségben a complexek összetétele, nagysága, a különböző típusok eloszlása szerepelhet. Az eredmények reprodukálhatósága érdekében a korszerű kutatások megkövetelik a kísérletekben alkalmazott *in vitro* antigen-antitest complexek minél pontosabb jellemzését. A membrán-károsodást és a sejtpusztulást proteasék, phospholipasék képződése és aktiválása okozhatja, a kétségtelen bizonyítást nehezíti, hogy a mikropraecipitatumok a sejtmag és a cytoplasma egyéb alkotórészeinek károsodása nélkül is sérthetik a lysosomák membránját, és olyan degradáló lysosomal enzimeket szabadíthatnak fel, melyek nemcsak acut, hanem krónikusabb sejtpusztulásokra is vezetnek, és hatásaikban egymástól nem könnyen különíthetők el. Ilyen mechanizmus szerepel az ún. *Arthus típusú reakciók* csoportjához sorolt arthritisekben, glomerulonephritisekben, rheumás lázban, periarteriitisekben stb.

### III.

Az Arthus-jelenség azonban complex, a folyamatban a T sejteken alapuló *cellularis immunválasz* is szerepel, mely kései típusú allergiát okoz. Mai ismereteink szerint a *cellularis immunválasz* indukálását elősegíti, ha az immunogen nem oldott fehérje, ill. haptene, hanem a sejthez fixálódott vagy a sejt *in vivo* módosult alkotórésze, és a *competens* immunsejtekkel: a T lymphocytákkal a nyirokrendszeren kívül vagy a nyirokesomók ún. *paracorticalis* areájában kerül *contactus*ba. Genetikus thymushiány vagy neonatalis thymectomia után *cellularis immunválasz* nincs. Az ilyen túlérzékenységet a savóval nem lehet *passive* egészséges állatra transferálni, hanem csak az aktíve immunizált szervezet lymphocytáival.

*Cellularis immunválasz* indukálása után a human lymphocytákból olyan anyag extrahálható, mely az egészséges egyénben kései típusú túlérzékenységet idéz elő. Ez az ún. *transfer factor*, melynek molekulásúlya 10 000-nél kisebb, dialyzálható, trypsin, ribo- és desoxyribonuclease resistens, fajspecifikus.



Therapiás alkalmazásával kapcsolatban az első megfigyelések már megvannak, de pontos értékeléséhez még további kísérletek szükségesek.

A cellularis immunválaszon alapuló kórfolyamatokra jellemző a helyi sejt-infiltratio, néhány sensibilizált immunocyta és az antigen találkozási helyén nagyszámú mononuclearis sejt halmozódik fel, melyek a csontvelő haematogen monocyta készletéből származnak. A thymuseredetű fajlagos immunocyták és a szöveti sejtekhez fixálódott antigen reakciója ugyanis olyan mediatorokat szabadít fel, melyek *in vitro* és *in vivo* a kezeletlen macrophagok tulajdonságait jellegzetesen megváltoztatják. E tényező (vagy tényezők) gátolják a normális makrophagok migrációját (*migration inhibitory factor* = *MIF*), nem Ig, hanem  $\alpha$ -globulin motilitású, molekulasúlyát 65 000-re becsülik. Egészséges állat bőrén gyulladást vált ki, a vele inkubált sejtek szaporodását a homolog antigen gátolja, ill. complement jelenlétében feloldja (*cytotoxicitás* és *cytolysis*); a makrophagok chemotaktikus aggregálódását idézi elő; a vele inkubált normális lymphocyták fajlagos antigen hozzáadására blastosan transformálódnak stb.

Végeredményben a legutóbbi időkben felismert cellularis immunválaszon alapuló pathomechanismus lényege az, hogy a thymus dependens, immunológiaiailag competens és fajlagos aktivitású lymphocyták a homolog szöveti sejtekhez kötődött antigennel vagy haptennel egyesülve olyan oldható tényezőt vagy tényezőket szabadítanak fel, melyek a makrophagok különböző tulajdonságait befolyásolják. A kisszámú fajlagos lymphocyta és az antigen contactusa tehát mediátorokat szabadít fel, melyek révén sok mononuclearis sejt aktiválódik. Ehhez azonban időre van szükség, emiatt lesz a túlérzékenység kései típusú: a bőrpróba 48–72 óra alatt éri el maximumát. Ugyanakkor a T lymphocyták a sejtes infiltratio mellett *cytotoxikusak* a fajlagos antigent tartalmazó sejtekre; complement részvétele nélkül ezeket a target-sejteket elpusztítják, maguk életben maradnak, így egyetlen aggressív lymphocyta több target-sejtet ölhet meg. Az aggressív lymphocyták cytotoxicitásának mechanizmusát most kezdték meg elemezni. Cellularis immunválaszon alapuló pathomechanismus szerepel a contact dermatitisekben, a tuberculin-trychophytin típusú túlérzékenységekben, thyreoditisekben, parazitás infestációkban és a heterozygota homotransplantatumok lelöködésében.

A kutatónak és a klinikusnak végül tudnia kell, hogy ez a rövidre fogott theoretikus immunopathologia sematikus és dogmatikus. Igen szigorú kísérleti feltételek mellett lehet a fenti pathomechanizmusokat önállóan, tiszta alakban, komplikációmentesen tanulmányozni. Különösen emberi betegségekben a fajlagos immunválasz bonyolultan, keverten, cellularis és humoralis típusban egymás mellett fordulhat elő. Keverednek az immunválasz következményei is, de a fenti elméleti megfontolások alapján a domináló pathomechanizmust általában meg lehet és meg is kell állapítani; az adott beteg ágya mellett ez az alapvető feltétel az eredményes, racionális therapiához.

## IRODALOM

- Allan, D. és Mackinson, M.: *Nature* **211**, 493, (1966).
- Csaba, B., Jusupova, S. és Kassay, L.: *Acta Physiol. Hung.* **42**, 41, (1972. a.)
- Csaba, B., Jusupova, S. és Kesztyűs, L.: *Acta Physiol. Hung.* **39**, 21, (1971. a.)
- Csaba, B., Kávai, M., Jusupova, S. és Kesztyűs, L.: *Kísérletes Orvostudomány* **25**, 33, (1973). *Int. Arch. Allergy* **50**, 206, (1976).
- Csaba, B. és Muszbek, L.: *Acta Allergologica (Kbh)* **27**, 55, (1972. b.)
- Csaba, B. és Nilzén, A.: Chemical mediators of immediate hypersensitivity. The role of mast cells in the antigen-antibody reaction. (Ed.: Rajka, E. és Korossy, S.: *Immunological aspects of allergy and allergic diseases.*) Akadémiai Kiadó; Budapest I. pp. 385—413. (1974).
- Csaba, B., Szilágyi, T., Damjanovich, S. és Kövér, A.: *Acta Physiol. Hung.* **23**, 363, (1963).
- Csaba, B. és Went, M.: *Acta Physiol. Hung.* **39**, 369, (1971. b.)
- Int. Arch. Allergy* **43**, 29, (1972. c.)
- Csaba, B. és West, G. B.: *Int. Arch. Allergy* **33**, 99, (1968).
- Fésüs, L., és Muszbek, L.: *Haemostasis.* (Megjelenés alatt)
- Fésüs, L., Muszbek, L. és Csaba, B.: *Int. Arch. Allergy* **49**, 540, (1975. a.)
- Fésüs, L. és Ölveti, É.: *Experientia* **31**, 256, (1975. b.)
- Fésüs, L., Ölveti, É., Csaba, B. és Muszbek, L.: *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica (Stuttg.)* **32**, 341, (1974).
- Gergely, J. és Ott, H. H.: *Az elméleti és klinikai immunológia alapjai.* Medicina, Budapest. pp. 69. (1974).
- Humphrey, J. H. és White, R. G.: *Immunology for students of medicine.* 3. kiadás. Blackwell; Oxford, Edinburgh. pp. 33. (1970).
- Ishizaka, T. és Ishizaka, K.: *Immunol.* **112**, 1078, (1974).
- Ishizaka, T., Soto, C. S. és Ishizaka, K.: *J. Immunol.* **111**, 500, (1973).
- Kávai, M., Csaba, B. és Kesztyűs, L.: *Kísérletes Orvostudomány* **22**, 314, (1970).
- Kesztyűs, L.: *Kórélettan.* Medicina, Budapest. pp. 145—153. (1975).
- Kesztyűs, L., Kávai, M. és Csaba, B.: *Annales Immun. Hung.* **16**, 229, (1972).
- Krüger, P. G., Bloom, G. D.: *Int. Arch. Allergy* **46**, 740, (1974).
- Landsteiner, K.: *Naturwiss.* **18**, 653, (1930).
- Martin, E. W.: *Pharmazeut. Z.* **112**, 411, (1967).
- Rajka, E. és Kesztyűs, L.: Immediate-type and delayed-type allergy. (Ed.: Rajka, E. és Korossy, S.: *Immunological aspects of allergy and allergic diseases.*) Akadémiai Kiadó, Budapest. I. pp. 95—106. (1974).
- Schirmmacher, V., Halloran, P. és David, C. S.: *J. Exp. Med.* **141**, 1201, (1975).
- Stanworth, D. R.: *Immediate hypersensitivity.* North-Holland Publ. Co.; Amsterdam, London. (1973).
- Szilágyi, T., Imre, S., Went, M. és Laczkó, J.: *Z. Immunforsch.* **145**, 201, (1973).
- Todorov, D. M., Wilkinson, P. C. és White, R. G.: *Immunology* **15**, 51, (1968).
- Waksman, B. H.: *J. Immunol.* **107**, 617, (1971).
- White, R. G., Jenkins, G. C. és Wilkinson, P. C.: *Int. Arch. Allergy* **22**, 156, (1963).

## AZ IMMUNOLÓGIAI KUTATÁSOK MÓDSZERTANA ÉS AZ IMMUNOLÓGIA MINT KUTATÓ MÓDSZER\*

PETRÁNYI GYULA, az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1976. VI. 7.

Az immunológiai kutatások klinikai (*in vivo*) megfigyelésekkel indultak. A Pirquet-féle bőrpróba volt az első általánosan elterjedt immunológiai vizsgálat (mely a pontosabb változatában mint Mantoux-próba máig is standard módszer) és őse az allergia (hyperszenzitivitás) ma is használt kimutatásának. Az *in vitro* módszerek is ugyancsak a századunk elején vátak ismertekké az antitestek kimutatására (az antigen praecipitációja és agglutinációja), első sorban a fertőző betegségek elleni immunitás vizsgálatára a betegek, ill. védőoltásban részesültek séréumából. Ezzel kialakult tudományként a serologia, mely azonban a nevével szemben nem a serum összetételét elemző tudomány, hanem kizárólag az antitestek vizsgálatáé. Kiegészítette a serologiai módszereket a complement fölismerése és mérésének lehetősége haemolysin rendszerben, prototípusként a ma már kissé megtépett hírnevű, de a syphilis virágzása idején óriási jelentőségű Wassermann-reakcióval. Itt már két specifikus immunreakció kombinációja szerepel.

Ebből a nagyon rövid történeti felsorolásból is világos, hogy amikor az immunológia tudományá vált, már fölismerték, hogy minden más szerv-, szövet-funkció kutatásával szemben, a specificitás miatt az immun-funkció szinte kizárólag önmagával, önmaga módszereivel kutatható. Az antigén csak az immunreakcióval ismerhető fel antigénként, és a specifikus immunkészültséget csakis az antigenjével vizsgálhatjuk. Az is ismert már a századunk eleje, tehát a serologia kifejlődése óta, hogy a serologiai kimutatás érzékenysége az organikus kémiai analysis módszereit sokszorosán felülmúlja és így antigen tulajdonságú anyagok *in vitro* quantitative mérhetők semmilyen más módszerrel nem lehetséges minimális mennyiségben. Adva volt tehát az immunológiai methodikák két iránya:

1. Az első az immunológiának, a szervezeti specifikus immunreactivitás nagyon bonyolult rejtelseinek a kutatása az immunológiának a szervezettől eltanult saját módszereivel; ez orvosi szempontból 3 részre osztható: *a*) immunodiagnosztika, *b*) immunotherápia és *c*) az immunopreventio kutatására.

\* Előadás. Elhangzott a Magyar Tudományos Akadémia 1976. május 4-i ülésén

2. A második irány a rendkívül specifikusan reagáló antitestek révén az organikus immunokémiai analtika, az immunoassay, melyet rendkívül egyszerű super-mikromódszerként alkalmazunk antigen, ill. antigénné tehető anyagok kvantitatív in vitro meghatározására, elsősorban az orvosi és biológiai laboratóriumokban.

Az immunológia fejlődése meggyorsult a századunk közepe, de főleg a 60-as évek óta és mind a kétféle módszertan ma már mindennapos rutin a medicinában, és nélkülözhetetlen a biológiai kutatás minden ágában.

Az előadás célja — egy ilyen interdiszciplináris fórumon, hogy rámutasson az immunológia és vizsgálómódszerei általános biológiai jelentőségére.

Az előadási idő szűk kerete miatt részletekbe nem mehetek, hiszen a választott téma több kötetes monographia anyaga. Csak vázlatosan tudom az immunológiai kutatás módszertanát, valamint az immunoassayk óriási kiterjedtségét bemutatni, teljességre törekvés nélkül.

## I.

### *A. Immunodiagnosztika. Az ember egyedi immun-funkcióinak vizsgálata, immun-funkciós próbák*

A módszereket csoportosíthatjuk:

1. *az orvosi vizsgálat sorrendjében*: először felsoroljuk a szinte kötelező „rutin” vizsgálatokat, azután a megfelelő indoklással indikálhatókat; meghatározzuk tehát, hogy az immunfunkcióból mit akarunk vizsgálni és ehhez megnevezzük az immunológiai módszereket;

2. *a laboratóriumi lehetőségek szerint*; felsoroljuk a módszertípusokat és változataikat, megemlítve, hogy mit lehet velük vizsgálni.

Az első megfelelőbb az orvos részére, aki valamilyen célú vizsgálatot, kimutatást indikál, utóbbi megfelelőbb a laboratóriumi technikusnak, aki aránylag kis számú egyszerű módszertani repertoárral is sok mindenre képes.

A vizsgálható részleteket az I.-a-b-c-d táblázatok sorolják fel.

Az immunitás szerzett tulajdonság. Az indukciót (primertípusú immunválaszt), a produkciót, készültséget és a reindukciót (secunder típusú immunválaszt) külön-külön akkor érdemes vizsgálni, ha az immun-systéma teljesítőképességét, ill. az erre gyakorolt hatásokat vizsgáljuk (pl. immunostimulatiót, ill. immunosuppressziót). Külön-külön kell vizsgálnunk az immun-válasz két fő típusát, az antitest-képzést és a sejtközvetítette reakciót, valamint a kettő cooperatioját.

Az antitestekre vonatkozóan tudjuk, hogy a primer válasz főleg IgM osztályú antitesteket produkál, később pedig főleg IgG osztályúak termelődnek. Érdemes tehát megvizsgálni, hogy a protektív antitest titer, ill. titeremel-

I. Táblázat

AZ IMMUNITÁS RÉSZFUNKCIÓI

A. Az immun-válasz típusai szerint

1. Humoralis { immuno globulinok: IgG, IgA, IgM, IgE  
spec. antitestek : "természetes" ag-k ellen  
"mesterséges" ag-k ellen  
B-sejtek plasma sejtek }  
T-sejtek }
2. Celluláris
3. Cooperativ ————— anticooperativ  
T → B helper, suppressor (blokkolás)  
LDA - ADCC

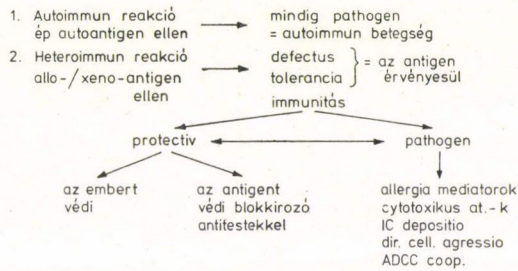
B. Az antigen-inger időpontja szerint

1. Első antigen inger = az immun válasz indukciója  
induktív fázis, primaer immun-válasz
2. Második ill. későbbi antigen-inger = reindukció, secundaer immun-válasz
3. Fennálló immun készütség újabb antigen-inger nélkül

C. Az IR következményeinek a vizsgálata

1. Az IR hiánya congenitalis? szerzett? { totális = életképtelenség  
partialis = agammaglobulinaemia  
dysgammaglobulinaemia  
cellularis (T-sejt) hiánya
2. Specifikus immun-tolerancia { high dose  
low dose
3. Protectiv immunitas: "tünetmentes" IR (antitoxin stb.)
4. Pathogen IR : a.- allergia mediátorokkal (I.) (Histamin stb.)  
cytotoxicus antitestekkel (II.)  
pathogen immunkomplexekkel (III.)  
b.- cytotoxicus lymphocytákkal (IV.)  
k-sejtek  
c.- cooperativ funkcióval

D. Az antigen származása szerint



kedés főleg az IgM vagy az IgG frakcióban található-e, ha arra vagyunk kíváncsiak, hogy egy bizonyos antitest titer mikori infekcióra utal, hogy egy relatíve tünetmentes infekció (pl. rubeola) — akkor frissen érte-e a terhes nőt (ennek foetalis veszélyeivel), vagy csak a már régen fennálló immun-készütség fokozódott egy kivédett veszélytelen reinfekció által.

Külön kell vizsgálnunk, hogy az immun-válasz, ill. készütség bizonyos antigenekkel szemben milyen következményű. Az IR következményeinek a

vizsgálatát (I.c. tábl.) akkor végezzük, ha arra vagyunk kíváncsiak, hogy milyen következményekkel fog járni az, ha nem óvatos kipuhatóldzással kapja a szervezet az antigent, hanem spontán, az élet viszonyaitól esetleg nagy adagban: érvényesülhet-e az antigén egy esetleges immundefectus miatt vagy pathogen reactio (allergiás betegség) várható-e, vagy teljesen tünetmentes észrevétlen kivédés, vagy pedig antigen hordozás, pl. vírus-persistentia a maga epidemiológiai veszélyével.

Az antigén származásának a kutatásával diagnosztizálhatjuk a különbséget, amely az auto- és heteroimmun kórkép közt fennáll. A kérdés lényege az, hogy a heteroantigen (legalábbis elvileg) eliminálható. Ha a saját szövet necrotizál, már nem tekinthető ép sajátnak és az ellene irányuló „eltakarító” immun-reactio nem tévesztendő össze a saját ép egészséges szövetet megtámadó autoimmun reakcióval.

Az immunológia tette lehetővé az autoantigének kutatását. A human antigenek rendszereinek egyre tökéletesedő felismerése ad módot a reakciómentes allogen transzfúziókra és az egyre sikeresebb szervtranszplantációkra. A major hisztokompatibilitási rendszer felderítése azért is jelentős, mert génjei valószínűleg kapcsolatban vannak az IR gen(ek)el, amely kutatás további reményeket kelt a transzplantológiában.

Ha egy vizsgált antigen ellen egy ember serumában antitestet találunk és egyben az antigen hatásaival szemben az illető immunis, ebből még nem következik, hogy az immunitás e keringő specifikus antitest következménye, mert az antitest csak azt bizonyítja, hogy az antigen-stimuláció megtörtént, de azt már külön kell bizonyítanunk, hogy az immunitás (készültség, ill. reakciós következmény) az antitest, ill. spec. cellularis reakció vagy cooperativ funkció (LDA, ADCC) következménye.

Ha ismert antigen ellen van spec. antitestünk, akkor az *antitest* letisztítva (és esetleg még fluoresceinnel, radioaktivitással stb. nyomjelezve) *reagenssé válik*, mellyel az immunológia visszahatólag tovább kutatható. Így kereshetjük magukat az antitesteket, az egyes Ig osztályokat és alosztályokat is a vérben, nyirokban, nyirokszövetekben, csontvelőben stb. Kereshetjük a spec. antitesteket az őket termelő sejtjeik felületén, valamint az antigent hordozó struktúrákban, basalmembránokban in situ, post mortem vagy biopsiás anyagban. Persze lehetséges, hogy az antitest (AT) esetleg nem immunospecifikusan kötődött, hanem mint immun-complex (IC) deponálódott és akkor megint az IC antigenjét (AG) kell keresnünk, vagy egyszerűen az AG—AT formáció bizonyítására a complement jelenlétét is, megint csak nyomjelzett specifikus complement-faktorok elleni antitestek segítségével. Ha egy szövetben, sejtfelületen in situ IC-t találunk, abból tovább kell következtetnünk és újabb immunológiai diagnosztikai módszerek végzését indikálnunk: így a már említett IC-képző antigen megkeresésén kívül az IC jelenlétét a keringésben is, prognosticai célra és végül annak az okát, hogy miért képződhetett, ill.

képződik tartósan IC, azaz az IR miatt nem semmisíti meg az AG-t, mi az oka az AG persistenciának.

Ha — és ez többnyire valószínű — komplex antigenek ellen a serumban egyszerre többféle antitest is képződik, akkor az immunohistologia, mint módszer a legegyszerűbb a többféle antitest kimutatására, mert a fluorescens kötődési mintából (pl. sejtmagban suspenzió) az antinuclearis antitestek többféleségét egyszerre ránézéssel valószínűsíthetjük.

Az immun-funkció vizsgálatára szolgáló módszereknek hierarchiájuk van, az átlagos általános vizsgálatban rutinszerűen szereplőktől a különlegesen indikáltakig (II. tábl.).

## II. Táblázat

### AZ IMMUNFUNCTIOS PRÓBÁK SORRENDJE AZ ORVOSI DIAGNOSZTIKÁBAN

1. Rutin módszerek
  - Anamnesis !!!
  - Fizikális vizsgálat { nyirokcsomók, lép, máj  
bőr és nyálkahártyák
  - Vérkép { rel. %  
abs.-sejtszámok
  - Serum fehérjék, papír elfo: gammaglobulin { rel. %  
conc. g %
2. Indikált immunológiai vizsgálatok
  - in vitro: serológiai  
cytomorphológiai  
supravitalis functios vizsgálatok
  - in vivo: provokációs, expozíciós próbák

A gyakorló orvos számára szolgáló diagnosztikai alapszabály az immunológiai diagnosztikára is érvényes: *a jó anamnesis* fél diagnosis, sőt néha teljes diagnosis, amely további vizsgálatokkal már csak megerősítésre vár. Fontos ez immun-defectusok, spec. allergiák (heteroimmun kórképek) és autoimmun kórképek kiderítésében, immunogenetikai adatok keresésében. A rutinvizsgálatok közül immunológiai diagnosztikai jelentőségű a *nyirokcsomók* aplasiájának vagy hyperplasiájának (nyirokcsomók, lép, tonsillák) a keresése, nyálkahártyák, bőr, hajzat alapos megtekintése, megtapintása az érzékszervi („fizikális”) vizsgálat során. A „blikk”-diagnosisnak az immunopathológiai diagnosztikában is nagyon-nagyon nagy a jelentősége.

*A laboratóriumi rutin vizsgálatok közül* a vérképet „haematológiai” vizsgálatként szokás végezni, pedig alapvetően fontos immunológiai adat, csak a rel. %-számok mellett az abs. sejtszámot is érdemes kiszámítani és értékelni, és a lymphocytá alakokra is érdemes figyelmet fordítani. A gyorsult vs. sülyedés mögött is a serum fehérjék, elsősorban az Ig frakciók megváltozására kell gondolnunk. Tudnunk kell, hogy a serumfehérje, ill. ezen belül a papírelfóval kapott gammaglobulin mennyiségét hogyan értékeljük. Az Ig-k

meghatározása automatizálható és valószínűleg rutin, sőt szűrővizsgálattá fog válni az óvodás-iskolás kor elején.

Rutin vizsgálat az *autoantigén* meghatározások közül az ABO-Rh vércsoport meghatározása (annyira, hogy ujjlenyomattal együtt a személyi igazolványban is helyet kellene kapnia). Nyilvánvaló, hogy az immunológiai vizsgálatok egy része tartós fölvilágosítást ad, tehát az ismételtetése az élet folyamán fölösleges, vagy csak különleges indikáció alapján válhat szükségessé.

A rutin vizeletvizsgálatból immunológiai jelentőségű a pozitív fehérje próba (immunopathogenezisű nephritisek, Bence—Jones-fehérje).

A *fertőző betegségek* diagnosztikájában jól ismert a spec. antitestek kimutatásának az értéke (precipitációs, agglutinációs és complement-kötési próbák, direkte vagy neutralisatioval, ill. gátlással). Ha feltételezett fertőzés (diphtheria, tetanus) adott esetében kellemetlen lehetne a beteg újraoltása vagy passív immunizálása, a nagy antitoxin titer ismerete ettől megkímélheti a beteget. Az állati serumok nagy veszélyeit ismerjük. Sokkal jobb módszer lenne a passív immunizálás human antitestekkel, pl. nagytiterű human antitetanus antitest — (Ig) — concentratummal és a human immunotherapiás módszerek közül ma már törölni kellene a heterolog (állati, általában ló stb.) serumok alkalmazását.

A nyomjelzett antitesteket baktériumok kimutatására is jól lehet használni, antigen-differenciák, ill. azonosságok keresésére is. A vírus-betegségek diagnózisához az orvos gyakran kéri a nehezebb vírus-kimutatás mellett, ill. helyett a betegének aktuális betegsége szempontjából néha értékesebb anti-vírus-antitest keresését. Így pl. értékes lehet az infectios mononucleosis differencialdiagnosztikájában az EB vagy cytomegalia vírusok elleni antitest titer növekedésének (és az IgM és IgG osztályok közti megoszlásának) a kimutatása.

Az *in vivo* bőrpróbák közül a fertőző betegségekben ma már fölöslegessé vált a Dick-, Schick-, viszont a tuberculin próba (Mantoux) átmeneti visszaesés után továbbra is jelentős, mert a tbc-n kívül hasznos az egyéb betegségekben szenvedők (Hodgkin-kór, lymphomák,<sup>1</sup> egyéb tumorok, autoimmun betegségek) cellularis (késői típusú) immunreaktivitás-ingadozásának a mérésére, amennyiben előzőleg pozitív volt. Hasonló célra más infekciós késői hyperszenzitivitási bőrpróba is fölhasználható (mumps, trychophyton, DNCB stb.). Az antiinfekciós immunitás módszereinek tárgyalásakor is hangsúlyozni kell, hogy a spec. antitest csak a toxinok ellen ad teljes védelmet, tehát egyéb bakteriális és virális kórképekben csak jelzője, hogy a betegnek a védelmet adó cellularis immunitása is meglehet.

A bőrpróbák természetesen kellemetlenek a betegnek, ezért amennyire csak lehet, igyekszünk kerülni őket. Már etikai okokból sem alkalmazzuk egészséges emberek bevonását, így a Prausnitz—Küstner- vagy a „third man” teszteket. *Allergiás betegségekben* azonban mégis néha nem nélkülözhető a beteg



*expositio próbája* az egyénileg pathogen heteroantigen (allergen) megkeresésére, mert ezek pathogen spec. antitestjei *in vitro* még ma sem mutathatók ki (azért nevezték el ezeket az antitesteket reaginoknak). Ma ugyan már tudjuk, hogy ezek főleg az IgE-osztályban találhatóak, de az IgE koncentráció kicsi és mennyiségének fokozottsága csak utal arra, hogy több a „reagin”, de nem határozza meg a spec. antitestet és ezzel az allergent. További baj, hogy egyrészt nem minden allergia ad bőrreakciót (az egyéb *expositio* pedig annyira kellemetlen, sőt veszélyes, hogy elhagyásuk indokolt), másrészt a lehetséges allergenek száma nagyon nagy és így egyszerűbb egyrészt az anamnesisre, másrészt az eliminációs módszerre támaszkodni. A specifikus reagin-antitestekre kidolgozott legújabb radioimmunosorben teszt (RAST) értéke, haszna még bizonyításra szorul.

A legnagyobb jelentőségűvé az utóbbi időben az *autoimmun betegségek* diagnosztizálására alkalmas módszerek váltak, egyrészt az autoantitestek, másrészt a cellularis autoaggresszivitás kimutatásának a módszerei. Ezekkel a módszerekkel nemcsak a diagnosztikai, hanem egész orvosi, sőt általános biológiai gondolkodásunkban egy új világ nyílt meg. Csak a legfontosabb vizsgálatok neveit tudom felsorolni: az LE-sejt jelenség, antinuclearis, anti-DNS, anti-RNS, antihiston, antisubcellularis (antimitochondrialis, antimikrosomalis) antitestek, BM (pl. glomerularis basalmembran, GBM) elleni antitest, szervellenes antitestek (pajzsmirigy, gyomor-nyálkahártya, mellékvese, agyszövet stb.), vvs, fvs, thrombocytá elleni antitestek (anti-ABO, -Rh, -HL-A), az antiprotein, lipoprotein, antiglobulin, antienzym, anticoagulációs factor, antiintrinsic-factor stb. stb., antitestek. Végeredményben még nem is tudjuk, hány különböző antigen-struktúrából kombinálódik össze az egyén teljes hatalmas egyedi unicum antigén-mozaik képe, de azt már tudjuk, hogy elvileg antitest mindegyik ellen képződhet. Nagy jelentőségű diagnosztikailag az IC-ek kimutatása *in situ* a beteg szervekben, de prognosztikailag a vérből is.

A diagnosztikai módszerek összességükben a cél-igényt illetően tehát 4 csoportba oszthatók: 1. normális-e, átlagos-e az immunfunkciója az egyénnek (ált. immunfunkciós próbák), 2. nincs-e valamilyen immundefektus, 3. milyen antigenek (toxinok stb.) ellen van készülsége, 4. nincs-e pathogen reaktivitása egyes hetero-, ill. autoantigenekkel szemben.

### B. Az immunotherápia és immunopreventio módszerei

1. Általánosságban immun-defectus, immunoinsufficiencia esetén a defectust kellene pótolni és az immunfunkciót stimulálni. Gyakran fölmerül az orvosi gyakorlatban egy nem-spec. ált. immunostimulációs módszer szükségessége is (kísérletek folynak Levamisol, CBP, BCG alkalmazásával). Ugyanígy experimentalis stádiumban van az immun-systema hiányában a T-sejtek pótlása implantációval a csecsemőkorban, immun-funkció kifejlesztés thymus

hormonnal, egyes részfunkciókra serkentés transferfactorral (TF). A B-sejt-funkció stimulálása ugyancsak kísérleti állapotban van, bár utólag gamma-globulin (Ig), ill. spec. human antitest transferrel sokkal könnyebben pótolható, mint az alapvetőbb T-sejt-funkció és cooperatio hiány.

2. Az allergia, ill. autoimmun reaktivitás lényegében funkciós kisiklás, tehát *immunokorrektív* terápiára szorulna, de ilyen módszerekkel nem rendelkezünk. Ezért empirikusan a mediator- és gyulladásgátláson kívül, akárcsak transzplantált allograft szerv védelmére az *immunosuppressio* módszereit alkalmazzuk (corticosteroidok nagy dosisa, lymphocytocid, ill. -statikus gyógyszerek, ALS, ill. ATG).

3. Az immunoterapia és preventio problémáinak egyik nagyon fontos kutatási iránya a tumor-immunológia.

### C. Immunológiai laboratóriumi módszerek

Az igény tehát óriási, a kérdés az, hogy lehet a mai munkaerőhiányos szűk laboratóriumi keretek közt kielégíteni. A módszerek egy része (az immunokémia) közel áll a rutin laborok analytikai fölkészültségéhez, a másik része inkább cytologiai-biológiai és nagyobb, külön fölkészültséget kíván elméletileg is és fölszerelésben is.

A módszereknek vannak egészen egyszerű változatai, amelyek (bár elsősorban szűrővizsgálatokra valók, mégis) kis laboratóriumok részére is ideálisak. Egyszerűek a kvalitatív precipitációs-agglutinációs-flocculációs lemez-módszerek; ezekhez még kis laboratórium se kell, bárhol elvégezhető. Egyszerű és pontos a praecipitáció quantitatív módszere is (a komplikált cső-hígítás helyett) a Takátsy-készlettel; még egyszerűbb ha pl. a Mancini-féle radial-diffúzióhoz a célnak megfelelő lemezeket készen vásárolhatnak meg a laboratóriumok. Az LE-sejt jelenséghez — bár már munkaigényes, csak egy thermostat és fénymikroszkóp kell a hozzáértésen kívül. Ezzel szemben pl. az ANA mennyiségi becsléséhez és a szervellenes antitestek specifikus in situ kimutatásához kriosztát-metszés és UV mikroszkópia kell, tehát drága alapfölszerelés az ugyancsak drága immun-reagenseken kívül. A legkomplikáltabbak a sejt-tenyésztést (ly-culturát) igénylő módszerek, ezt megelőző lymphocytá separálással, mint pl. B és T sejt-szám meghatározás, a mitogen effectus, ill. blast-transformatio nonspec. és spec. vizsgálata, a MLC, az ADCC, a lymphokin-termelés (pl. MIF) mérése. Ezekre már csak kutató laboratóriumok vállalkoznak. A módszer fölsorolást a III. táblázat adja.

A nagy specificitású rendkívül érzékeny, mikromennyiségű antigenek kimutatására végzett antigen-antitest reakciós, ill. kötési-kompeticiós módszerek természetesen nem immunológiai kutatásra is használhatók, és így alakult ki az antigen, ill. antigen tulajdonságúvá tehető anyagok meghatározására — mint laboratóriumi mérőmódszer — az immunoassay.

### III. Táblázat

Az immunológia vizsgáló módszerei

#### I. Immunológiai módszerek

Antigen keresése az antitesttel  
Antitest keresése az antigennel

##### A. In vitro

###### 1. Immunokémia

*Precipitáció:* { kémcsőben  
közvetlenül { capillarisban  
{ tárgylemezen                      hígítási sorok  
{ Takátsy-lemezen

{ Immunodiffusio,  
Kettősdiffusio  
Radiáldiffusio, quantitativ  
Immunolectrophoresis  
Electroimmunodiffusio  
Ellen-immunoelfo

fentiek radioizotop nyomjelzéssel és autoradiografiával

##### *Agglutináció:*

*activ* { Enterobact. agglutinatio  
(direkt) { ABO-vércsoport stb. agglutinatio

*passiv* { Passiv haemagglutinatio  
{ Absorbens suspensio agglutinatio (latex stb.)

*indirect:* Agglutinatio gátlás

##### *Összetett technikák*

AT-AG kötés complement fölhasználással  
Coombs-technika, anti-Ig-módszerek

###### 2. Immunohistológia

Nyomjelzett antigennel, ill. antitesttel a neki spec. antitest, ill. antigen kimutatása in situ szövetekben, sejteken, sejtekben direkte vagy „szendvics” módszerrel.

###### 3. Immunocytológia

Sejtfelületi receptorok, markerek keresése (B-sejtek stb.). A nyomjelzés történhet fluorescens anyaggal, radioactív izotóppal, enzyimmel (peroxydase).

###### 4. Supravitalis módszerek

Szövet, ill. sejttenyészetek vizsgálata:

Cytotoxicitás,  
ADCC (LDA) kimutatás,  
Lymphokinek keresése (migratio stb.)  
Mitogen-hatás: spec. antigennel és nem-spec. mitogénekkal (PHA stb.)  
Rosetta (immunoaderencia) módszerek  
Antitest-termeltetés in vitro  
T sejt identifikálás (a fentiekkel)

**B. In vivo**1. *Állatkísérlet*

- Passiv cutan anaphylaxia
- Cfu
- Transplantatum rejectio
- G. v. H-reakció
- Antigenitás erősségének vizsgálata
- Immun-reactivitás genetikája, phylo- és ontogenetica

2. *Ember vizsgálatok*

- Antigen-eliminatio = allergiás reakció elmaradás (Továbbiak csak ha az in vitro módszerek után is okvetlenül szükséges):
  - bőrpróba (óvatosság!)
  - egyéb (nagyon kivételesen!!)
- Transferfaktor hatás

*II. Nem-immunológiai módszerek*1. *Cytomorphologia*

- a) *Vér*: fvs-szám, ly-szám
    - ly-alak-megoszlás (M.-G.-Giemsa festéssel, pyroninofilia stb.)
    - generatios fázis vizsgálata (nyomjelzett DNS, ill. RNS fölvétele, impulsus-cytophotometria)
  - b) *Csontvelő*:
    - cytologia (kenet)
    - histologia (beágyazás, metszet)
  - c) *Nyirokesomó* histológia, cytológia
  - d) *Egyéb* (thymus, lép, ált. post mortem)
2. *Fehérje-kémia*: antitest-globulinok analysise:
- könnyű lánc,
  - nehéz lánc
  - V-regiók, Fab, Fc (szerkezet, aminosavsequentia stb.)

## II.

*Immunológia mint módszer**Immunoassay.*

Az immunoassay lényege, hogy a vizsgálandó anyag önmagában erős és specifikus antigen legyen, vagy valamilyen módon azzá legyen tehető, ellene állatban (ló, kecske, nyúl) nagy titerű spec. antitest legyen termeltethető, mely a serumból jól tisztítva és koncentrálva standard reagensként használható. Ehhez megfelelő állattörzs kiválasztása szükséges. Az AG-AT kötés kimutatására azután különböző eljárások használhatók, melyek közül a legegyszerűbb a precipitáció radialis immunodiffúzióval. A módszer érzékenysége több nagyságrenddel fokozható radioaktiv nyomjelzéssel, bár ehhez már megfelelő sugárzást mérő drága és service-igényes műszer kell. Ez azonban azután nagyon sokféle és egyszerre sok meghatározást tud végezni. Persze ehhez még újabb drága beszerzés: automata minta-váltó és eredmény-kiíró gép is kell, ami csak akkor fizetődik ki, ha valóban nagyon nagy a vizsgálatok száma.

Technikailag nehezebb az enzyμες nyomjelzés, de ezután már sokkal egyszerűbb a laboratóriumi módszer: az enzy-mediatoros immunoteszt (EMIT). Ezért újabban ez is terjedőben van.

Minden immunoassaynek van egy közös jellemvonása: az antigen-tulajdonságot és az antitestet kötő hely (haptén) mennyiségét méri, nem pedig az illető anyagra jellemző biológiai aktivitást, vagyis pl. nem a plasma-insulin vagy plasmarenin, vagy digitoxin stb. aktivitást. Ezért időnként meg kell vizsgálnia az előállítónak, hogy az aktivitásával és az antigenítésével meghatározva a bioaktiv anyagot, gyakorlatilag azonos eredményt kapjunk. Az aktivitást mérő biológiai módszerek bonyolultak, többnyire előzetes separálás, concentrálás szükséges, nagyok a hibaforrásaik, nagyok a szórásaik. Az immunoassay methodikailag sokkal, de sokkal egyszerűbb, csak éppen arra kell ügyelni, hogy az antigen-determinans, ill. haptén molekularész mérése jellemezze a bioeffektor rész mennyiségét is. Ha tehát pl. plasma renint mérünk a biológiai módszerrel, az eredményt plasma renin aktivitásban (PRA) kell megadni, de az immunoassayvel, ill. radioimmunoassayvel (RIA) plasmarenin koncentraciót adhatunk csak meg (PRC) és erre a finom, de elvileg lényeges különbségre ügyelni kell.

Módszertanilag az *in vitro* immunoassay, ill. érzékenyebb és pontosabb RIA az ún. saturatio analysisek csoportjába tartozik. Ennek elve a következő: 1. az első fő reagens a spec. antitest, lehetőleg lecentrifugálható hordozó suspensió anyaghoz kötve (szilárd fázis), mert így a praecipitatio quantitativ nehézségei elesnek, 2. ehhez adjuk a biológiai anyagban (serum stb.) levő meghatározandó, tehát ismeretlen mennyiségű oldott antigént, mely empirikusan kisebb mennyiségű, mint amelyet az antitest reagens meg tud kötni, 3. a megmaradt szabad kötési kapacitást „vissza-titráljuk” a másik fő reagenssel: oldott nyomjelzett tiszta spec. antigennel; 4. lecentrifugáljuk a saturált antitest suspensiót, a nyomjelzett antigen-reagens kötött része a precipitátumban, szabadon maradt része a felülúszóban található; 5. a kötött frakció radioaktivitását (beütés-számát) megmérjük, 6. ismert standardokkal készült kalibrációs görbéből visszakeressük a meghatározandó anyag koncentrációját (pl. ng/ml). A reakció „kulcsa” a megfelelő aviditású spec. antitest; tudnunk kell, hogy nem ad-e keresztreakciót a mérendő plasmában, sérumban levő más antigennel is (pl. jelenleg a növekedési hormon elleni antitestek terhes nő vérében a placentalis lactogennel, ami terhes nő vérében a STH meghatározást így közvetlenül a plasmában elő-separálás nélkül lehetetlenné teszi). Fontos a másik reagens: a meghatározandó antigen standardjának a tisztasága, azonos specificitása és kellően kötött nyomjelzettsége. A nyomjelző általában <sup>125</sup>J. A kötés nem időtálló, ezért ezt a reagenst a föltüntetett lejárati határidőn belül lehet csak használni. Mindezek miatt a reagensek egyelőre nehezen kaphatók, a kényesebb meghatározásokhoz elég drágák és a különböző gyártmányok megbízhatósága eltérő.

Az immunoassay (IA) radioimmunoassay (RIA) olyan sokféle biológiai anyag meghatározására áll rendelkezésre (hormonok, gyógyszerek stb.), hogy fölsorolásukba itt nem bocsátkozhatom. A medicinában számos biológiailag activ mikromennyiségű anyag (pl. hormon stb.) meghatározást hovatovább rutinszerűen kellene végezni. Nagy baj azonban, hogy a hazai gyógyszer-serum és reagens ipar elaludt és még a hazai kutatók által kidolgozott eljárások reagensait, reagens összeállításait sem gyártja. A külföldi kiték pedig nekünk alig megfizethetők. Ezen a fórumon is hangsúlyozni kell azt a követelést, hogy a hazai ipar sürgősen pótolja a lemaradást és legalább a tömegvizsgálati igényt elégítse ki. Ha előadásom csak kissé is elősegítené ezt a célt, akkor nem ültünk itt hiába. Javasolom, hogy az itt jelenlevő osztályok az elnökségen át intézzenek egy nyílt követelést az illetékes vállalatok állami főhatóságához, hogy ebből a jól jövedelmező vállalkozásból sürgősen elégítsék ki a hazai igényeket.

### Befejezés

Sajnálom, hogy az elméletileg és gyakorlatilag egyaránt fontos nagy témakörrel, nemcsak az orvostudományt, hanem egész biológiai szemléletünket megváltoztató immunológiai kutatás módszertanáról (az immunológiának elsősorban immunológiai módszerekkel való kutathatóságáról) és az immunológiaispecificitás alapján kifejlesztett immunochemiai módszerekről ennyire vázlatos áttekintésre volt csak idő, hiszen a tudományban minden a módszeren múlik, ez termeli az eredményt és újabb módszereket kell kifejleszttenünk, ha előbbre akarunk jutni a természet megismerésében, a jobb diagnosztikában, gyógyításban és megelőzésben.

### IRODALOM

- Beregí, E.: Immunohistológiai módszerek. Autoimmun betegségek (szerk. Petrányi Gyula) Akadémiai Kiadó, Budapest, 407. o. (1974).
- Bobory J.: Humoralis reakciók, 335. o. és Cellularis immunreactivitas vizsgálata, 387. o. Autoimmun betegségek (szerk. Petrányi Gyula) Akadémiai Kiadó, Budapest, 407. o. (1974).
- Huber, H., Pastner, D., és Gabl, F.: Laboratoriumsdiagnose hämatologischer und immunologischer Erkrankungen, Springer, Berlin, (1972).
- Locsár, L., és Merétey, K.: Radioimmune reactions in vitro. Radioimmunoassay, in: Immunological Aspects of Allergy and Allergic Diseases, ed. E. Rajka and S. Korossy, Akadémiai Kiadó, Budapest, Vol. 2. p. 439. (1974).
- Láng, H., Rick, W. és Róka L.: Anwendung immunologischer Methoden. Springer, Berlin, (1975).
- Nowotny, A.: Basic Exercises in Immunochemistry. A laboratory manual. Springer, Berlin, (1969).
- Petrányi, Gy.: The LE cell phenomenon, in: Immunological Aspects of Allergy and Allergic Diseases, ed. E. Rajka és S. Korossy, Akadémiai Kiadó, Budapest, Vol. 3. p. 27. (1975).
- Petrányi, G. Gy.: Biological Tests of Histocompatibility, in: Immunological Aspects of Allergy and Allergic Diseases (Ed. E. Rajka és S. Korossy) Akadémiai Kiadó, Budapest, Vol. 2. p. 671. (1974).
- Rose N. R. és Bigazzi, P. E. Methods in Immunodiagnosis, John Wiley Sons, New York, (1973).

## DAGANATOS SEJTPOPULÁCIÓ NÖVEKEDÉSÉNEK TANULMÁNYOZÁSA

*II. Magi fehérjék vizsgálata gyorsan és lassan proliferáló M-NK/Ly ascites tumor sejtpopulációiban*

JENEY ANDRÁS, az orvostudományok kandidátusa, DZURILLAY ÉVA,  
KOPPER LÁSZLÓ és LAPIS KÁROLY, az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1976. III. 9.

Előző tanulmányunkban beszámoltunk arról, hogy az NK/Ly ascites tumor növekedése során a sejtek proliferációs aktivitása folyamatosan csökken. A növekedési ütem lelassulása azonban reverzibilis, mivel átoltás után a tumorsejtek újra gyorsan proliferáló szakaszba kerülnek. A sejtprolifерáció csökkenésével párhuzamosan a sejtmag és a sejtmembrán ultrastrukturális sajátosságainak a változásait, valamint a radioaktív prekursorok DNS-be, RNS-be és fehérjékbe történő beépülésének a csökkenését észleltük (Lapis és mtsai 1973, Kopper és mtsai 1974). Jelen munkánkban a génműködést és ezáltal a sejtprolifерációt befolyásoló magi fehérjéket kívántuk tanulmányozni az NK/Ly ascites tumor növekedésének gyorsan és lassan proliferáló populációiban.

Az elmúlt évtizedben végzett vizsgálatok meggyőző adatokkal bizonyították, hogy az eukaryota sejtekben a DNS működését — tehát a gén-információ átadását a replikáció és a transzcripció során — a kromatin fehérjék befolyásolják. A kromatin fehérjék közül először a hisztonoknak tulajdonítottak fontos szerepet a gén regulációban, mivel ezek gátolják a DNS-től függő RNS szintézist (Bonner és Huang 1963). A sejtprolifерáció és a hisztonok közötti kapcsolatra utal az, hogy a DNS és a hisztonok — elsősorban az  $F_1$  frakció — szintézise egyidőben történik a sejt életeciklusának S fázisában. Stevely és Stocken (1968), valamint Gurley és mtsai (1974), arra következtettek, hogy az  $F_1$  hisztonok foszforilációja a sejtprolifерáció megindulásának fontos feltétele. Ez utóbbi megállapítással összhangban Balhorn és mtsai (1972) egyenes összefüggést találtak az  $F_1$  hiszton foszforilációja és a tumorok növekedése között. Hisztonok a DNS replikációjában betöltött szerepére legutóbb Kriegstein és Hogness (1974) mutattak rá, akik arra következtettek, hogy a „replikációs villa” haladásának mértékét a hisztonok határozzák meg. A széles körű vizsgálatok azonban arra is rámutattak, hogy a hisztonok összetételében, DNS-hez kötődésében és represszor hatásában szöveti vagy faji specifikitást nem lehetett kimutatni, így azok nem specifikus gén regulátoroknak tekinthetők (Stein és Baserga 1971). Éppen ezért a jelenlegi kutatások a hisztonok represszor hatásának módosításával foglalkoznak, amely létrejö-

het a hisztonok foszforilációja, metilációja, acetilációja, valamint egyéb fehérjékkel vagy alacsony molekulásúlyú vegyületekkel szembeni kölcsönhatás következtében.

Az utóbbi időben a savanyú természetű magi fehérjék génműködést szabályozó hatásainak a tanulmányozása került az érdeklődés középpontjába. Ezen fehérjékre jellemző, hogy asparaginsavban és glutaminsavban gazdagok és a hisztonoktól eltérően tryptophánt is tartalmaznak.

Ezen kromatin frakció egyes fehérjei azonban oldékonysági tulajdonságaikban, DNS-hez történő kötődésükben és molekulásúlyukban különböznek egymástól. Lebomlási félidejük a hisztonoknál gyorsabb, de a sejt számos többi fehérjéinél lassúbb. Cytoplasmában szintetizálódnak, foszforilálódhatnak és a DNS nagy árkában helyezkednek el. (Stein és Basega 1971, Langan és Smith 1967, Kleinsmith és Allfrey 1969, Farber és mtsai 1971.)

Az irodalomban sokszor váltakozva és zavaróan használt magi savanyú fehérje, kromatin-savanyú fehérje, „non-hiszton” és magi rezidualis fehérje kifejezések egyfelől tükrözik a még nem egységesen kialakult terminológiát, másfelől megjelölik a tárgyalt fehérje előállítási módját. Elfogadhatónak tartható az, hogy „non-hiszton” vagy kromatin savanyú fehérje kifejezést használunk ha azok előállítása a már izolált kromatinból történik. Ezzel szemben az egész mag szakaszos izolálása során, a DNS-hez szorosan társuló, nem hiszton jellegű fehérjét az ún. reziduális frakcióban találjuk. Hill és mtsai (1971) megállapításai után ezen frakciókban levő fehérjék működésük alapján három csoportba oszthatók:

- a) strukturális szerep,
- b) enzim működés (polymeráze, ligáze stb.),
- c) gén reguláció.

Lehetséges azonban, hogy egy ugyanazon fehérje több módon is részt vesz a kromatin szerkezeti és működési egységének fenntartásában.

A gén regulációjában betöltött és sokak szerint specifikus szerepüket az alábbi megfigyelések támasztják alá:

- a) Aktív szövetek és aktív állapotban levő kromatin több magi savanyú fehérjét tartalmaz, mint az inaktívak (Dingman és Sporn 1964, Frenster 1965).
- b) A hisztonok által gátolt DNS-től függő RNS polymerázt újból működésbe hozzák (Wang 1970, Spelsberg és mtsai 1971).
- c) Izolált kromatinban a szöveti specifikus RNS szintézist biztosítják (Paul és Gilmour 1968, Wang 1971).
- d) A DNS-hez kötődő kromatin savanyú fehérjék immunspezifitást mutatnak (Wakabayashi és mtsai 1973).

Nagy számú adat tanúsága szerint a kromatin savanyú fehérjék részt vesznek a sejt replikációs tevékenységében. Megállapítást nyert, hogy a nyugvó sejtpopulációk stimulációjakor a DNS szintézis beindulását a kromatin sava-



nyú fehérjék fokozott szintézise előzi meg az ún. praereplikációs szakaszban (Rovera és Baserga 1971). Ezen fehérjék a hisztonoktól eltérően a sejtciklus mindegyik fázisában szintetizálódnak, azonban legkifejezettebben a késői G<sub>1</sub>-ben, ahol az aminosav beépülés mintegy négyszeresére emelkedik (Gerner és Humphrey 1973).

A sejtprolifleráció és a magi fehérjék kapcsolatának a tanulmányozására számos kísérleti modell alkalmas; így a regenerálódó máj, a phytohaemagglutinnal stimulált lymphocyták, a medium cserével vagy szérummal oszlásra kényszerített nyugvó sejtpopulációk vizsgálata (Allfrey 1970, Baserga és Stein 1971).

A bemutatandó kísérletünkben ugyanazon tumor gyorsan és lassan proliferáló sejtpopulációinak összehasonlítását végeztük, amely módszer alkalmasnak ígérkezett a magi fehérjék, sejtprolifleráció változását kísérő működésének a vizsgálatára.

#### *Anyag és módszer*

Kísérleteinkhez mindkét nemű 20—25 g súlyú CFLP egerekre  $5 \times 10^6$  tumorsejtet i.p. transzplantált NK/Ly ascites tumort használtunk az átoltást követő különböző napokban.

Az RNS polymeráze aktivitás vizsgálatához Berkowitz és mtsai (1969) módszerével sejtmagot izoláltunk. Az Mg<sup>++</sup>-al és Mn<sup>++</sup>-al aktiválható RNS polymeráze aktivitást a <sup>3</sup>H—UTP beépülése alapján, Pogo (1972) által leírt módon határoztuk meg a következőképpen:

Az NK/Ly ascites tumor sejteket mostuk 0,32 M szacharozéval, amely oldat 0,002 M MgCl<sub>2</sub>-t (vagy MnCl<sub>2</sub>-t), 0,001 M Káliumfoszfátot pH 6,8-et tartalmazott. A sejteket duzzasztottuk 0,01 M NaCl 0,001 M Káliumfoszfát pH 6,8 pufferral 5°C-on 15 percig, majd homogenizáltuk 0,32 M szacharoz-0,001 M MgCl<sub>2</sub> (vagy MnCl<sub>2</sub>) 0,3%-os Triton-X-100 tartalmú pH 6,3-as 0,001 M Káliumfoszfát-pufferban. Az így nyert sejtmagokat a következő összetételű inkubáló oldatban szuszpendáltuk: 0,3 M szacharoz, 0,01 M Tris-HCl (pH 7,8), 0,03 M 2-merkaptotanol. A magnéziummal aktivált RNS polymeráze vizsgálatához ez az oldat 0,004 M MgCl<sub>2</sub>-t és 0,06 M NaCl-t, a mangánnal aktivált pedig 0,002 M MgCl<sub>2</sub>-t és 0,03 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>So<sub>4</sub>-t tartalmazott.

Kísérleti pontonként négy meghatározást végeztünk. Az inkubáló oldat 0,25 ml-je 10<sup>7</sup> sejtmagot tartalmazott, amelyet 15 percig 37°C-on előinkubáltunk, majd 0,1—0,1 μM ATP-t, CPT-t és GTP-t, valamint 0,03 μM UTP-<sup>3</sup>H-t adtunk hozzá. A reakciót 15 perc múlva 5 ml 10%-os triklórecetsavval leállítottuk. A keletkezett csapadékot Whatman GF szűrőn összegyűjtöttük és mostuk 3 × 10 ml 10%-os triklórecetsavval, amely 10 μM nem radioaktív nukleotidákat és 0,05 M Natriumpyrofoszfátot tartalmazott. A Whatman GF szűrőn összegyűjtött RNS-t tartalmazó csapadék radioak-

tivitását Beckman LS-100 C spektrometeren toluol-ethoxyethanol alapanyagú szcincillátor oldatban mértük meg (Fox 1968).

A sejtmagok egy részéből Burton (1956) módszerével meghatároztuk a DNS tartalmat. Az RNS polymeráze aktivitást az egy mg DNS-re vonatkoztatott pM-ban kifejezett UMP beépülés alapján fejeztük ki.

A magi fehérjék vizsgálatához  $30 \mu\text{C}$   $^3\text{H}$ -lizint vagy  $^3\text{H}$ -arginint i.p. adtunk az NK/Ly ascites tumoros egereknek 1, 6, illetve 24 óráig. Az állatok leölése után az ascites folyadékot centrifugálással eltávolítottuk, a sejtmagot Perry és Kelley (1968) módszerével izoláltuk. Stein és Borun (1972) módszerének módosításával az alábbiak szerint izoláltuk a magi fehérjéket:

$10^8$  sejtmagot szakaszosan extraháltunk

a) 0,15 M NaCl-dal,

b) 0,35 M NaCl-dal,

c) 0,2 M NaCl-ot tartalmazó 0,2 N HCl-dal,

d) majd a visszamaradt maradékot 1% Natrium dodecylszulfátot tartalmazó 0,01 M Na-foszfátban (pH 6,8) oldottuk fel.

A frakciók fehérjetartalmát Lowry és mtsai (1951) szerint Folin reagenssel, a radioaktivitásukat pedig Beckman LS—100 C spektrometerben határoztuk meg.

Az előállított fehérje frakciókat molekulásúlyuk alapján SDS-polyakrilamid-gél elektroforézisen Weber és Osborn (1969) módszerével szétválasztottuk. A frakciókat oldottuk 0,01 M Natriumfoszfát (pH 7,0) — 1% Natrium-dodecylszulfát [SDS] — 1% 2-merkaptóetanol oldatban  $37^\circ\text{C}$ -on 2 óráig, majd azokat 18 óráig dializáltuk 0,1% SDS-t és 0,1% 2-merkaptóetanolot tartalmazó 0,01 M Natriumfoszfát (pH 7,0) pufferrel szemben, amely azonos az elektroforézisnél használt pufferrel. Az egyes kísérletekben megadott fehérjemennyiséget 10% glicerinnel és  $5 \mu\text{l}$  0,05%-os bromfenolkék jelző festékkel együtt helyeztük fel a géloszlop tetejére. Az elválasztás 4 M ureat tartalmazó 10%-os polyakrilamid-gélen történt szobahőmérsékleten, 6 óráig és csövenként 8 mA mellett.

Az elektroforézis befejezésével a géleket Coomassie Brilliant blueval megfestettük és azok denzitását Joyce-Loebl Chromoscan típusú denzitometeren 575 nm-en megmértük. A molekulásúly megbecsülésére a következő standardokat használtunk: Bovin serum albumin (BSA) ms: 68,000, tripszin ms: 23,800, ribonukleáze (RNáze) ms: 13,700, és cytochrom C ms: 12,400.

A mechanikusan felszeletelt géleket 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ban  $50^\circ\text{C}$ -on 5 óráig inkubáltuk, majd azok rádióaktivitását Beckman LS—100 C spectrometeren 2-ethoxyethanol-toluol alapanyagú folyadékszcintillációs rendszerben megmértük (Fox 1968).

Az egyes hiszton frakciókat a Johns (1964) módszerének Gurley és Hardin (1968) által történő módosított eljárásával állítottuk elő.

A kromatin fehérjék és a DNS kapcsolatának a megbecsülésére Graziano és Huang (1971) módszerével csökkenő ion erőssége mellett izolált kromatin ehidiumbromid kötőképességét Farrand spektrofluorimeteren 335 nm gerjesztési és 593 nm fluoreszcenciás hullámhossznál vizsgáltuk.

Kísérletekhez az alábbi izotopokat, ill. finom vegyszert használtunk: L-lizin-6-<sup>3</sup>H, HCl (spec.akt: 291,0 mCi/mM, MTA Izotóp Intézet), L-Arginin 5-<sup>3</sup>H—HCl (spec.akt: 16 Ci/mM, Radiochemical Center Amersham) és Uridin-5-<sup>3</sup>H—Na-trifoszfát (spec.akt: 1 Ci/mM, Radiochemical Center Amersham).

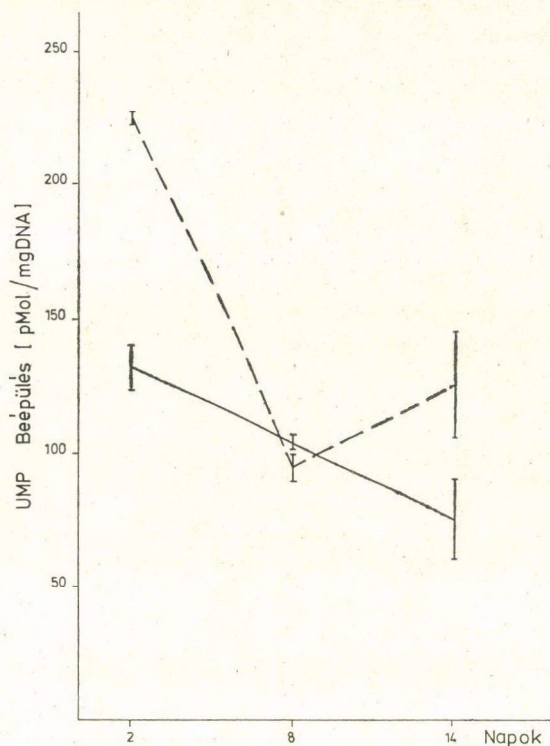
Az Ethidiumbromid (2,7-diamino-10-ethyl-9-phenilphenantridium bromid) Calbiochem, a Coomassie Brilliant Blue pedig Schwarz-Mann gyártmányú volt.

### *Eredmények*

Előző vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az NK/Ly ascites tumor növekedése során a sejtek átlagos ciklus ideje meghosszabbodik, az S fázisban levő sejtek aránya pedig csökken, amelynek következtében a gyorsan proliferáló sejtpopuláció folyamatosan átalakul lassan proliferálóvá. A különböző proliferációs sajátossággal rendelkező sejtpopulációk nemcsak a DNS, hanem az RNS szintetizáló képesség tekintetében is különböznek egymástól (Kopper és mtsai 1974). Ezt bizonyítja az 1. sz. ábrán bemutatott RNS polymeráze aktivitásának a csökkenése is. A különböző korú tumorok sejtmag összehasonlításakor magnézium jelenlétében a <sup>3</sup>H-UTP majdnem két és félszer jobban épült be a 3 napos, mint a 8 napos tumorból izolált sejtmag RNS-ébe. Kisebb méretekben ugyan, de csökkent a mangánnal aktiválható RNS polymeráze aktivitás is.

Kérdésként vetődött fel, hogy a gén átírást és replikációt befolyásoló magi fehérjék szintézise, amely függ a sejtek életciklusának a fázisaitól, — hogyan követik a DNS működésének és a sejtek proliferációs állapotának a változását. Ezért összehasonlítottuk a 3 és 10 napos NK/Ly ascites tumoron a <sup>3</sup>H-lizin és <sup>3</sup>H-arginin beépülését. Az I. táblázat adatai mutatják, hogy a radioaktiv lizin beépülése a 10 napos tumor fehérjéibe mintegy felére csökkent a 3 napos értékhez képest. Ezt azonban számos, a fehérjeszintézissel közvetlenül össze nem függő tényező is létrehozhatja (a jelzett sejtpopuláció eltérő nagysága, permeabilitás, aminosav-pool és aminosav metabolizmus változása). Ezen hibaforrás kiküszöbölésére a magi fehérjék specifikus aktivitásait az egész sejt fehérjéinek specifikus aktivitására is vonatkoztattuk (Cholon és Studzinski 1974). A beépülés kiértékelésénél azt is figyelembe kell venni, hogy a vizsgált fehérjék lizin tartalma eltérő, így a jelölődési különbségek nemcsak a szintézis mértékét tükrözik.

Ezért ezt a kísérletünket az egyes fehérje frakcióknak a tumor korától függő jelölődésének időbeli változása alapján kívántuk kiértékelni. A 3 és 10



1. Ábra. RNS-polymeráze aktivitás vizsgálata különböző korú NK/Ly ascites tumoron.  
 - - - - Mg<sup>++</sup> aktiválható RNS polymeráz; ——— Mn<sup>++</sup> aktiválható RNS polymeráz

### I. Táblázat

#### <sup>3</sup>H-lizin beépülése NK/Ly ascites tumor mag fehérjébe

Fehérje frakciók: Jelzési idő:	3 napos tumor			10 napos tumor		
	1 óra	6 óra	24 óra	1 óra	6 óra	24 óra
Egész sejt	75,2 ±1,2	42,7 ±1,0	27,9 ±0,4	34,1 ±1,5	12,7 ±0,8	7,4 ±0,3
Magi 0,15 M NaCl-al kivonható	39,5 ±0,7	26,8 ±0,6	20,6 ±0,4	21,2 ±0,9	10,5 ±0,2	7,2 ±0,3
Magi 0,35 M NaCl-al kivonható	53,3 ±0,8	31,8 ±0,7	14,8 ±0,4	27,2 ±1,4	12,8 ±0,8	6,6 ±0,2
Hiszton	62,6 ±1,6	32,1 ±0,8	27,2 ±1,2	28,7 ±1,0	11,2 ±0,3	8,1 ±0,2
Rezidualis magi savanyú fehérje	44,5 ±1,2	29,5 ±1,0	24,8 ±0,4	24,8 ±0,8	9,2 ±0,1	5,5 ±0,1

Eredmények kifejezve specifikus aktivitásban ( $10^3$  cpm x fehérje  $mg^{-1}$ ).

$$\pm SD = \sqrt{\frac{\varepsilon(x-x')^2}{n-1}}$$

Csoportonkénti 4–6 állatból eltávolított tumorsejtek jelölése és magi fehérje frakciók vizsgálata az Anyag és Módszer című fejezetben leírtak szerint történt.

## II. Táblázat

Magi fehérjék egész sejt fehérjéire vonatkoztatott jelölődése <sup>3</sup>H-lizin-nel

Magi fehérje frakciók:	3 napos tumor			10 napos tumor		
	Jelzési idő			Jelzési idő		
	1 óra	6 óra	24 óra	1 óra	6 óra	24 óra
0,15 M NaCl-al kivonható	0,53	0,63	0,74	0,63	0,82	0,98
0,35 M NaCl-al kivonható	0,71	0,84	0,50	0,81	1,10	0,89
Hiszton	0,82	0,75	0,98	0,84	0,88	1,10
Reziduális sav fehérje	0,59	0,69	0,89	0,72	0,72	0,75

Eredmények kifejezve relatív spec. aktivitásban.

$$\left( = \frac{\text{frakció specifikus aktivitása}}{\text{egész sejt fehérjéinek spec. aktivitása}} \right)$$

Az adatok kiszámításának alapját a I. Táblázaton bemutatott kísérlet képezte.

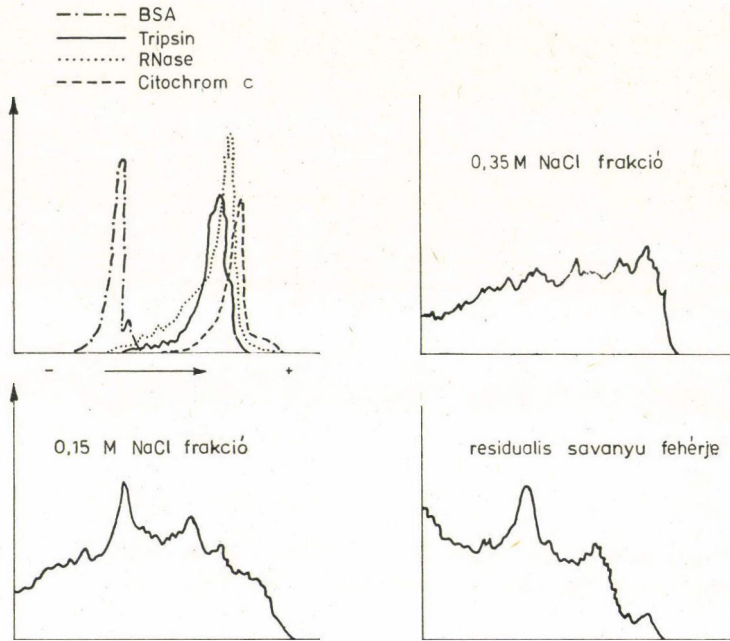
napos tumorok összehasonlításakor azt tapasztalhattuk, hogy az utóbbiban a <sup>3</sup>H-lizin beépülése nemcsak kisebb, hanem 24 óra alatt a rádiaktivitás csökkenése is gyorsabb. A hisztonok aminosav összetételének ismerete érthetővé teszi azt, hogy a <sup>3</sup>H-lizin jobban épül be a hisztonokba, mint a savanyú fehérjékbe. Ez a különbség azonban már nem annyira kifejezett a 10 napos tumornál, mint a 3 naposnál, amelyből a savanyú fehérjék szintézisének relatív emelkedésére lehetne gondolni. Irodalmi adatokkal megegyezően a mi vizsgálatainkban is a magi fehérjék jelölődése elmaradt az egész sejt fehérjétől, azonban a beépülés csökkenése is lassúbb némelyik magi fehérjében (Stein és Baserga 1971). Így megemlítenő a 3 napos tumor magi reziduális savanyú fehérjéinek és a 10 napos tumor hiszton frakciói rádióaktivitásának viszonylagosan lassúbb ütemű csökkenése (II. táblázat).

Következő kísérleteinkben tanulmányoztuk a rádióaktív aminosav beépülését a hisztonok és reziduális savanyú fehérjék SDS-polyakrilamid gél elektroforézissel szétválasztott frakcióiba.

A 2. és 3. ábra az NK/Ly ascites tumor magi fehérjéinek megoszlását mutatja az SDS-polyakrilamid gélen. A 0,15 M NaCl-al kivonható frakció a karyoplasma szolubilis fehérjéit és az RNP partikulumokat tartalmazza (Busch és Mauritzen 1967). A reziduális savanyú fehérjék egy lassabban vándorló, nagyobb molekulásújú (kb. 65 000) és egy vagy két gyorsan vándorló, alacsonyabb molekulásújú (kb. 30 000—10 000) frakciók köré csoportosulnak. Ezzel szemben a 0,35 M NaCl-al kivonható, a kromatinhoz kevésbé társuló fehérjék molekulásújú szerint megoszlása sokkal egyenletesebb.

A 3. ábra a mag összhiszton és a Johns (1964) módszerével előállított egyes hiszton frakciók elektroforetikus vándorlását mutatja be. Ily módon kívántuk igazolni az összhiszton elektroforézisekor az egyes frakciók helyét a polyakrilamid-gélen.

A  $^3\text{H}$ -lizin beépülésének a vizsgálatokor a 3 és 10 napos tumor magi reziduális savanyú fehérjéi között nyilvánvaló eltérést lehetett tapasztalni. Az 1 órás jelölődés után a rádióaktivitás a 3 napos tumornál legkifejezettebben a 60 000 és 30 000 molekulásúly közötti fehérjéknél jelenik meg, míg a 10 napos tumornál a kisebb mértékű beépülés megoszlási csúcsa a 30 000 molekulásúly alatti frakcióban észlelhető (4. és 5. ábra).

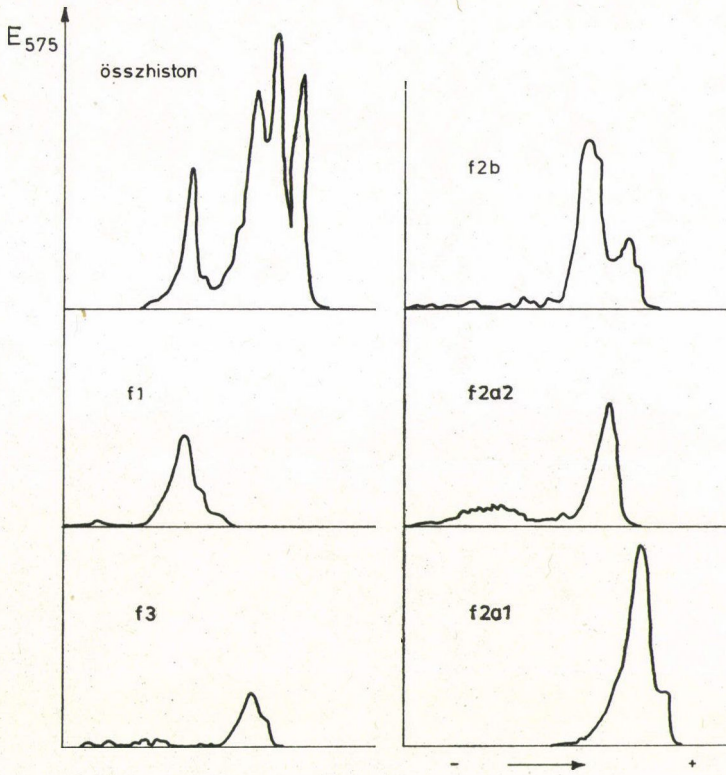


2. Ábra. Magi fehérje frakciók elválasztása SDS-polyakrilamid gél-elektroforézisen. Az ábrán a függőleges tengely az 575 nm-en mért relatív denzitást, a vízszintes tengely pedig a vándorlási távolságot mutatja.

A hisztonok vizsgálatánál feltűnőnek tarthattuk, hogy a  $^3\text{H}$ -lizin beépülése legnagyobb mértékben nem a lizin-gazdag  $F_1$ , hanem az  $F_3$ – $F_{2b}$  frakciókban volt észlelhető (6. ábra). A 10 napos tumor hisztonjaiba a beépülés alacsonyabb volt, de az a frakciók között egyenletesebben oszlott meg (7. ábra). Ez utóbbi kísérletben az  $F_1$  frakció előtt Coomassie-Brilliant blue festődésmentes területen is észleltünk radioaktivitást. Hasonló megfigyelésről Gottesfeld és mtsai (1974), valamint Ljiljana és Koviljka (1973) számoltak be. Utóbbi szerzők a Coomassie Brilliant blue-val nem festődő és a beépült aminosav radioaktivitását mutató területen glykoproteint mutattak ki.

A  $^3\text{H}$ -lizin mellett a  $^3\text{H}$ -arginin beépülését is megvizsgáltuk a hisztonokba. A  $^3\text{H}$ -lizinnel végzett kísérlet eredményéhez hasonlóan a 3 napos tumor hiszton frakció közül az  $F_{2b}$ – $F_{2a}$  jelölődése volt a legnagyobb. A 10 napos

tumornál már az  $F_{2a_1}$  frakció jelölődése volt a legnagyobb, az egy órás vizsgálati időben. Jelentőséget tulajdoníthatunk annak, hogy 24 órával a  $^3\text{H}$ -arginin adása után a 10 napos tumor  $F_{2b}$  és  $F_{2a_2}$  frakcióinak megfelelő területen a jelölődés nem volt alacsonyabb, mint az egy órás jelzés után. Ez a megfigyelés arra utal, hogy egyes hisztonfrakciók ( $F_{2b}$ ,  $F_{2a_2}$ ) lebomlási ideje a sejtmag többi



3. Ábra. Histon frakciók elválasztása SDS-polyakrylamid gél-elektroforézisen. Felvitt fehérje mennyiség: Összhiszton = 50  $\mu\text{g}$ ,  $f_1$  = 22  $\mu\text{g}$ ,  $f_3$  = 36  $\mu\text{g}$ ,  $f_{2b}$  = 40  $\mu\text{g}$ ,  $f_{2a_2}$  = 50  $\mu\text{g}$  és  $f_{2a_1}$  = 40  $\mu\text{g}$ .

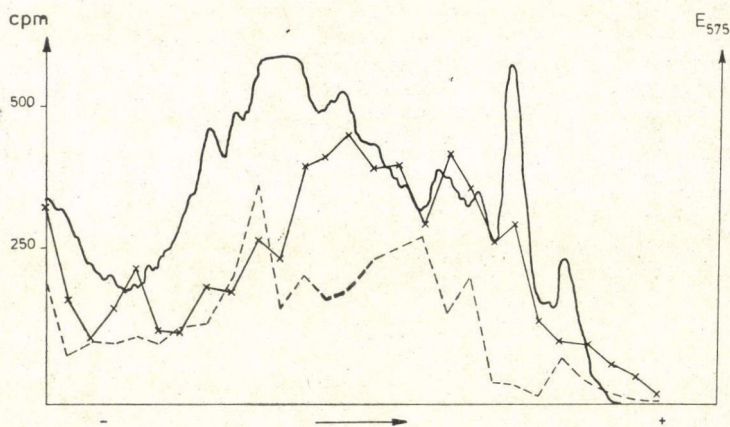
### III. Táblázat

Ethidiumbromid fluoreszcenciája 3 és 10 napos NK/Ly ascites tumorból izolált Deoxyribonukleoprotein jelenlétében.

Tumor kora	I—I <sub>0</sub>
3 napos	49,0
	53,0
10 napos	28,5
	21,0

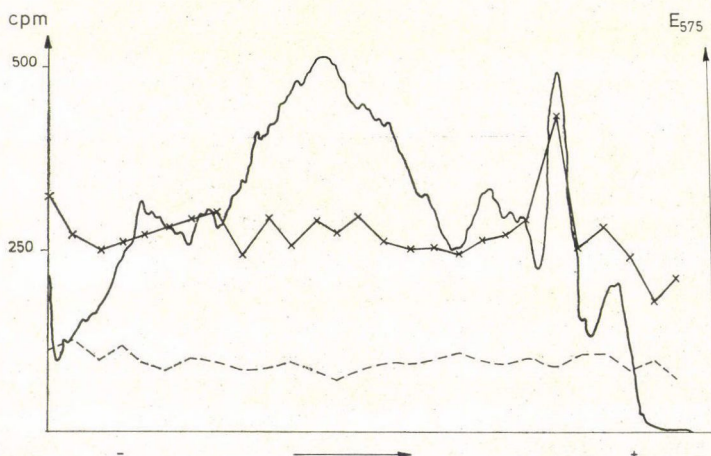
A deoxyribonukleoprotein izolálása Graziano és Huang (1971) módszerével, egyre csökkenő ion-erősség mellett történt.

A 3 ml 0,015 M NaCl—0,0015 M Na citrat (pH 7) puffer 1 OD<sub>260</sub><sup>1cm</sup> mennyiségnek megfelelő deoxyribonukleoproteint és 5  $\mu\text{g}$  ethidiumbromidot tartalmazott. Fluoreszcencia mérést 335 nm gerjesztési és 593 nm fluoreszcenciás hullámhossznál Farrand spektrofluoriméteren végeztük el.



4. Ábra.  $^3\text{H}$ -lizin beépülése 3 napos NK/Ly ascites tumor magi reziduális savanyú fehérje frakcióiba.

A géltre felvitt fehérje mennyiség 150–150  $\mu\text{g}$ . Jelmagyarázat: ——— denzitás 575 nm-en;  $\times-\times-$  cpm 1 órai jelzés után; - - - - cpm 24 órai jelzés után



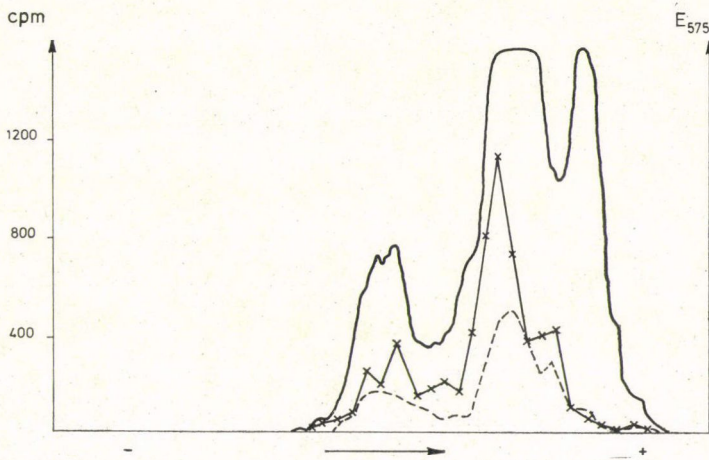
5. Ábra.  $^3\text{H}$ -lizin beépülése 10 napos NK/Ly ascites tumor magi reziduális savanyú fehérje frakciójába. Gélre felvitt fehérje mennyiség 350–350  $\mu\text{g}$ .

Jelmagyarázat: ——— denzitás 575 nm-en;  $\times-\times-$  cpm 1 órai jelzés után; - - - - cpm 24 órai jelzés után

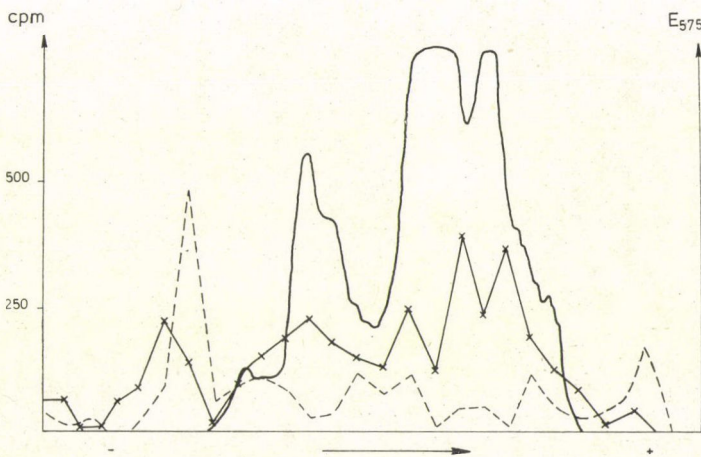
fehérje frakcióitól eltérően lassúbb a lassan proliferáló sejtpopulációban, mint a gyorsan proliferálóban (8. és 9. ábra).

A DNS és a kromatin fehérjék közötti kapcsolat természetére az ethidiumbromid kötődés vizsgálatából kívántunk következtetni. Az ethidiumbromid fluoreszcenciája igen jelentősen fokozódik, miközben interkalációs kötésbe lép a DNS-sel. A DNS-hez kötődő kromatin fehérjék azonban megakadályozzák a festék kötődését a DNS-hez. Ezért a kromatin ethidiumbromid



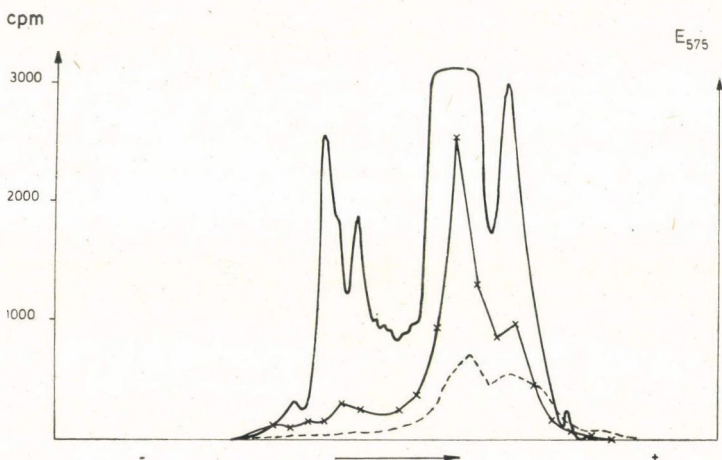


6. *Ábra.*  $^3\text{H}$ -lizin beépülése 3 napos NK/Ly ascites tumor hiszton frakcióiba. Géltre felvitt fehérjemennyiség:  $100\ \mu\text{g}$ . Jelmagyarázat: ———— denzitás 575 nm-en;  $\times-\times-$  cpm 1 órai jelzés után; - - - - cpm 24 órai jelzés után

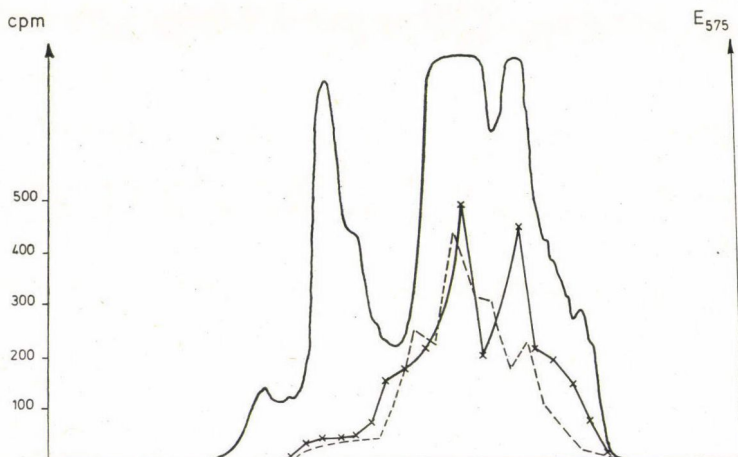


7. *Ábra.*  $^3\text{H}$ -lizin beépülése 10 napos NK/Ly ascites tumor hiszton frakcióiba. Géltre felvitt fehérje mennyiség  $100\ \mu\text{g}$ . Jelmagyarázat: ———— denzitás 575 nm-en;  $\times-\times-$  cpm 1 órai jelzés után; - - - - cpm 24 órai jelzés után

kötőképességéből a DNS szabad szegmentjeinek a nagyságára következtethetünk. Kísérletünkben azt találtuk, hogy a 3 és 10 napos tumorból izolált DNP különböző mértékben fokozza az ethidiumbromid fluoreszcenciáját. A 10 napos tumor DNP-nek a 3 naphoz képest mintegy felére csökkent fluoreszcencia fokozó hatása arra utal, hogy a szabad DNS szegmentek területe kisebb. Feltételezhetően a 10 napos tumorban a DNS kiterjedtebben fedett kromatin fehérjékkel, mint a 3 naphoz, amely a gén működés fokozottabb represszálságára utal (III. táblázat).



8. Ábra.  $^3\text{H}$ -Arginin beépülése 3 napos NK/Ly ascites tumor hiszton frakcióiba. Géltre felvitt fehérjemennyiség: 100  $\mu\text{g}$ . Jelmagyarázat: ———— denzitás 575 nm-en;  $\times$ — $\times$ — cpm 1 órai jelzés után; - - - - cpm 24 órai jelzés után



9. Ábra.  $^3\text{H}$ -Arginin beépülése 10 napos NK/Ly ascites tumor hiszton frakcióiba. Géltre felvitt fehérjemennyiség: 100  $\mu\text{g}$ . Jelmagyarázat: ———— denzitás 575 nm-en;  $\times$ — $\times$ — cpm 1 órai jelzé után; - - - - cpm 24 órai jelzés után

### Megbeszélés

Előző tanulmányunkban sokoldalúan tanulmányoztuk az NK/Ly ascites tumor sejtpopulációi proliferációs paramétereinek változásait a transzplantáció utáni különböző napokban (Lapis és mtsai 1973, Kopper és mtsai 1974).

Megállapítottuk, hogy a tumor növekedésével elsősorban a sejtek átlagos ciklus ideje — a két mitózis közötti idő — hosszabbodik meg, a nem oszló

sejtek arányának emelkedése a tumor növekedési ütemének a lelassulásáért csak kevésbé tehető felelőssé. Ezen eredményünk alapján a sejtproliferáció és a sejt ultrastrukturális, valamint anyagcsere sajátosságai összefüggéseinek tanulmányozásához kísérleti modellt tudtunk kialakítani.

Az RNS polymeráze vizsgálata arra mutatott rá, hogy a kísérleti rendszerünkben nemcsak az aktuálisan DNS-t szintetizáló sejtek aránya, valamint a DNS replikációjának lelassulását tükröző S fázis ideje, hanem a DNS-ről történő gén átírás is változik. Ez érthető is, mivel a dedifferenciálódott daganatos sejtekben az RNS szintézis sokkal szorosabban kapcsolódik a sejt replikációjához, mint a differenciálódásra képes normál sejtekben. Azon kísérleti eredményünk, miszerint a magnéziummal és a mangánnal aktiválható RNS-polymeráze működése közötti különbség függ a tumor korától, arra enged következtetni, hogy az RNS szintézis csökkenése mellett, a képződött RNS-ek jellege is változik. Itt arra lehet gondolni, hogy a gyorsan proliferáló tumorban a magnéziummal aktiválható nukleoláris RNS polymeráze I. működése áll előtérben, amíg a lassabban proliferáló populációkban a mangánnal aktiválható extranukleoláris RNS polymeráze II., III. és RNS polymeráze I. bár alacsonyabb szinten, de hasonló mértékben működik.

A sejtproliferáció és a magi fehérjék összefüggéseit az eddigi tanulmányok szinkronizált tenyészetben vagy a nyugvó és a proliferációra indukált sejtpopulációk összehasonlításával vizsgálták (Gerner and Humphrey 1973, Farber és mtsai 1971). Úgy gondoljuk, hogy az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben a gyorsan és a lassan szaporodó NK/Ly ascites tumor sejtpopulációinak összehasonlításával — *in vivo* körülmények között tanulmányozhatjuk a daganatos sejtpopuláció proliferációs ütemének lelassulását kísérő tényezőket, amelyek közül némelyek feltételezhetően szerepet játszanak a sejtproliferációt szabályozó mechanizmusokban. Jelen kísérleteinkben a radioaktív lizin és arginin beépülését vizsgáltuk a génregulációban szerepet játszó hisztonokba és magi reziduális savanyú fehérjékbe. A  $^3\text{H}$ -lizin adását követő 1, 6 és 24 órás beépülési értékek áttekintése a gyorsan és a lassan szaporodó sejtpopulációk közötti figyelemre méltó különbségekre mutatott rá. A 3 napos tumornál a reziduális savanyú fehérjék, a 10 naposnál pedig a hisztonok relatív specifikus aktivitása idővel emelkedett, amely arra látszik utalni, hogy ezen fehérjék lebomlása lassúbb, mint a sejt többi fehérjéi. Ezen következtetést azonban csak a relatív specifikus aktivitás alapján vonhatjuk le, mivel a 10 napos tumorból a már beépült  $^3\text{H}$ -lizin a 3 napos tumornál gyorsabban távozik. Ezen utóbbi jelenség magyarázatát nem ismerjük, csupán arra a feltételezésre szorítkozhatunk, miszerint a proteázok aktivitása fokozódott vagy a sejtoszlások késése, illetve elmaradása következtében a képződött fehérjék jelentős része fölöslegessé válik, ezért lebontódik vagy kiürül a sejtből.

A polyakrilamid-gén-elektroforézisen végzett vizsgálatokban a különböző mértékben proliferáló NK/Ly ascites sejtpopulációkból izolált kromatin

fehérje frakciókban a legnagyobb fokú aminosav beépülést eltérő molekulásúlyú fehérjék mutattak. A gyorsan növekvő 3 napos NK/Ly ascites tumorban a magi reziduális savanyú fehérjéi közül a nagy molekulásúlyú csúcs körül észleltük a legnagyobb beépülést, amely összhangban áll Weisenthal és Ruddon (1972) az oszlási ciklusban levő lymphoma sejteken végzett hasonló megfigyeléseivel. Ezzel szemben a 10 napos tumorban egy sokkal alacsonyabb molekulásúlyú magi reziduális savanyú fehérje jelölődése vált uralkodóvá.

A  $^3\text{H}$ -arginin és a  $^3\text{H}$ -lizin beépülésének a vizsgálatok a hisztonok is eltérő frakciók jelölődésének az előtérbe kerülését mutatták a tumor növekedése során. Vizsgálati körülményeink mellett a 3 napos tumornál az  $F_1$ ,  $F_3$  és  $F_{2b}$  frakcióknak megfelelő területen lehetett számottevő beépülést találni, ezzel szemben a 10 napos tumor esetében már az  $F_{2a_1}$  és  $F_{2a_2}$  frakciók is jelölődtek. Különösképpen érdemes, hogy a 10 napos tumor vizsgálatok az  $F_{2a_2}$  frakcióban a  $^3\text{H}$ -arginin beépülése 24 óra alatt alig csökkent.

A bemutatott kísérletünkben láthattuk, hogy az NK/Ly ascites tumor növekedésével az aminosavak kromatin fehérjékbe történő beépülésének megváltozásával párhuzamosan a sejtek oszlási ideje meghosszabbodott, az RNS-polymeráze aktivitás csökkent és kevesebb ethidumbromid kötődött a kromatinhoz. Ezen utóbbi változások a génrepresszió fokozódására utalnak. Kérdés, hogy a génműködés ezen csökkenésének kifejlődésében milyen szerepe van a kromatin fehérjéknek. Jelen eredményeink arra engednek következtetni, hogy a génrepresszió fokozódását nem lehet csupán a kromatin fehérjék egészének a szintézisében bekövetkező változásával magyarázni, mivel a radioaktív aminosav beépülése ezen fehérjékbe meglehetősen jól követi az egész sejt fehérjéibe történő beépülést. Így a magi fehérjék szintézise nem tér el az egész sejt fehérjéitől sem a gyorsan proliferáló, sem a lassan proliferáló sejtpopulációban. A polyakrilamid gél elektroforézissel szétválasztott egyes fehérjék vizsgálata azonban már több támpontot nyújtott arra vonatkozóan, hogy melyik fehérje játszhat szerepet a sejtproliferáció szabályozásában. Így adataink arra utalnak, hogy a reziduális magi savanyú fehérjék közül az elektroforetikusan lassabban vándorló, relatíve nagyobb molekulásúlyú fehérjék szükségesek a gyors sejtproliferációhoz. Ezzel szemben a hisztonok — különösképpen az  $F_{2a_2}$  és  $F_{2a_1}$  frakciók — relatíve hosszabb életidejűek a lassan szaporodó, mint a gyorsan szaporodó sejtekben. Ezért feltételezhetően az  $F_{2a_2}$  és az  $F_{2a_1}$  hisztonok közvetlen vagy közvetett szerepet játszanak a sejtproliferáció csökkenését eredményező gén-represszióban.

## Összefoglalás

Az NK/Ly ascites tumor növekedése során a sejtproliferáció csökkenését kísérő anyagcsere változásokat tanulmányoztuk a sejtmagban. Összehasonlítottuk a 3 és 10 napos sejtpopulációkban radioaktív aminosavval jelölt hisztonok és reziduális savanyú fehérjék megoszlását polyakrilamid gél elektroforézisen. A két sejtpopuláció a DNS replikációját tükröző S fázis időtartamában, az RNS polymeráze aktivitásban és az izolált deoxyribonucleoprotein ethidium-bromid kötőképességében különbözött egymástól. Azt tapasztaltuk, hogy a gyorsan szaporodó, 3 napos tumor, és a lassan szaporodó 10 napos tumoros sejtpopulációkban eltérő kromatin fehérje frakciók jelölődése áll előtérben. A gén represszió fokozódására utaló megfigyelésekkel egy időben a reziduális savanyú fehérje nagy molekulású tartományának csökkent mértékű jelölődését és a hisztonok — különösképpen az  $F_{2a_2}$  és  $F_{2a_1}$  frakciók — lassúbb lebomlását észleltük.

## IRODALOM

- Allfrey, V. G.: Federation Proceedings **29**, 1447 (1970).  
 Balhorn, R., Balhorn, M., Morris, H. P. és Chalkley, R.: Cancer Res. **32**, 1775 (1972).  
 Baserga, R. és Stein, G.: Federation Proceedings **30**, 1752 (1971).  
 Bekowitz, D. m. Kakefuda, T. és Sgorn, B. M.: J. Cell Biol. **42**, 851 (1969).  
 Bonner, J. és Huang, R. C.: J. Mol. Biol. **6**, 169 (1963).  
 Burton, K.: Biochem. I. **62**, 315 (1956).  
 Busch, H. és Mauritzen, C. M.: Nuclear Proteins. In: „Methods in Cancer Research” (Ed.: Busch, H.) Vol. **3**, p. 392. Academic Press (1971).  
 Cholon, J. J. és Studzinski, G. P.: Cancer Res. **34**, 588 (1974).  
 Dingman, C. és Sporn, M.: Studies on chromatin I. J. Biol. Chem. **239**, 3483 (1964).  
 Farber, J., Baserga, R. és Gabbay, E. J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **43**, 675 (1971).  
 Fox, B. W.: Int. J. Appl. Rad. **19**, 717 (1968).  
 Frenster, J. H.: Nature **206**, 680 (1965).  
 Gerner, E. W. és Humphrey, R. M.: Biochim. Biophys. Acta **331**, 117 (1973).  
 Gottesfeld, J. M., Garrard, W. T., Bagi, G., Wilson, R. F. és Bonner, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **71**, 2193 (1974).  
 Graziano, S. L. és Huang, R. Ch.-C.: Biochemistry **10**, 4770 (1971).  
 Gurley, L. R. és Hardin, J. M.: Arch. Biochem. Biophys. **128**, 285 (1968).  
 Gurley, L. R., Walters, R. A. és Tobey, R. A.: J. Cell Biol. **60**, 356 (1974).  
 Holl, R. J., Poccia, D. L. és Doty, P.: J. Mol. Biol. **61**, 445 (1971).  
 Johns, E. W.: Biochem. J. **92**, 55 (1964).  
 Kleinsmith, L. J. és Allfrey, V. G.: Biochem. Biophys. Acta **175**, 136 (1969).  
 Kopper, L., Jeney, A., Benedeczy, I., Lapis, K., Takács, J.: Orvostudomány **25**, 19 (1974).  
 Kriegstein, H. J. és Hogness, D. S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **71**, 135 (1974).  
 Langan, T. A. és Smith, L. K.: Fed. Proc. **26**, 603 (1967).  
 Lapis, K., Jeney, A., Kopper, L., Szende, B. és Benedeczy, I.: Arch. Geschwulstforsch. **42**, 229 (1973).  
 Ljiljana, S. és Koviljka, K.: Int. J. Biochem. **4**, 345 (1973).  
 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. és Randall, R. J.: J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).  
 Paul, J. és Gilmour, R. S.: J. Mol. Biol. **34**, 305 (1968).  
 Perry, R. P. és Kelley, D. E.: J. Mol. Biol. **35**, 37 (1968).  
 Pogo, B. G. T.: J. Cell. Biol. **53**, 635 (1972).  
 Rovera, G. és Baserga, R.: J. Cell Physiol. **77**, 201 (1971).  
 Rovera, G. és Baserga, R.: Exptl. Cell Res. **78**, 118 (1973).  
 Spelsberg, T., Hnilica, L. S. és Ansevin, A. T.: Biochim. Biophys. Acta **228**, 550 (1971).

- Stein, G. és Baserga, R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 218 (1971).  
Stein, G. S. és Borun, T. W.: *J. Cell Biol.* **52**, 292 (1972).  
Stevely, W. S. és Sticken, L. A.: *Biochem. J.* **110**, 187 (1968).  
Wakabayashi, K., Wang, S., Hord, G. és Hnilica, L. S.: *FEBS Letters* **32**, 46 (1973).  
Wang, T. Y.: *Exptl. Cell Res.* **61**, 455 (1970).  
Wang, T. Y.: *Exptl. Cell Res.* **69**, 217 (1971).  
Weber, K. és Osborn, M.: *J. Biol. Chem.* **244**, 4406 (1969).  
Weisenthal, L. M. és Ruddon, R. W.: *Cancer Res.* **32**, 1009 (1972).

## DAGANATOS SEJTPOPULÁCIÓ NÖVEKEDÉSÉNEK TANULMÁNYOZÁSA

### III. Kemoterápiás szerek hatásának vizsgálata eltérő növekedési ütemű NK/Ly ascites tumoron

KOPPER LÁSZLÓ, JENEY ANDRÁS, az orvostudományok kandidátusa és LAPIS KÁ-  
RÓLY, az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1976. III. 9.

Előző vizsgálataink során kimutattuk, hogy az NK/Ly ascites tumor növekedési sebessége a transzplantációt követően sejtkinetikai, morfológiai és biokémiai változásoktól kísérve fokozatosan lassul (Lapis és Kopper 1970, Lapis és mtsai. 1973, Kopper és mtsai. 1974). Főbb jellegzetességként a proliferáló sejtek ciklusidejének megnyúlását, a nem-proliferáló sejtek arányának mérsékelt emelkedését, a sejtek RNS és fehérje tartalmának emelkedését a macromolekulák szintézise ütemének csökkenését, valamint a sejtmagban a nukleinsavak citokémiai változását észleltük. Jeney és mtsai (1975) a DNS és a magi fehérjék vizsgálata során mutattak rá arra, hogy e jelenségek hátterében a tumorsejtek genetikus apparátusának egyre fokozódó — de reversibilis — represszáltága áll. Ezek a megfigyelések is feltételezik, hogy a tumorok növekedési ütemében bekövetkező változások jelentősen befolyásolhatják e növekedés gátlására irányuló törekvéseinket.

A daganatok növekedési üteme és terápiás érzékenysége közötti összefüggések tanulmányozásának fontosságát saját megfigyeléseinken túlmenően számos klinikai és kísérleti adat is alátámasztja:

1. A jelenleg rendelkezésünkre álló terápiás eszközökkel elsősorban a gyorsan növekedő human tumorokat tudjuk előnyösen befolyásolni, míg a lassan növekedő tumorok a kezelésre alig vagy nem reagálnak (Zubrod 1972).

2. A proliferáció sebessége nemcsak az egyes tumorok között (Simpson—Herren és Lloyd 1970, Charbit és mtsai 1971), hanem ugyanazon tumor különböző növekedési szakaszában (Lala és Patt 1966, Frindel és mtsai 1967, Wiebel és Baserga 1968, Tannock 1969, Peel és Fletcher 1969, Simpson—Herren és Lloyd 1970, Hofer és Hofer 1971, Lala 1972, Dombernowsky és Hartmann 1972, Lapis és mtsai 1973, Schiffer és mtsai 1973, Kopper és mtsai 1974) is eltérő.

3. Bruce és mtsai (1966), majd őket követően számosan igazolták — elsősorban in vitro szinkronizált tenyészetekben —, hogy a citosztatikumok iránti érzékenység tekintetében a sejtek proliferáló, illetve nem-proliferáló jellegük, ezen belül a ciklusban adott pillanatban elfoglalt helyük alapján különböznek

(Mauro és Medoc-Jones 1970, Bhuyan és mtsai 1972, vanPutten és mtsai 1972).

4. A normál és daganatos szöveteken végzett sejtkinetikai vizsgálatok arra utalnak, hogy bár a szervezet legtöbb szövete lassabban proliferál, mint a daganat, valószínűtlen, hogy a tumor lenne a leggyorsabban proliferáló szövet. Így elsősorban a csontvelői (haemopoetikus) sejtek és a gyomorbél-rendszer nyálkahártyájának hámsajtjei újulnak meg gyorsabban a tumoros szövetnél és szerepelnek dózislimitáló tényezőként számos — elsősorban a gyorsan proliferáló sejtekre ható — szer esetében (Frindel és mtsai 1968, Young és DeVita 1970, Shirakawa és mtsai 1970, Terz és mtsai 1971, Gavosto 1974, Brown 1975).

E röviden összefoglalt megfigyelések egyértelműen jelzik, hogy az optimális kezelési program megtervezésekor ajánlatos a citosztatikus szerek proliferáció-függő hatását figyelembe venni. Ez utóbbi tanulmányozására, mint említettük, eddig elsősorban szövettenyészeteket használtak. Az NK/Ly ascites tumoron végzett előzetes vizsgálataink alapján (Lapis és mtsai 1973, Kopper és mtsai 1974) arra törekedtünk, hogy olyan rendszert hozzunk létre, amellyel e kérdés *in vivo* körülmények között is megközelíthető. Jelen közleményünkben e kísérleteinkről számolunk be.

#### *Anyag és módszer*

Kísérleteinkhez mindkét nembeli, átlagosan 25 g súlyú CFLP egeret használtunk (LATI, Gödöllő). Az egereket plasztikdobozban, préselt tápon és csapvízen tartottuk. Az NK/Ly ascites tumort  $5 \times 10^6$  sejt hetenkénti transzplantálásával tartottuk fenn.

A daganatgátló hatás mérésére az alábbi rendszert választottuk (*korfüggő rendszer*):

A kezeléseket a transzplantáció utáni 4. és 10. napon végeztük a szerek egyszeri dóziséval, 1 órával a kezelés után a daganatsejteket az állatok hasüregéből leszívtuk és  $10^7$  sejtszámmal új állatokba oltottuk. A retranszplantációt követően különböző időpontokban meghatároztuk a tumorok tömegét (jelen esetben az összsejtszámot). Néhány esetben a szerek hatását különböző kezelési tartamok (1, 6 és 24 óra) után is összehasonlítottuk.

Kísérleteink során egy-egy csoportban 4—6 állat szerepelt.

A kemoterápiás szerekkel történő kezelésnél a lehetőség szerint mindig a szerek LD<sub>50</sub>-éhez viszonyítottan arányosan csökkentett dózisokat használtunk. A következő citosztatikus szereket vizsgáltuk:

Mannitolmustár (Degranol<sup>R</sup>) 1,6-bis-(2-kloretilamino)-1,6-dideoxy-D-mannitol  
Dibromdulcit (Mitolactol<sup>R</sup>, DBD)

1,6-dibromo-1,6-dideoxy-D-dulcitol



**Dulcitépoxid (DAD)**

1,2—5,6-Dianhydrodulcitol

(Chinoín Gyógyszer és Vegyészeti Termékek Gyára)

**Tetramezylamannit (Zytostop, TMM, R—52)**

1,2—5,6-tetra-O-metilszulfonil-D-mannitol

**Dimezyldianhydroidit (DMDAI, 13020)**

1,6-dimezyl-2,3,4,5-dianhydro-L-iditol

**Dimezyletilaminoeritrit (Lycurim, R—74)**

1,4-di-mesyl-oxyetilamino-1,4-dideoxy-m-eritritol

(Gyógyszerkutató Intézet)

**Cyclophosphamid (Endoxan, Cytoxan)**

2,bis-/2-kloretilaminotetrahydro-2H 1,3,2 oxazaphosphorine 2 oxid

(VEB, Jenapharm, Ankerwerk Rudolstadt, NDK)

**Melphalan (L-fenilalaninmustár)**

3-p-L bis-(2-chloroethyl)-aminophenylalanin Dimethylmyleran

(dr. Connors ajándéka, Chester Beatty Res. Inst., London)

**Metylendimethanesulphonate (MDMS)**

(dr. Fox ajándéka, Christie Hospital and Holt Radium Inst., Manchester).

**5-fluorouracil (5-FU)**

(Roche Products Ltd., Anglia)

**BCNU**

1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea

**CCNU**

1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea

**MeCCNU**

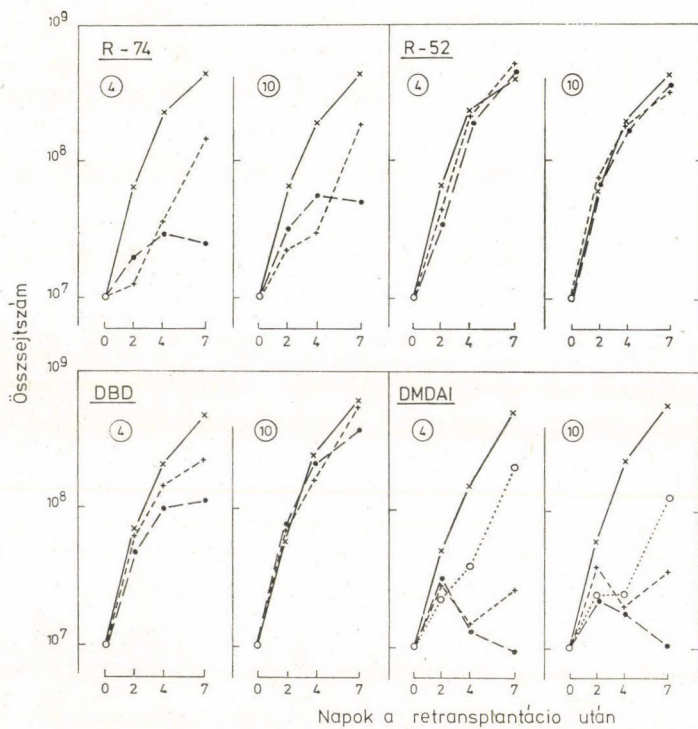
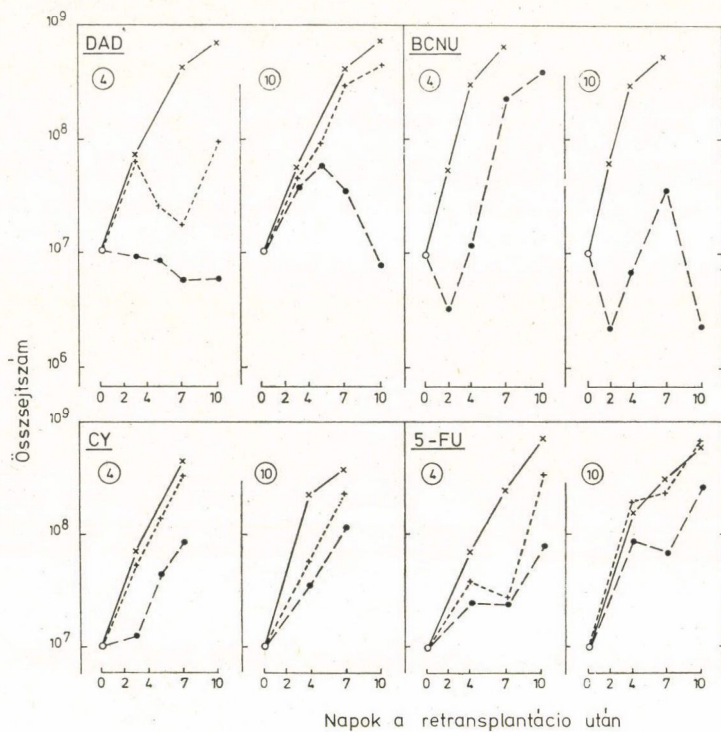
1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea

(dr. Goldin ajándéka, National Institute of Cancer, Bethesda, USA).

A szerek oldása a következőképpen történt: a DAD-t, 5-FU-t és Cyclophosphamidot fiziológiás konyhasóban oldottuk, a nitrosoureákat DMSO-5% Tween 80-ban, a többi szert 5%-os Tween 80-ban szuszpendáltuk.

*Eredmények*

Előzőekben ismertetett eredményeink azt mutatták, hogy az NK/Ly ascites tumor transzplantációját követően a daganat proliferációs üteme fokozatosan lassul (Lapis és mtsai 1973, Kopper és mtsai 1974). Így a vizsgálatainkhoz önkényesen kiválasztott két időpontban, a 4. és 10. napon, sejtkinetikai szempontból — elsősorban a sejtciklus és fázisainak tartamában — eltérő, relatíve gyorsan, illetve lassan proliferáló tumort találunk (I. Táblázat).



## I. Táblázat

NK/Ly ascites tumor sejtkinetikai paramétereit 4 és 10 nappal  $5 \times 10^6$  sejttel történt transzplantáció után

Tumor kora	4. nap	10. nap
Összsejtszám ( $\times 10^6$ )	130,0	788,0
Sejtciklusidő (h) <sup>+</sup>	30,6	56,7
G <sub>2</sub> fázis (h) <sup>+</sup>	2,9	8,4
S fázis (h) <sup>+</sup>	19,1	30,4
G <sub>1</sub> fázis (h) <sup>+</sup>	8,3	16,4
Timidin index (%)	51,8	36,5
DNS-szintézis (dpm/mg DNS $\times 10^{-3}$ )	11,0	1,76
Növekedési frakció	0,84–1,00	0,67–0,88

<sup>+</sup> A kísérleti adatok Steel és Hanes (1971) módszerével végzett komputeres analízisének alapján nyert értékek.

A két különböző proliferációs rátájú tumorra gyakorolt hatás összehasonlíthatósága végett a 4., illetve 10. napon végzett kezeléseket követően a tumorsejteket azonos sejtszámmal új állatokba oltottuk (retranszplantáltuk), és ebben az új környezetben vizsgáltuk a kezelt daganatsejtek proliferációját. Kezeletlen 4 és 10 napos tumorból azonos sejtszámot átoltva ugyanolyan növekedési görbét kaptunk, azaz a proliferációs rátában eltérés nem volt. Ennek alapján feltételezhetjük, hogy amennyiben a daganatgátló szer egyformán hat a két különböző sejttrendszerre (azaz pl. ugyanolyan arányban pusztítja a sejteket), akkor a retranszplantáció után a növekedési görbék lefutása nem tér el egymástól, míg eltérés esetén a két sejtpopuláció érzékenysége közötti különbségre gondolhatunk.

A kezelt tumorsejtek retranszplantáció utáni növekedési görbéit mutatja be az 1. és 2. ábra, amelyek a növekedésgátlás regisztrálása mellett módot nyújtanak arra is, hogy a tumor repopulálódásának alakulását kísérhessük figyelemmel.

1.–2. ábra. Citosztatikumok hatása különböző korú (4 és 10 napos) NK/Ly ascites tumorra. (A tumor növekedésének 4. és 10. napján kezeltünk, majd 1 órával később  $10^7$  sejttel retranszplantációt végeztünk.)

(Kontroll	× ——— ×	○ ——— ○, + ——— +, ● ——— ●
R-74	8 mg/kg	20 mg/kg
R-52	500 mg/kg	1250 mg/kg
DBD	140 mg/kg	350 mg/kg
DMDAI	70 mg/kg	140 mg/kg
DAD	3 mg/kg	7.5 mg/kg
BCNU		40 mg/kg
CY	40 mg/kg	80 mg/kg
5-FU	100 mg/kg	500 mg/kg

A vizsgált szerek közül a *DBD* az alkalmazott dózisokban (140 és 350 mg/kg) a 10 napos tumor növekedését nem befolyásolta, míg a 4. napon kezelt és retranszplantált tumor a kezdeti (2. nap) gyorsabb — a kontrollhoz hasonló ütemű — proliferáció után dózisfüggő érzékenységet mutatott. Ez utóbbi görbék lefutása arra utal, hogy a *DBD* olyan sejtkárosodásokat idézhetett elő, amelyek csak bizonyos idő — pl. egy sejtciklus lezajlása után — vezettek a sejt pusztulásához vagy proliferációjának gátlásához. A *DBD* diepoxid származéka, a *DAD* nagy dózisban (7,5 mg/kg = LD50/2) a fiatalabb tumor sejtjeinek azonnali, az idősebb tumor növekedésének pedig elhúzódottabban jelentkező gátlását okozta. Kisebb dózis esetén jól megfigyelhető a 4 napos tumor sejtjeinek fokozottabb érzékenysége, melyek csupán a transzplantáció utáni 7. napon kezdenek el ismét proliferálni. A 10 napos tumor a retranszplantáció után a kontrollhoz hasonló növekedést mutatott. E szerekhez hasonlóan az 5-FU is a gyorsabban növekvő NK/Ly ascites tumort gátolta elsősorban. Mindkét korú tumornál a retranszplantációt követően átmeneti sejtszámemelkedés után a növekedési görbe „törése” következik be, amelyet a túlélő sejtek gyors proliferációja követ. Az említett „törést” feltehetően az ebben az időszakban bekövetkező kiterjedt sejtpusztulás okozza és ez jelzi, hogy az 5-FU által előidézett sejtkárosodás nem gyorsan, hanem elhúzódóan vezet a sejtanyagcsere irreverzibilis változásához. Hasonlóan elhúzódó hatásról számolt be az 5-FU okozta finomszerkezeti változások vizsgálatakor Lapis és Benedeky (1966).

A különböző korú tumorok kezelésénél lényegében egyforma daganatgátló hatást mutatott a *DMDAI*. A retranszplantált sejtek növekedése a 4. napig a különböző dózisok esetében hasonlóan mutatkozott és csak ezután figyelhettük meg a repopulálódás dózis-függő jellegét. Ugyancsak nem beszélhetünk proliferáció-függő hatásról Cyclophosphamiddal történt kezelés után sem. A növekedési görbék inkább a kezelt tumorsejtek lassabb ütemű proliferációjáról, mintsem kiterjedt pusztulásukról tanúskodnak. Hasonló jellegű növekedést figyelhettünk meg kifejezett proliferáció-függő hatás nélkül 8 mg/kg *R-74*-el történt kezelés után. Nagyobb dózis (20 mg/kg) adása esetében mindkét korú tumornál az átmeneti növekedést gátlás váltotta fel, melynek foka a 4 napos tumornál kifejezettebbnek mutatkozott.

*BCNU* 40 mg/kg-os dózisának hatására mind a 4, mind a 10 napos tumorból retranszplantált tumorsejtek száma a 2. napon jelentősen csökkent, azonban a repopulálódás ütemében már lényeges eltérések voltak. Míg a gyorsabban proliferáló 4 napos tumor esetében a kontrollhoz hasonló növekedési ütemet találtunk, addig a lassabban proliferáló 10 napos tumor sejtjei további proliferációra — az átmeneti összsejtszám emelkedéstől eltekintve — képtelenek voltak.

A 4. és 10. napon kezelt tumorok átoltása utáni 7. napon észlelt növekedésgátlást és ezek hányadosát a II. Táblázatban tüntettük fel. Ez a hányados

## II. Táblázat

Kemoterápiás szerek hatása különböző korú NK/Ly ascites tumorra

Szer	Dózis (mg/kg)	Növekedésgátlás <sup>+</sup>		Kor-faktor
		4. nap	10. nap	
DBD	140	46	5	0,11
	350	72	36	0,5
5-FU	100	82	11	0,13
	500	89	68	0,76
DAD	1,5	40	0	
	3,7	95	33	0,34
	7,5	98	95	0,96
Dimetilmyleran	10	76	54	0,71
Mannitolmustár	50	92	77	0,84
R-74	8	66	58	0,88
	20	94	88	0,93
DMDAI	70	60	77	1,28
	140	94	93	1,00
	350	100	100	1,00
Cyclophosphamide	40	26	40	
	80	81	69	0,85
Melphalan	0,6	33	56	1,69
	1,2	99	98	1,00
Metildimetán-sulfonát	10	71	99	1,39
BCNU	40	64	93	1,45
R-52	500	2	29	
	1200	4	24	

$$+ \text{Növekedésgátlás} = 1 - \frac{\text{összejtszám (kezelt)}}{\text{összejtszám (kontroll)}} \times 100$$

$$+ \text{Kor-faktor} = \frac{\text{növekedésgátlás (10 napos tumor)}}{\text{növekedésgátlás (4 napos tumor)}}$$

— amelyet „kor-faktor”-nak is nevezhetünk — 1,0-nél nagyobb, ha a szer elsősorban a lassabban proliferáló 10 napos, és 1,0-nél kisebb, ha a gyorsabban növekedő 4 napos tumort gátolja (Jeny és mtsai 1973, Kopper és mtsai 1973, Lapis 1974, Lapis és mtsai 1975). A vizsgált szerek a proliferáció-függő hatás tekintetében következőképpen viselkedtek:

— a citotoxikus hexitokok közül a DBD és DAD, valamint a DNS-szintézist gátló antimetabolit, az 5-fluorouracil jobban gátolta a 4 napos tumor proliferációját, mint a 10 naposét. Nem ilyen kifejezetten, de a gyorsabban növekvő tumort előnyösebben befolyásoló szernek mutatkozott az R-74, Dimetilmyleran és a Mannitolmustár.

— a két különböző tumor válaszreakciója azonosnak mutatkozott Cyclophosphamid és DMDAI esetében.

— a lassabban proliferáló 10 napos tumor növekedését kifejezettebben gátolta a BCNU, és hasonló de kevésbé élesen megnyilvánuló különbség mutatkozott a Metildimentsulfonát és Melphalan esetében.

Az alkalmazott kor-függő rendszerben az R—52 az alkalmazott dózisokban és kezelési időtartam (1 óra) után gátló hatást nem mutatott.

A kor-függő hatást mutató DBD és az azt nem mutató DMDAI esetében megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a 4 napos tumor érzékenysége 1, 6 és 24 órás kezelési periódusokat alkalmazva. DMDAI két különböző dózisát adtuk, és azt tapasztaltuk, hogy az eltérő kezelési intervallumok után retranszplantált tumorsejtek azonos rátával proliferálnak. Hasonló eredményeket kaptunk DBD-vel történt kezelés után is (III. Táblázat).

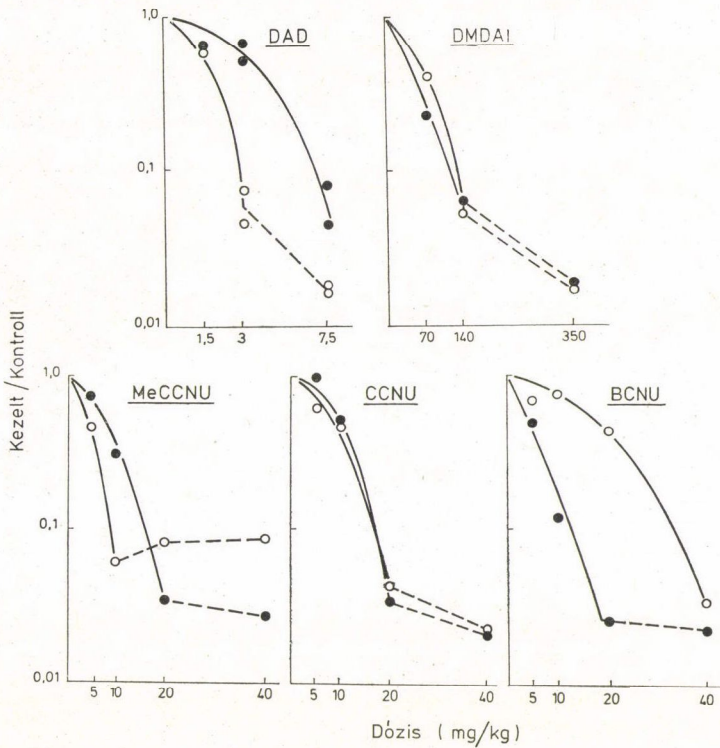
### III. Táblázat

*DMDAI és DBD hatása 4 napos NK/Ly ascites tumorra*

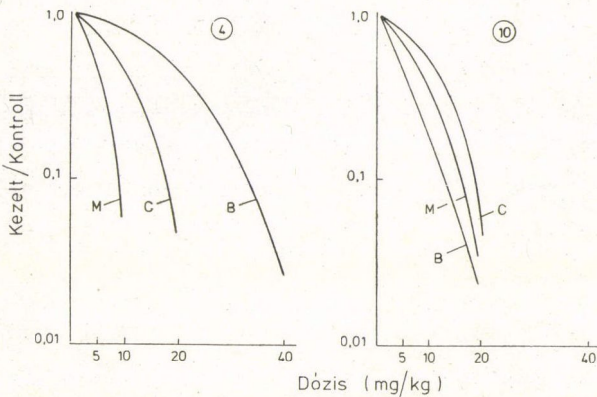
Szer	Dózis (mg/kg)	Kezelés tartama a retranszplantáció előtt (h)	Növekedésgátlás <sup>+</sup>
DMDAI	70	1	40,0
		6	43,0
	140	1	90,5
		6	81,0
		24	88,0
DBD	140	1	46,0
		6	36,0
		24	45,0

$$+ \text{Növekedésgátlás} = 1 - \frac{\text{Összsejtszám (kezelt)}}{\text{Összsejtszám (kontroll)}} \times 100$$

A 7. napon mért összsejtszám alapján számított növekedésgátlás, illetve kor-faktor jól jelzi, hogy a szer hatása mennyiben függ a tumorsejtpopuláció proliferációs ütemétől. További kísérleteinkben azonban olyan kiértékelési rendszert választottunk, amely még jobban tükrözi a szerek proliferáció-függő hatását. Ezeket a vizsgálatokat elsősorban a BCNU hatásának igazolására végeztük, tekintettel arra, hogy jelenleg igen kevés olyan daganatgátló szer ismeretes, amely a lassabban proliferáló tumor növekedését jobban gátolja, mint a gyorsabban proliferálóét. Annak eldöntésére, hogy ez a hatás csak a BCNU-ra vagy a nitrosoureákra általában jellegzetes-e, előbbi hatását összehasonlítottuk a CCNU és MeCCNU hatásával. A dózishatásgörbék (melyeknél a dózis függvényében a 7. napon mért növekedésgátlást tüntettük fel a kontroll százalékában) arra utalnak, hogy e három, szerkezetileg egymáshoz igen közelálló szer, eltérő módon befolyásolja a különböző sebességgel növekedő NK/Ly ascites tumort (3. ábra). A MeCCNU mérsékelten a 4 napos, a BCNU kifejezetten a 10 napos tumort gátolta jobban, míg a CCNU ilyen megkülön-



3. ábra. Citosztatikumok hatása a 4 (○)és 10 (●) napos NK/Ly ascites tumorra. (A függőleges tengelyen a növekedés-gátlást tüntettük fel, amelyet a retranszplantáció utáni 7. napon mért összsejtszám adatokból számítottunk).



4. ábra. Nitrosoureák hatása különböző korú NK/Ly ascites tumorra. (M = MeCCNU, C = CCNU, B = BCNU)

bőztetést nem mutatott. A három szer hatásának összehasonlításakor (4. ábra) jól látható, hogy a 10 napos tumort az alkalmazott dózis-tartományban a nitrosoureák lényegében egyformán befolyásolták, ugyanakkor a 4 napos tumor esetében már jelentős eltérések voltak, mégpedig a MeCCNU mutatta a legkifejezettebb, míg a BCNU a legenyhébb hatást.

### *Megbeszélés*

A tumorok és normál szövetek proliferációs aktivitása és hatóanyagokkal szembeni érzékenységük összefüggésének tanulmányozása, mind az újabb daganatellenes szerek előállítására, mind a már ismertek hatékonyabb — elsősorban kombinációkban történő — felhasználására szempontjából egyaránt fontosnak ítéltető meg.

Vizsgálataink során a proliferációs ütem és therápiás válasz összefüggésének tanulmányozását tűztük ki célul, testobjectumként NK/Ly ascites tumort használva. Előzőekben rámutattunk arra, hogy a tumor növekedési üteme transzplantációját követően fokozatosan lelassul, hasonlóan a solid tumorokhoz. Ellentétben azonban az utóbbiakkal, ahol a nem, vagy lassan proliferáló sejtek fokozódó aránya, illetve a sejtvészesség emelkedése felelős ezért a lassulásért, az ascites tumoroknál — így esetünkben is — a sejtciklus tartamának megnyúlása a döntő tényező (Lapis és mtsai 1973, Kopper és mtsai 1974, Jenei és mtsai 1975). Természetesen nemcsak a sejtciklus átlagos tartama, hanem a ciklusidő populáción belüli ingadozása is rendkívül megnő, jelezve az egyre lassabban proliferáló sejtek mind nagyobb részvételét. Az általunk használt rendszer esetében a daganatsejtek legtöbbször tehát sejtciklusban volt, azonban a választott sejtpopulációk (4 és 10 napos tumor) mind sejtkinetikai, mind biokémiai és morfológiai téren jelentősen eltértek egymástól.

Vizsgálati rendszerünk különbözik tehát az eddig zömmel alkalmazottaktól annyiban, hogy nem a proliferáló és nem-proliferáló sejtek érzékenységének összevetésére nyújt módot, hanem ugyanazon tumor életének különböző növekedési ütemét mutató szakaszait veti össze a kemoterápiás érzékenységgel (IV. Táblázat).

E megközelítési módot előnyösnek tartjuk elsősorban azért, mert a proliferáló és nem-proliferáló sejtek elkülönítése (és így a növekedési frakció meghatározása) különösen a daganatoknál nagymértékben függ az alkalmazott módszertől és még ma sem bizonyított, hogy nem-proliferáló sejtek egyáltalán léteznek-e. Valószínűbb, hogy a daganatsejtek a proliferációs ütem tekintetében igen széles eloszlást mutatnak és az igen lassan proliferálók nyerik el a „nyugvó” sejt elnevezést. Így olyan rendszerek alkalmazása, melyben gyorsan proliferáló sejtek érzékenységét hasonlítják össze biztosan nyugvó sejtekével (csontvelői stem-sejtek, G1-ben blokkolt sejtek, szövettenyészetek plateau-



## IV. Táblázat

*Daganatgátló szerek proliferáció-függő hatásának vizsgálatához használt rendszerek*

Szerző(k)	Proliferáló (gyorsan proliferáló)	Nem, vagy lassan proliferáló	Kezelés tartama	Kiértékelés módja
Bruce és mtsai (1966)	transzplantálható lymphoma	normál csontvelő	24 óra	CFU
Wilcoff és mtsai (1971)	L 1210 leukemia (in vitro) expo- nentiális fázis	L 1210 leukemia (in vitro) plateau fázis	különböző ideig	in vivo bioas- say (túlélés)
Valeriotte és Tolen (1972)	transzplantálható lymphoma	normál csontvelő	24 óra	CFU
van Putten és mtsai (1972)	normál csontvelő stimulálva sugár- depletioval	normál csontvelő	16 óra	CFU
Lin (1973)	B lymphocytá sti- mulálva birkavö- rösvértesttel	B lymphocytá	4 nap	PFU
Hagemann és mtsai (1973)	P 815×2 masto- cytoma (in vitro) expo- nenciális fázis (ascites) 2—5—10. nap (solid) 6—10—18. nap	P 815×2 masto- cytoma plateu fázis	15 perc	in vitro colonia
Barranco és mtsai (1973)	Chinese hamster ovarium (CHO) HA 1 sejtek	CHO HA 1 sejtek	1 óra	in vitro colonia
Hahn és mtsai (1974)	exponenciális fá- zis	plateu fázis		
Tobey és mtsai (1975)	Chinese hamster sejtek complett F 10 mediumban	CHO isoleucin-deficiens mediumban	2 óra	in vitro colonia
Kopper és mtsai	NK/Ly ascites tu- mor 4. nap	NK/Ly ascites tu- mor 10. nap	1 óra	in vivo bioas- say (összsejt- szám)

fázisa) feltehetően kevésbé tükrözik a tumorszövetben jelenlevő valódi vi-  
szonyokat, mint olyan rendszer, amelyben a sejtek proliferációs aktivitása  
eltérő ugyan, de nem az előbb említett szélsőséges módon.

A daganatgátló szerek proliferáció-függő hatásának vizsgálatokor nyert  
adatok összehasonlíthatóságának egyik fő problémája, hogy a különböző szerzők  
eltérő rendszereket és rendszerint változó kezelési időtaramokat alkalmaznak  
(IV. Táblázat), amely magyarázhatja azt, hogy egyes szerek a különböző  
csoportosításokban nem mindig azonos elbírálás alá esnek hatásuk proliferáció-  
függősége tekintetében. A kezelési időtartam szerepét tekintve Hahn és mtsai  
(1973) pl. kimutatták, hogy 2 órás cyclophosphamid, 5-FU és Bleomycin  
kezelés után a sejtpusztító hatás lényegesen nagyobb, mint 24 órás kezelést  
követően. Kísérleteinkben 1, 6 és 24 órás kezelés után vizsgáltuk a DBD és

DMDAI hatását, azonban e szereknél kezelési időtartamtól való függőséget nem észleltünk. Vizsgálataink során 1 órás kezelési időt választottunk elsősorban azért mert el akartuk kerülni, ill. csökkenteni a retranszplantáció előtti időszakban a repair-mechanizmusok működését. E rövid kezelés jogosságát támasztotta alá egyik korábbi megfigyelésünk is, mely szerint jelzett DBD és DAD már 10 perccel a kezelés után maximális beépülést mutatott az ascites tumorsejtekben (Kopper és mtsai 1975).

A citotoxikus hexitolok közül vizsgálati rendszerünkben az R-52 növekedést gátló hatást nem mutatott. Előzőekben kimutattuk, hogy ez a szer képes az NK/Ly és S<sub>37</sub>-ascites tumorok növekedését lassítani, a tumorsejtek átlagos ciklusidejét megnyújtani (Lapis és Kopper 1971). Elképzelhető, hogy a hosszan tartó kezeléssel szemben 1 órás kezelést követően csak kismértékű sejtpusztulás vagy sejtkárosodás jött létre, amely a retranszplantáció után a repopulálódás, illetve reparáció során gyorsan kompenzálódott. Az R-74 az alkalmazott dózisokban gátolta mindkét, de valamivel jobban a 4 napos tumor proliferációját. A gyorsabban növekedő tumorra kifejtett preferenciális hatás még jobban érvényesült a DBD-vel történt kezelés után. E proliferáció-függő hatással kapcsolatban érdemes megemlíteni, hogy a DBD a biokémiai vizsgálatok szerint erőteljesen kötődik a sejtosztódás szabályozásában feltehetően kulcs-szerepet játszó savanyú magi fehérjékhez (E. Inceptoris és mtsai 1974, Jeney és mtsai 1975). Ugyanakkor az is kimutatást nyert, hogy az NK/Ly ascites tumor növekedése során az egyes chromatin frakciók preferenciális jelölődésében különbségek mutathatók ki (Jeney és mtsai 1975). A DBD-hez hasonló hatást mutatott a savanyú magi fehérjékhez még erősebben kötődő DAD. A mind mezil-csoportokat, mind epoxid struktúrákat egyaránt tartalmazó DMDAI proliferáció-függő hatást nem mutatott, bár az alkalmazott dózisokban jelentősen gátolta a tumorsejtek növekedését. Hatásmechanizmusa nem ismert még pontosan. Csányi és Halász (1973) Yoshida s.c. sarcomában a DNS-szintézis gyors csökkenését észlelték a kezelést követően, míg Lapis és mtsai (1975) NK/Ly ascites tumorban a kezelés utáni korai időpontokban a jelölődési index és a mitózis index csökkenése mellett mind a DNS, mind az RNS szintézisének rátájában gátlást figyeltek meg.

A nem hazai előállítású szerek közül az 5-FU lényegesen jobban gátolta a gyorsabban proliferáló 4 napos tumort, mint a 10 napost. Ez a hatás várható volt, tekintettel arra, hogy az 5-FU a timidilát-szintetáze enzim gátlása révén a DNS szintézist, az S-fázisban levő sejteket blokkolja és mind a DNS-szintézis üteme, mind a jelölődési index a 4 napos tumorban magasabb, mint a 10 naposban. — A Cyclophosphamid lényegében egyformán befolyásolta a különböző korban kezelt tumorokat, ellentétben más megfigyelésekkel, melyek szerint a gyorsabban proliferáló tumorok érzékenyebbek e szerrel szemben, mint a lassabban növekvők (Bruce és mtsai 1966). A Cyclophosphamid hatása utóbbi esetben oly módon érvényesül, hogy elsősorban a proliferáló sejteket

gátolja, míg a nem-proliferálókat kevésbé vagy egyáltalán nem, és így terápiás effektusa a magas növekedési frakciójú tumoroknál a legkedvezőbb. Esetünkben az ascites tumorsejtek zöme proliferált, a növekedési frakcióban a 4 és 10 napos tumor között csak kis eltérés mutatkozott, ezért a Cyclophosphamid — pusztán sejtkinetikai megfontolásokról — jogosan mutatott hasonló gátló hatást a két különböző korú tumorban.

A szerkezetileg igen hasonló nitrosoureák e kor-függő rendszerben igen különbözőképpen viselkedtek. E vegyületeket potenciális alkiláló szereknek tekintik, ezért feltételeztük, hogy hatásuk közel egyformán érvényesül a különböző korú tumorokban. A dózishatás-görbék adatai azt mutatják, hogy a három szer elsősorban a 4 napos tumorra kifejtett gátlás tekintetében tért el egymástól. Feltételezhetjük, hogy a különbség háttérben a szerek okozta károsodás eltérő mértékű reparációja áll. Igen fontosnak látszik a BCNU lassabban proliferáló tumorra kifejtett preferenciális hatása, mivel ez a tulajdonság egyrészt lehetővé tenné az alacsonyabb növekedésű frakciójú (azaz nem vagy igen lassan proliferáló sejteket nagy mennyiségben tartalmazó) malignus tumorok jobb befolyásolását, másrészt a legtöbb rosszindulatú daganatoknál gyorsabban proliferáló normál szövetek (csontvelő, bél) és a tumor közötti szelektívebb sejtpusztító hatás elérését. Az irodalomban igen eltérő adatokat találunk a BCNU proliferáció-függő hatásával kapcsolatban. Egyes szerzők a lassan (Barranco és mtsai 1973), mások a gyorsan szaporodó sejtpopulációk fokozottabb BCNU érzékenységét figyelték meg (van Putten és mtsai 1972), míg Thacher és Walker (1968) ilyen eltérést nem találtak. Hagemann és mtsai (1973) a P815×2 mastocytoma sejtek szövettényészeti és ascites formáinál lassabban proliferáló tumor fokozott BCNU érzékenységét észlelték. Hahn és mtsai (1974) szerint *in vitro* viszonyok között a serumkoncentráció igen fontos tényező és pozitív irányban tolja el a terápiás hatást. Tobey és mtsai (1975) megerősítik a BCNU nyugvó sejtekre kifejtett előnyös hatását, de vitatják a Hahn és mtsai (1974) által feltételezett serumkoncentráció szerepét.

A dózishatás-görbéket analizálva feltűnik, hogy a görbéket az alacsonyabb dózisoknál megjelenő „váll” jellemzi, amely különösen kifejezett a DAD idősebb, valamint a BCNU fiatalabb sejtpopulációra gyakorolt hatásánál. Feltételezhető, hogy ez a jelenség a szerek okozta sublethális károsodás reparációját jelenti (Elkind és Sutton 1960), azonban feltűnő, hogy ez nemcsak a lassan proliferáló sejteknél található, mint azt van Putten és Lelieveld (1970, 1971) különböző alkiláló szerrel történt kezelés után is észlelte, hanem a gyorsabban proliferálóknál is, mint ahogy azt eredményeinkhez hasonlóan Hagemann és mtsai (1973) BCNU kezelés után találták gyorsan proliferáló szövettényészeti és ascites tumor sejteknél. További vizsgálatot igényel annak eldöntése, hogy a különböző növekedési rátájú sejtpopulációk repair-mechanizmusai azonosak-e vagy különböznek egymástól.

A kor-függő rendszeren végzett kísérleteink eredményeit összefoglalva, a szerek három csoportját különíthettük el:

- proliferáció-függést nem mutatók (Cyclophosphamid, DMDAI, CCNU)
  - a gyorsabban proliferáló tumort jobban gátlók (DBD, DAD, 5-FU, McCCNU)
  - a lassabban proliferáló tumort jobban gátlók (BCNU)
- (a többi vizsgált szerrel kapcsolatban a proliferáció-függés nem állapítható meg egyértelműen).

Vizsgálataink egyértelműen bizonyítják, hogy vannak olyan szerek, melyek hatását a sejtpopuláció aktuális növekedési sebessége lényegesen befolyásolta, míg másokét nem. Tekintettel arra, hogy emberi tumorok esetében is számolnunk kell a legkülönbözőbb proliferációs rátájú daganatokkal, ugyanazon daganaton belül különböző proliferációs aktivitású sejtpopulációkkal, a növekedési ráta spontán és mesterségesen előidézett (pl. terápiás beavatkozás) változásával, jogosan vetődik fel a szereknek a sejtproliferáció ütemétől függő hatásának fontossága.

Eredményeinkkel kapcsolatban sürgősen hangsúlyoznunk, hogy in vivo körülmények között az optimális kezelési séma, nemcsak az adott agens sejtkinetikai, hanem biokémiai, farmakológiai és toxikológiai jellegzetességeitől is függ, valamint ezeknek a normál és tumoros szövetet illető eltéréseitől. Természetesen nem várható, hogy a különböző kísérleti eredmények közvetlenül alkalmazhatók legyenek az optimális klinikai kezelés megtervezésére. Ennek egyik oka a kísérleti és human tumorok között fennálló különbség, melyek kiküszöbölésének vagy csökkentésének egyik módja lehet a human tumorok közvetlen vizsgálata. Ennek ellenére a klinikai gyakorlatban igen fontos lehet és számos esetben útmutatóul szolgálhat a kemoterápiás szerek kísérletesen meghatározott, különböző kezelési sémától és elvektől függő hatásának ismerete.

### Összefoglalás

Szerzők az NK/Ly ascites tumor növekedési üteme és kemoterápiás érzékenysége közötti összefüggést vizsgálják in vivo körülmények között ún. „kor-függő” rendszeren. A citosztatikussal történő kezelést 4 és 10 napos tumoron végezték, melyekről előzetesen kimutatták, hogy sejtkinetikai, biokémiai és morfológiai jellegzetességeik alapján egymáshoz viszonyítva relatíve gyorsan, illetve lassan proliferáló sejtpopulációknak felelnek meg. 1 órás kezelési időtartam után a sejteket új állatokba  $10^7$  sejttszámmal retranszplantálták és az újránövekedő tumorok proliferációs ütemét vizsgálták. A növekedés-gátlás meghatározására a retranszplantáció utáni 7. napon észlelt összsejttség értékeit használták. Eredményeik azt mutatják, hogy a citosztatikussal történő kezelés hatása különbözőképpen függ a daganat növekedési ütemétől:

- a) elsősorban a gyorsabban proliferáló tumorra fejtette ki hatását a DBD, DAD, 5-FU, MeCCNU,
- b) elsősorban a lassabban proliferáló tumort gátló a BCNU,
- c) nem mutatott proliferáció-függő hatást a Cyclophosphamid, DMDAI, CCNU.

## IRODALOM

- Barranco, S. C., Novak, J. K. és Humphrey, R. M.: *Cancer Res.* **33**, 691 (1973).
- Bhuyan, B. K., Scheidt, L. G. és Fraser, T. J.: *Cancer Res.* **32**, 398 (1972).
- Brown, J. M.: *Radiology* **114**, 189 (1975).
- Bruce, W. R., Meeker, B. E. és Valeriote, F. A.: *J. Natl. Cancer Inst.* **37**, 233 (1966).
- Charbit, A., Malaise, E. P. és Tubiana, M.: *Europ. J. Cancer* **7**, 307 (1971).
- Csányi, E. és Halász, M.: *Arzneim.-Forsch.* **23**, 961 (1973).
- Dombernowsky, P. és Hartmann, N. R.: *Cancer Res.* **32**, 2452 (1972).
- Elkind, M. M. és Sutton, H.: *Radiat. Res.* **13**, 556 (1960).
- Frindel, E., Malaise, E. P., Alpen, E. és Tubiana, M.: *Cancer Res.* **27**, 1122 (1967).
- Frindel, E., Malaise, E. és Tubiana, M.: *Cancer* **22**, 611 (1968).
- Gavosto, F.: *Cell Tissue Kinet.* **7**, 151 (1974).
- Hagemann, R. F., Schenken, L. L. és Leshner, A.: *J. Natl. Cancer Inst.* **50**, 467 (1973).
- Hahn, G. M., Gordon, L. F. és Kurkijan, S. D.: *Cancer Res.* **34**, 2373 (1974).
- Hahn, G. M., Ray, G. R., Gordon, C. F. és Kallman, R. F.: *J. Natl. Cancer Inst.* **50**, 529 (1973).
- Institoris, E., Holzinger, L. és Bánfi, D.: *Z. Krebsforsch.* **82**, 101 (1974).
- Jeney, A., Kopper, L., Lapis, K., Benedeczy, I. és Walkó, É.: The mode of action of cytotoxic hexitols on NK/Ly ascites tumour with different proliferative activities. 8th Internat. Congress of Chemotherapy, Athén (1973) Abstracts B-183.
- Jeney, A., Dzurillay, É., Lapis, K. és Institoris, L.: The role of nuclear proteins in the chemotherapeutic effect of Dibromodulcitol. 9th Internat. Congress of Chemotherapy, London (1975). Abstracts C-45.
- Jeney, A., Dzurillay, É., Kopper, L., Lapis, K.: Daganatos sejtpopuláció növekedésének tanulmányozása. II. Magi fehérjék vizsgálata gyorsan és lassan proliferáló NK/Ly ascites tumor sejtpopulációiban. *Orvostudomány* **27** (1976).
- Kopper, L., Jeney, A. és Lapis, K.: Effect of cytotoxic hexitols on ascites tumour with different growth rate. II. Meeting of EACR, Heidelberg (1973).
- Kopper, L., Jeney, A., Benedeczy, I., Lapis, K. és Takács, J.: *Orvostudomány* **25**, 19 (1974).
- Kopper, L., Lapis, K. és Institoris, L.: Incorporation of  $^3\text{H}$ -Dibromodulcitol and  $^3\text{H}$ -Dianhydrodulcitol into ascites tumor cells. Autoradiographic study. *Neoplasma* (megjelenés alatt).
- Lin, H.: *Cancer Res.* **33**, 1716 (1973).
- Lala, P. K. és Patt, H. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* **56**, 1735 (1966).
- Lapis, K. és Benedeczy, I.: *Acta Biol. Hung.* **17**, 199 (1966).
- Lapis, K. és Kopper, L.: *Morph. Ig. Orv. Szemle* **10**, 171 (1970).
- Lapis, K. és Kopper, L.: Studies on the mechanism of action of R-52 (1,2-5,6-tetra-O-methylsulphonyl-D-mannitol). *Fortschritte der Krebsforschung in den sozialistischen Ländern*, Verlag Theodor Steinkopff, Dresden, 173–186. (1971).
- Lapis, K., Jeney, A., Kopper, L., Szende, B. és Benedeczy, I.: *Arch. Geschwulstforsch.* **42**, 229 (1973).
- Lapis, K.: The effect of cytotoxic hexitols on the growth characteristic and cellular kinetics of tumour cell populations. XI. Internat. Cancer Congress. Firenze, Vol. 5. 288–293. (1974).
- Lapis, K., Jeney, A., Kopper, L., Szende, B. és Takács, J.: Theoretical basis for designing combination therapy with Dibromodulcitol (DBD). 9th Internat. Congress of Chemotherapy. London (1975). Abstracts C-16.
- Lapis, K., Kopper, L. és Benedeczy, I.: *Magyar Onkológia* **19**, 162 (1975).
- Mauro, F. és Medoc-Jones, H.: *Cancer Res.* **30**, 1397 (1970).
- Peel, S. és Fletcher, P. A.: *Europ. J. Cancer* **5**, 581 (1969).
- Schiffer, L. M., Nelson, J. S. R., Dilettuso, B., Migliorato, D. és Randolph, W.: *Cell Tissue Kinet.* **6**, 165 (1973).

- Shirakawa, S., Luce, J. K. és Tannock, I. F.*: J. Clin. Invest. **49**, 1188 (1970).  
*Simpson-Herren, L. és Lloyd, H. H.*: Cancer Chemother. Rep. **54**, 143 (1970).  
*Steel, G. G. és Hanes, S.*: Cell Tissue Kinet. **4**, 93 (1971).  
*Tannock, I. F.*: Cancer Res. **29**, 1527 (1969).  
*Terz, J. J., Curutchet, P. és Lawrence, W. Jr.*: Cancer **28**, 1100 (1971).  
*Thatcher, C. J. és Walker, I. G.*: J. Natl. Cancer Inst. **28**, 363 (1969).  
*Tobey, R. A. és Crissman, H. A.*: Cancer Res. **35**, 460 (1975).  
*Valeriotte, F. A. és Tolen, S. J.*: Cancer Res. **32**, 470 (1972).  
*van Putten, L. M. és Lelieveld, P.*: Europ. J. Cancer **6**, 313 (1970).  
*van Putten, L. M. és Lelieveld, P.*: Europ. J. Cancer **7**, 11 (1971).  
*van Putten, L. M., Lelieveld, P. és Kram-Idsenga, L. K. J.*: Cancer Chemother. Rep. **56**, 691 (1972).  
*Wiebel, F. és Baserga, R.*: Cell Tissue Kinet. **1**, 273 (1968).  
*Wilcoff, L. J., Lloyd, H. H. és Dumadge, E. A.*: Chemotherapy **16**, 44 (1971).  
*Young, R. C. és deVita, V. T.*: Cell Tissue Kinet. **3**, 285 (1970).  
*Zubrod, C. G.*: Cancer **30**, 1474 (1972).

## N- $\epsilon$ -<sup>3</sup>H-TRIMETIL-L-LIZIN FELVÉTELÉNEK VIZSGÁLATA NK/Ly ASCITES TUMOROS EGEREK SZERVEIBEN

LAPIS KÁROLY, az MTA levelező tagja, JENEY ANDRÁS, az orvostudományok kandidátusa, TYIHÁK ERNŐ, KOPPER LÁSZLÓ, SZARVAS TIBOR, BURSICS LÁSZLÓ, ÚJHELYI ESZTER és SZENDE BÉLA, az orvostudományok kandidátusa

Közlésre érkezett: 1976. V. 27.

Az élő szervezetekben kötött és szabad formában egyaránt előforduló N-metilezett, bázikus aminosavak (N- $\epsilon$ -metilezett lizinek, N<sup>C</sup>-metilezett argininek, imidazol-N-metilezett hisztidinek) biológiai funkciójáról még nagyon keveset tudunk (Paik és Kim 1971; Tyihák és mtsai 1976a). A legtöbb ismeretünk — az utóbbi évek biológiai vizsgálatai alapján — az N- $\epsilon$ -metilezett lizinek közé tartozó N- $\epsilon$ -trimetil-L-lizinről (L-lizin-betain; TML) van. Előző kísérleteinkben azt észleltük, hogy TML kezelés hatására a daganatos és nem daganatos sejtpopulációk ún. „nyugvó” állapotban levő sejtjeinek egy része a DNS-szintézis, majd a sejtosztódás fázisába kerül (Szende és mtsai 1970; Kopper és mtsai 1971; Stotz és mtsai 1974). Másik jelentős megállapítás az, hogy a biológiai fehérje-metilezés termékeként szabadon is előforduló TML-ből a zsírsav-anyagszerében különösen fontos szerepet játszó karnitin képződik (Tanphaichitr és Broquist 1973; Cox és Hoppel 1973; Villanueva és Lederer 1975).

A TML sejtproliferációt fokozó hatásában szerepet játszó tényezők közelebbi megismerése céljából tanulmányoztuk a <sup>3</sup>H-TML beépülését, megoszlását és átalakulását az NK/Ly ascites tumoros sejtekben.

A <sup>3</sup>H-TML-el végzett eddigi vizsgálatok kimutatták, hogy az egerek i.p. kezelését követő első két órában a beadott TML 70%-a kiürül és ezen belül a 80% pedig változatlan formában a vesén keresztül választódik ki. A TML clearance értéke az inulinhoz közel álló, mely arra utal, hogy az a tubulusokból nem reabszorbeálódik (Löwer és mtsai 1974).

### *Anyag és módszer*

*Metilezett lizinek előállítása:* 1,82 g L-lizin-hidrokloridot 18 ml vízben oldotunk és 660 mg bázikus réz-karbonát hozzáadása után keverés közben félórát 100 °C-on tartottuk. A reakcióelegyet lehűtöttük és 0 °C—5 °C között egyszerre becepegtettünk 12 ml 10%-os nátrium-hidroxid oldatot és 3,78 g dimetil-<sup>3</sup>H-szulfátot (fajlagos aktivitás 258,2 mCi/mmól) 45 perc alatt. Ezután

további 4 órát kevertettünk ezen a hőmérsékleten. A reakcióelegyet  $3 \times 30$  ml éterrel extraháltuk. A vizes fázist vízsugárvákuumban való szívatással étermentesítettük, majd Dowex 50 gyantaoszlopon vezettük át. Ezután 1000 ml vízzel mostuk a gyantaoszlopot, majd 2,5%-os ammónium-hidroxid oldattal eluáltuk — a rézionok a gyantán megkötődve maradtak. Az eluátumot 40—50 °C közötti hőmérsékleten vízsugárszivattyún bepárooltuk. 2,58 g sárga színű, olajos anyag maradt vissza, amelyet 3 ml vízben oldottunk és 2,9 g fumársav 50 ml alkoholos oldatának hozzáadásával a TML-fumarátot — egy éjszakai hűtőszekrényben való állás után — kiszűrtük. A nyert termék súlya: 1,85 g. O.p.: 142—145 °C. Fajlagos aktivitás: 221,35 mCi/mmól.

A nem radioaktív N- $\epsilon$ -metilezett lizineket [(N- $\epsilon$ -monometil-L-lizin HCl (MML), N- $\epsilon$ -dimetil-L-lizin HCl (DML), N- $\epsilon$ -trimetil-DL-lizin-2-HCl (TML)] szintézissel állítottuk elő (Puskás és Tyihák 1969; Benoiton 1964; Matsuoka 1972).

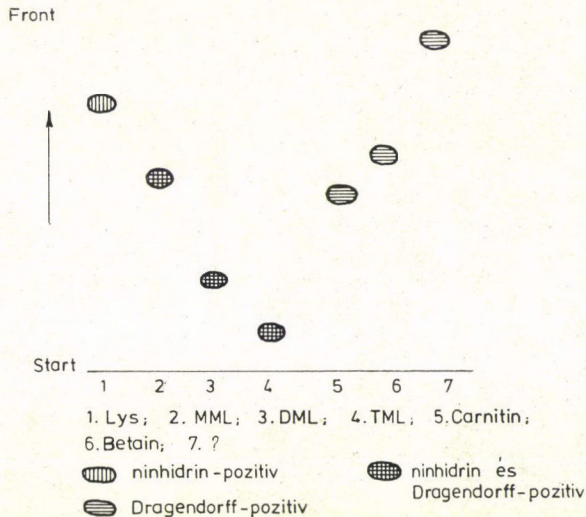
Az L-lizin HCl a REANAL Finomvegyszergyár (Budapest) és az L-carnitin HCl a PIERCE Chemical Co. terméke volt.

<sup>3</sup>H-TML vizsgálata sejtfrakciókban: NK/Ly ascites tumort  $5 \times 10^6$  sejt számmal i.p. transzplantáltunk CFLP nőtény egerekre, amelyeket préselt tápon (LATI) és csapvízen tartottunk. 8—10 nappal a transzplantáció után az állatokat 80 mg/kg <sup>3</sup>H-TML-el, fumarattal i.p. kezeltük, amely 58,16 mCi/kg-nak felel meg. Kísérleteinkhez összesen 120 egeret használtunk, a vizsgált időpontokban csoportonként 4—7 egeret gáznarkózisban megöltünk. Az eltávolított szerveket (agy, máj, csontvelő) és a lecentrifugált tumorsejteket hideg, 0,9% NaCl oldattal mostuk és nedvessúlyukat meghatároztuk.

Minden szövetből 0,1 g/ml-es szuszpenziót készítettünk fiziológias NaCl-oldattal, illetve a cytoparticulumok előállításához 0,25 M szacharozéval teflon fejes Potter-homogenizátorban. A tumorsejtekből Beckman L—2 ultracentrifugában differenciál-centrifugálással cytoparticulumokat állítottunk elő; további tisztítás nélküli magot 600xg-vel 10 percig, mitochondriumot 15 000xg-vel 20 percig, a mikroszómát 105.000xg-vel 60 percig ülepítettük. Kromatint és nukleoluszt *Bhorjee és Pederson* (1973) módszerével állítottunk elő. A homogenátumok és a cytoparticulumok feldolgozását *Scott* (1956) módszere szerint végeztük. A sorrendben hideg 0,5 N PCA-val (4 °C), alkohol-éter (3:1, v/v) elegyével, N NaOH—6 N HCl (5:1, v/v) elegyével, 0,5 N forró PCA-val (70 °C) és 0,1 N NaOH-val készített frakciók az alacsony molekulású anyagokat („poolt”), lipideket, RNS-t, DNS-t és fehérjéket tartalmazták. A radioaktivitását folyadék szcintillációs spektrométerrel (Beckman LS-100 C) mértük, toluol-2-etoxyetanol alapanyagú szcintillátor folyadékban, a dpm-re történő átszámítás a külső standard módszerrel történt (*Kopper és mtsai* 1976, *Higoshimura és mtsai* 1962). A fehérje-meghatározást *Lourey* (1951) módszerrel, míg a DNS-meghatározást *Burton* (1956) módszerével, az RNS-t pedig OD<sub>260</sub>-on mértük.



**Analitikai módszerek:** A <sup>3</sup>H-TML átalakulásának vizsgálatára az egyes szövet-frakciókat vékonyréteg-kromatográfiával vizsgáltuk 0,25 mm vastag Kieselgel (G) rétegen, amelyen desztillált vizet futtató szernek használva a metilált lizinek elkülöníthetők egymástól (Tyihák és mtsai 1976). A 13 cm-es futás után megszáritott rétegről centiméterenként — a futás irányára merőlegesen — a



I. ábra: Metilált-lizinek elválasztása vékonyréteg-kromatográfián.

Réteg: Kieselgel G. Futtatás: deszt. víz. Lys: L-lizin-HCl, MML: N-ε-monometil-L-lizin, DML: N-ε-dimetil-L-lizin, TML: N-ε-trimetil-DL-lizin-HCl.

rétegsávokat lekapartuk és a rétegorok radioaktivitását szcintillációs spektrométerrel mértük. A rétegsávokat 2 ml vízben szuszpendáltuk és a szuszpenziós Aerosol MA tartalmú szcintillátoroldatba vittük, és a radioaktivitást szcintillációs spektrométerben mértük (Szarvas és mtsai 1971).

Más esetekben a radioaktivitást mutató metabolitok kémiai természetének jellemzésére a réteget ninhidrin-reagenssel (0,2 g ninhidrin 80 ml metanol és 20 ml 96%-os ecetsav elegyében +0,05 g CuSO<sub>4</sub> 5 H<sub>2</sub>O; 100 °C-on melegítés 10 percig), vagy etilacetát tartalmú Dragendorff-reagenssel (Tyihák és Vág-ujfalvi 1970, Tyihák 1975) fújtuk be (1. ábra).

### Eredmények

#### A <sup>3</sup>H-TML aktivitásának eloszlása NK/Ly ascites tumoros egér különböző szerveinek frakcióiban

Az I. táblázat a radioaktivitás változását mutatja a <sup>3</sup>H-TML kezelés utáni különböző időpontokban az NK/Ly ascites tumorsejtben és annak kémiai frakcióiban. Az egész sejt vizsgálatakor legnagyobb radioaktivitást a kezelés

utáni második órában észleltünk, ezzel szemben a DNS és a fehérje frakcióban a kezelés utáni 6. órában volt a maximális beépülés. A 48 órás megfigyelési idő alatt az egyes frakciók radioaktivitásának a csökkenése eltérő képet mutatott. A kezelés utáni 2. órától kezdve a hideg perklorásvval extrahálható ún. „pool” frakció állandóan csökkent, ugyanakkor a lipid frakcióban a 24. óra, a nuklein-

## I. Táblázat

Radioaktivitás időbeli változása  $^3\text{H-TML}$ -el kezelt NK/Ly tumoros sejtekben

Idő [órában]	0,5	2	6	12	24	48
Frakció						
Savban oldódó	4 893 000 ±1 731 360	14 311 960 ±1 731 360	2 214 580 ±727 500	738 320 ±96 500	392 760 ±61 750	158 360 ±24 726
Lipid	148 680 ±80 075	616 760 ±201 080	87 760 ±25 750	42 080 ±9 825	27 880 ±7 800	30 200 ±12 400
RNS	28 585 ±8 750	145 040 ±1 600	53 580 ±20 200	21 880 ±3 900	21 520 ±2 245	22 560 ±10 800
DNS	26 660 ±11 800	10 380 ±350	32 600 ±14 675	14 060 ±4 635	13 560 ±6 850	14 560 ±8 100
Fehérje	19 670 ±8 200	14 475 ±1 275	21 000 ±5 850	11 400 ±3 270	8 585 ±1 970	8 220 ±4 020
Összesen	5 116 595 ±1 930 000	15 098 615 ±1 927 505	2 409 520 ±240 750	827 740 ±96 500	464 305 ±54 000	238 900 ±46 200

Megjegyzés: 25–30 g súlyú CFLP nőstény egereket  $5 \times 10^6$  NK/Ly ascites tumorrall transzplantáltunk. 10 nappal később 80 mg/kg  $^3\text{H-TML}$ -el i. p. kezeltük őket (részletesebben lásd Anyag és módszer fejezetben). Időpontenként 4–6 állatból történt a radioaktivitás meghatározása. Eredményeket 1 g nedves súlyú tumorra vonatkoztatva dpm-ben fejeztük ki. ± = S. E.

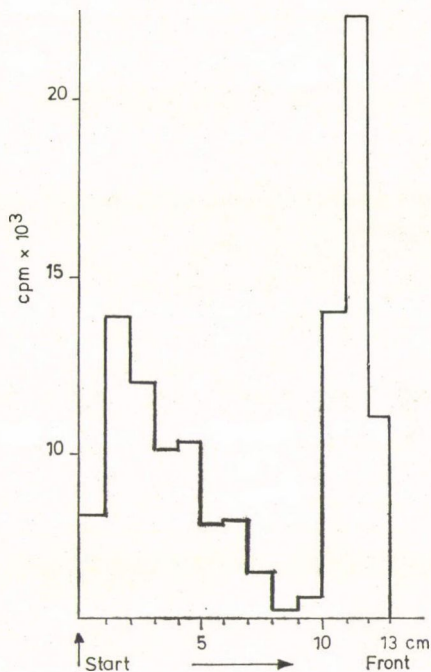
sav és fehérje frakciókban pedig 12. óra után már gyakorlatilag nem változott a radioaktivitás. A sejtekben levő radioaktivitás túlnyomó része a vizsgált időpontok mindegyikében a PCA-ban oldódó, ún. pool frakcióban található, tehát szabad formában, makromolekulához nem társultan. A savban nem oldódó csapadékból az egymást követő kivonásokkal előállított lipidek, nukleinsavak és fehérjék a sejtekben levő összes radioaktivitásnak egyre kisebb százalékát tartalmazzák. Ezért arra lehetne gondolni, hogy a TML a sejtekben kizárólag szabad formában van jelen és a makromolekulához csak adszorbeálódhatnak, így a TML-t csak szennyezésként tartalmazzák. A makromolekulákat tartalmazó frakciókban észlelt kis mennyiségű aktivitás azonban mégsem tekinthető kizárólag a savban oldódó frakció nem kielégítő eltávolítása miatti maradéknak, mivel a kezelési idő előrehaladtával a makromolekulához társult radioaktivitás viszonylagosan emelkedik, továbbá az egyes frakciók radiokromatográfiai vizsgálata eltérő szerkezethez tartozó radioaktivitásra utal (II. táblázat, 2, 3, 4, 5, 6. ábra).

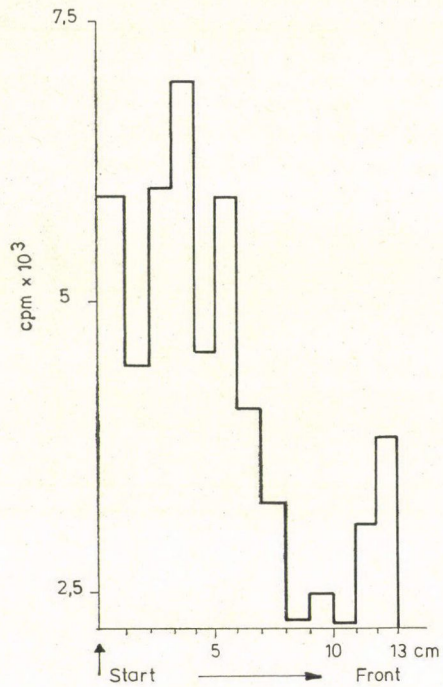
## II. Táblázat

<sup>3</sup>H-TML százalékos megoszlása máj, agy, csontvelő és NK/Ly ascites tumor sejtfraekciói között

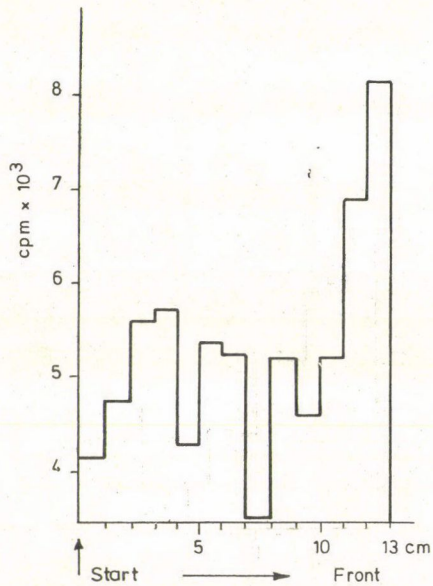
Szövet	Jelzési idő órában	Savban oldódó	Lipid	RNS	DNS	Fehérje	Összesen
Máj	0,5	96,13	3,10	0,43	0,08	0,20	100%
	2,0	95,50	3,15	1,10	0,10	0,10	100%
	6,0	93,64	4,88	0,59	0,23	0,60	100%
	24,0	91,26	6,32	0,88	0,24	1,21	100%
Agy	0,5	94,97	4,42	0,38	0,08	0,13	100%
	2,0	93,95	4,67	0,54	0,29	0,54	100%
	6,0	91,70	6,64	0,88	0,18	0,50	100%
	24,0	88,18	8,26	1,52	0,31	1,69	100%
Csontvelő	0,5	98,02	1,60	0,24	0,10	0,04	100%
	2,0	97,00	3,75	0,24	0,48	0,30	100%
	6,0	88,39	3,75	1,75	6,21	1,95	100%
	24,0	73,94	12,23	2,56	9,82	1,43	100%
NK/Ly tumor	0,5	95,66	2,89	0,55	0,52	0,38	100%
	2,0	94,78	4,11	0,96	0,06	0,09	100%
	6,0	92,00	3,53	2,22	1,33	0,92	100%
	24,0	84,55	6,00	4,65	2,93	1,87	100%

Megjegyzés: Kezelés és feldolgozás ugyanúgy, mint az I. táblázatban feltüntetett kísérletben

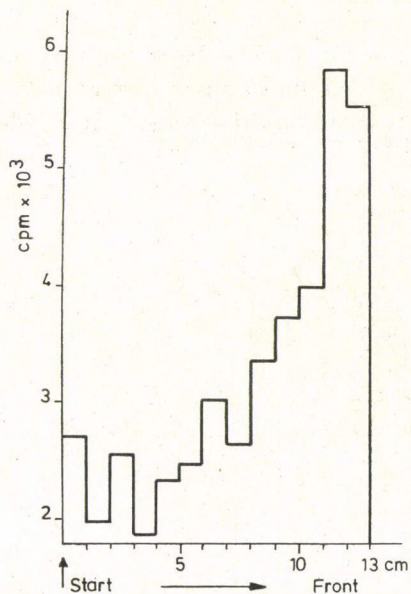
2. ábra: NK/Ly ascites tumorsejtek hideg Perklórsavas kivonatának rádiokromatogramja a <sup>3</sup>H-TML kezelést követő 2. órában. Réteg: Kiesegel G. Futtatás: deszt. víz.



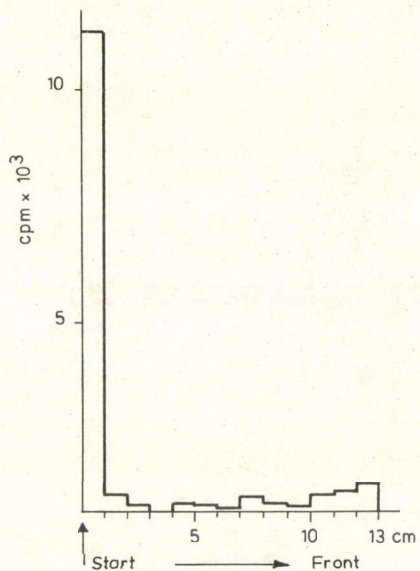
3. ábra: NK/Ly ascites tumorsejtek alkohol-éteres kivonatának rádiokromatogramja a <sup>3</sup>H-TML kezelést követő 2. órában. Réteg: Kieselgel G. Futtatás: deszt. víz.



4. ábra: NK/Ly ascites tumorsejtek RNS-t tartalmazó kivonatának rádiokromatogramja a <sup>3</sup>H-TML kezelést követő 2. órában. Réteg: Kieselgel G. Futtatás: deszt. víz.



5. ábra: NK/Ly ascites tumorsejtek DNS-t tartalmazó kivonatának rádiokromatogramja a <sup>3</sup>H-TML kezelést követő 2. órában. Réteg: Kieselgel G. Futtatás: deszt. víz.



6. ábra: NK/Ly ascites tumorsejtek fehérjét tartalmazó kivonatának rádiokromatogramja a <sup>3</sup>H-TML kezelést követő 2. órában. Réteg: Kieselgel G. Futtatás: deszt. víz.

A  $^3\text{H-TML}$  közel azonos mértékben épült be a különböző szövetekbe. Jelentős eltérést csupán a vese és az agyszövet vizsgálatakor észleltünk, mivel az előbbiben nagyobb, az utóbbiban pedig kisebb volt a beépülés, mint a többi szövetben (máj, lép, tüdő). Az egyes szövetekből előállított frakciók közötti radioaktivitás-megoszlás tekintetében azonban a különböző szövetek eltérő képet mutattak, amely különösképpen két proliferáló (tumor, csontvelő) és két nem-proliferáló (máj, agy) összehasonlításakor szembetűnő.

### III. Táblázat

*A radioaktivitás százalékos megoszlása a  $^3\text{H-TML}$ -el *in vivo* kezelt NK/Ly ascites tumor cytoparticulumaiban*

Frakciók	Savban oldódó		Nukleinsav		Fehérje	
	1 óra	24 óra	1 óra	24 óra	1 óra	24 óra
Mag	0,99	3,2	4,2	25,8	16,8	35,5
Mitochondrium	5,30	3,6	35,0	33,9	16,7	30,7
Microsoma	0,77	1,9	30,5	27,7	21,9	19,1
Hyaloplasma	92,90	91,3	30,3	12,6	44,6	14,7
Összesen:	100%	100%	100%	100%	100%	100%

*Megjegyzés* NK/Ly ascites tumoros egereket (CFLP 20—25 g nőstény) 10 nappal a transzplantáció után 80 mg/kg  $^3\text{H-TML}$  i. p. kezeltük és a cytoparticulumokat az Anyag és módszer fejezetben leírtak szerint vizsgáltuk.

A II. táblázaton feltüntetett kísérleti adatok áttekintésekor látható, hogy a kezelési idő előrehaladtával a csontvelőben és az NK/Ly ascites tumorban jobban emelkedett a makromolekulákhoz (kötött) társult radioaktivitás relatív százaléka, mint a májban és az agyban. A máj- és agyszövet esetében a fehérje frakció, míg a csontvelőben és a tumorban a fehérje és a nukleinsavakat tartalmazó frakciók mutatták a legnagyobb mértékű relatív felhalmozódást. Különösképpen kiemelendő a csontvelő DNS-t tartalmazó frakciója, amelyben a radioaktivitás relatív tartalma 24 óra alatt közel százszorosára emelkedett.

A következő kísérletben megvizsgáltuk a szabad és kötött formában levő radioaktivitás megoszlását a differential centrifugálással előállított egyes cytoparticulumok között (III. táblázat). Az NK/Ly ascites tumor  $^3\text{H-TML}$  kezelését követő 1. és 24. órában a savban oldódó frakció 91—93%-át a 105.000xg felülúszóban, tehát a hyaloplasmában találtuk. A fennmaradó 7—9% legnagyobb része a mitochondriumban volt, azonban ez nagyobb hányadot képviselt a kezelés utáni első órában, mint a 24. órában, mivel a mag és a microsoma savban nem oldódó radioaktivitása ezen megfigyelési idő alatt relatíve emelkedett. A forró perklórsavas frakció, amely az RNS-

és a DNS-t tartalmazza, az 1 órai kezelés után egyenlően oszlott meg a mitochondrium, mikroszoma és a hyaloplasma között és csak kis hányada (4,2%) volt a magban. Ez a megoszlás feltűnően megváltozott a kezelés utáni 24. órára, mivel a magban lényegesen emelkedett, a hyaloplasmában pedig csökkent a forró perklórsavval kivonható radioaktivitás relatív mennyisége. Hasonlóképpen a fehérjéhez társult radioaktivitás is eltérő megoszlást mutatott a <sup>3</sup>H-TML kezelés utáni 1. és 24. órában; korai időpontban a hyaloplasma,

#### IV. Táblázat

Radioaktivitás időbeli változása <sup>3</sup>H-TML-el kezelt NK/Ly ascites tumor nukleolus és chromatin nukleinsav frakcióiban

Idő	Nucleolus dpm/OD <sub>200</sub>	Chromatin dpm/OD <sub>200</sub>
30'	79,7 ± 23,9	138,0 ± 36,3
2 óra	136,5 ± 46,8	217,6 ± 38,7
6 óra	445,6 ± 60,8	329,6 ± 60,0
12 óra	396,2 ± 94,9	389,6 ± 33,0
24 óra	645,5 ± 84,7	100,0 ± 32,2

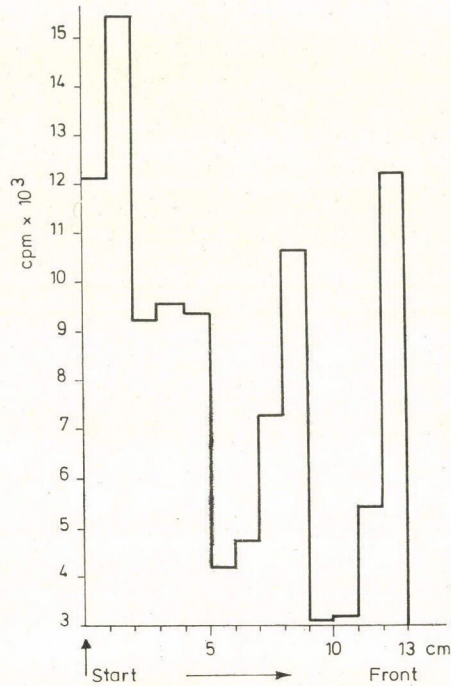
± = S. E.

a későbbiben pedig a mag tartalmazta a sejtben levő fehérjékhez társult radioaktivitás legnagyobb részét.

Mint hogy a sejtmag nukleinsav frakciója (forró PCA) mutatta a radioaktivitás legnagyobb mértékű relatív emelkedését (hatszoros), részletesebben tanulmányozni kívántuk a nukleolusz és a kromatin nukleinsav frakcióinak radioaktivitását különböző ideig tartó <sup>3</sup>H-TML kezelés után (IV. táblázat). Megállapítottuk, hogy a kezelést követő 2. óráig a kromatin nukleinsav frakciójának specifikus aktivitása nagyobb, mint a nukleoluszé. A 6. órában azonban a nukleoluszban ugrásszerűen emelkedik a radioaktivitás és még a 24. órában is további emelkedés volt tapasztalható. Ezzel szemben a kromatin nukleinsav frakciója a 12. órában észlelt legmagasabb érték után a 24. órára már a 30 perces érték szintjére csökkent.

Továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a <sup>3</sup>H-TML kezelés után az egyes sejtfrakciókban észlelt radioaktivitás a TML-ből vagy annak átalakulási termékéből származik. A TML és a vele rokon vegyületek kimutatására Kieselgel (G) réteget alkalmaztunk, amelyen desztillált vizes futtatással a lizin és a három N-ε-metilézett származéka jól elkülöníthető. Ebben a rendszerben a TML a start felett, a karnitin pedig 0,5 R<sub>F</sub> értéknek megfelelő helyen jelentkezik. Egyébként az összes többi aminosav a rétegekromatográfiás rendszerben a rétegző felső harmadában helyezkedik el (1. ábra).

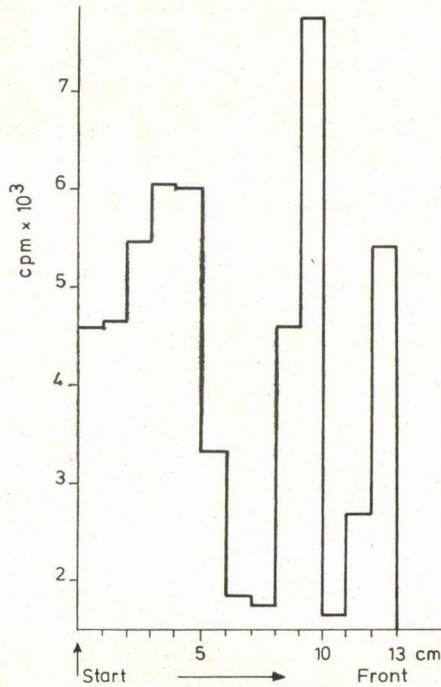
Megállapítottuk, hogy a savoldható frakcióban, mely a sejt összes aktivitásának 84—94%-át tartalmazza,  $^3\text{H}$ -TML mellett nagy mennyiségben más vegyületek is kimutathatók, ezek közül feltűnőnek tartjuk azt, amelyik radioaktivitást 0,75—0,85  $R_F$  értéktartományban mutat, továbbá Dragendorff pozitív és Ninhydrin negatív reakciót ad (2. ábra). A lipid, RNS és DNS



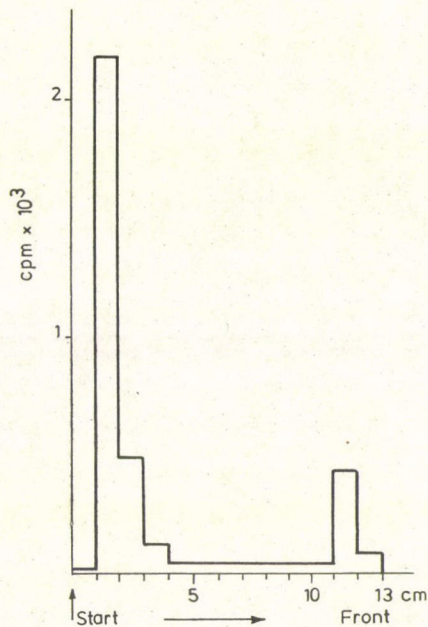
7. ábra: A sejtmentes ascites folyadék rádiokromatogramja a  $^3\text{H}$ -TML kezelést követő 2. órában. Réteg: Kieszelgel G. Futtatás: deszt. víz.

frakciók rétegekromatogramjai nagyon vátozatos képet mutattak, s a pontos azonosításokhoz további vizsgálatok szükségesek. A sejtek fehérje frakciójának lúgos vagy savas hidrolizátumában a radioaktivitás a TML-nek megfelelő helyen jelentkezett a radiokromatogramon (6. ábra). Az ascites folyadék, szérum és a vizelet vizsgálatakor a  $^3\text{H}$ -TML változatlan formában kimutatható volt. Az ascites folyadékban és a szérumban a TML mellett egyéb radioaktivitást adó vegyületeket is találtunk, amelyek mennyisége meghaladta a TML-ét. Ezzel szemben a vizeletben a radioaktivitás elsősorban TML formájában található és a 0,18, ill. 0,85  $R_F$  értékű átalakulási termékek csak kis hányadát képviselték a radioaktivitásnak (7., 8., 9. ábra). A vészsérum és a vizelet eltérő radiokromatogramja arra utal, hogy a TML metabolitjai sokkal jobban reabszorbeálódnak a vesékből, mint a TML.





8. ábra: Szérum rádiokromatogramja a <sup>3</sup>H-TML kezelést követő 2. órában.  
Réteg: Kieszelgel G. Futtatás: deszt. víz.



9. ábra: Víziet rádiokromatogramja a <sup>3</sup>H-TML kezelést követő 2. órában.  
Réteg: Kieszelgel G. Futtatás: deszt. víz.

### Megbeszélés

Előző vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy TML kezelés utáni második órában az NK/Ly ascites tumorsejtek nukleolaris RNS szintézise fokozódik, a nukleoluszok megnagyobbodnak és számuk megnő. A DNS szintézis fokozódása a TML adagolás utáni 18., a mitózisok számának emelkedése pedig a 24. órában volt észlelhető (Szende és mtsai 1976).

A  $^3\text{H}$ -TML-el végzett vizsgálatainkkal újabb adatokat kívántunk szerezni a sejtproliferációt stimuláló hatású TML hatásmódjára vonatkozóan.

A  $^3\text{H}$ -TML átalakulásáról Löwer és mtsai számoltak be a közelmúltban (Löwer és mtsai 1972, 1974, 1975), akik azt találták, hogy emberekben az i.v. adott  $^3\text{H}$ -TML jelentős része 2 óra alatt változatlan formában a vizelettel kiürül, ugyanakkor kutyában és egérben a MML és a DML nagyon jelentős katabolizmusát figyelték meg.

Jelen vizsgálataink, amelyeket a metil csoportban jelzett TML-el végeztünk, rámutatnak a TML gyors átalakulására és a radioaktivitás megoszlásának időbeli változására az egyes sejtfrakciókban.

A TML-ből származó radioaktivitás legnagyobb része (80—90%) a sejt hyaloplasmájában és szabad formában található. A TML fő átalakulási terméke Dragendorff pozitív és Ninhydrin negatív reakcióval jellemezhető, továbbá a metilezett lizinektől és a carnitintől eltérő  $R_F$  értéket mutat. Így feltételezhető, hogy a TML átalakulásában meghatározó szerepet játszó tényezők (enzim?) az  $-\text{NH}_2$  csoport oldalán, előbb dezaminálással, majd az ún.  $\beta$ -oxidációval hasítják a molekulát, a kvaterner csoportot hordozó molekularész pedig érintetlenül marad. Több szerző hasonló megfigyelésről számolt be mikrobákon, állati és emberi szöveteken végzett vizsgálatok alapján (Tanphaichitr és Broquist 1973; Cox és Hoppel 1973; Villanueva és Lederer 1975; Löwer és mtsai 1975). Ezen átalakulási termékek valószínűleg igen reaktív jelleggel rendelkeznek s elképzelhető kötődésük a makromolekulákhoz vagy részvételük a biológiai metilezésben. Erre utal egyébként az, hogy míg a 48 órás vizsgálati periódusban a szabad formában levő radioaktivitás (savban oldódó frakció) a maximális értékről 1%-ra csökken, addig a makromolekulát tartalmazó frakciókban ez a csökkenés lényegesen kisebb mértékű (lipid = 5%-ra, RNS = 15%-ra, DNS = 45%-ra, fehérje = 39%-ra). Ez a különbség nem magyarázható kizárólag az egyes frakciók eltérő retineáló képességével vagy lebomlásával, mivel a DNS és a fehérje frakcióban a maximális beépülés később következett be, mint a savban oldódó frakció esetében. A sejtmag kromatin és nukleolusz nukleinsav-frakciójának a vizsgálata a metil csoportok kötődésének abszolút emelkedésére szolgáltatott bizonyítékot. Ezen adatok alapján arra lehet gondolni, hogy a hyaloplasmában szabad formában levő „TML-metabolitok” a kezelési idő előrehaladtával, bár elsősorban az extracelluláris térbe jutnak, egy részük reakcióba lép a sejt különböző makromole-

kuláival. Ennek következtében a makromolekuláris frakciók (lipid, nukleinsav, fehérje) az egész sejtben levő raktárak nagyobb hányadát képviselik a TML kezelés későbbi időpontjaiban, mint a korábbiakban. A cytopartikulumok vizsgálata során arra a következtetésre jutottunk, hogy ez a felhalmozódás, amely a hyaloplazma terhére történik, a sejtmag és mitochondrium fehérje frakciójában, de legkifejezettebben a sejtmag nukleinsav frakciójában érvényesül. Az egyes sejtfrakciókban észlelt radioaktivitás eltérő kromatográfiás viselkedése különböző TML metabolitokra, illetve különböző molekulákhoz való kötődésre utal. A lipid frakcióban a carnitin jelenlétét valószínűsíti a radiokromatográfiás kísérletben végzett megfigyelésünk.

Löwer és mtsai (1974) arra a következtetésre jutottak, hogy a TML a fehérjékbe nem épül be, illetve annak mértéke 1% alatt volt. Rövid idejű <sup>3</sup>H-TML kezeléskor mi is igen alacsony radioaktivitást mértünk a makromolekulákat tartalmazó frakciókban. A kezelési idő előrehaladtával azonban már lényegesen megnőtt a sejtben levő <sup>3</sup>H-TML-ből származó radioaktivitás kötött, tehát makromolekulákhoz társuló formában levő hányada.

Feltűnőnek tartjuk, hogy amikor a savban oldódó ún. „pool” frakcióban <sup>3</sup>H-TML-t változatlan formában csak kis mennyiségben tudunk kimutatni, a fehérje frakciók savas vagy lúgos hidrolizátumának kromatogramja TML jelenlétére mutatott rá. Ennek okát pontosan nem ismerjük, a megfigyelés elemzésénél két lehetőséget kívánunk figyelembe venni: a) A sejtbe jutott TML kis hányadát a fehérjeszintetizáló-rendszer gyorsan hasznosítja, azaz a polypeptid láncba beépül, míg a TML molekulák nagy része metabolizálódik vagy változatlan formában kiürül. b) A TML kezelés után a TML metabolitok metilezik a már szintetizálódott fehérjék —NH<sub>2</sub> csoportjait. Mindkét lehetőségnél figyelembe veendő az, hogy a rétegekromatográfiás vizsgálatokat a 2. órában vett szövetminták kivonataival végeztük, s akkor a fehérje frakciókban csak TML-t találtunk. Lehetséges, hogy a fehérje frakcióknál tapasztalt elhúzódó beépülés viszont TML-metabolitok metilezésével állhat összefüggésben.

Bár vizsgálataink célját képezi, munkánk jelenlegi szakaszában nem tudjuk megállapítani, hogy a TML biológiai hatása az eredeti molekulának vagy átalakulási termékének tulajdonítható, továbbá hogy ez a hatás melyik sejtanyagcsere-út befolyásolásán keresztül jön létre. A TML proliferációt serkentő biológiai hatásával összefüggésben állhat az, hogy a gyorsan proliferáló esontvelő és tumorsejtek makromolekulái jobban visszatartják, illetve idővel többet építenek be a TML-ből, ill. annak metabolitjaiból, mint a nem-proliferáló máj- és agyszövet sejtjei. Ezen megfigyelés kapcsolatban állhat azzal, hogy a gyorsan proliferáló daganatos sejtek DNS-ében a metilált bázisok előfordulásgyakorisága igen magas (Désai és mtsai 1971). A metilációkban részt vevő makromolekulák (DNS, fehérjék) közelebbi megismerése és azok metileződésének a sejt proliferációjában betöltött jelentőségének a részletes tanulmányozása jelenleg folyó kutatásaink tárgyát képezik.

## Összefoglalás

Előző vizsgálatainkban azt észleltük, hogy a N- $\epsilon$ -Trimethyl-L-lysin (TML) a sejt proliferációját daganatos és normál sejtpopulációkban fokozni képes. Jelen tanulmányunkban megvizsgáltuk, hogy a  $^3\text{H}$ -TML milyen mértékben épül be az NK/Ly ascites tumoros állatok egyes szerveibe, és hogyan oszlik meg a különböző makromolekulákat tartalmazó sejtfrakciók, valamint a differenciál-centrifugálással nyert cytoparticulumok között. A  $^3\text{H}$ -TML átalakulását vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel követtük. Megállapítottuk, hogy a radioaktivitás legnagyobb része a hyaloplasmában, mégpedig a makromolekulákat nem tartalmazó frakcióban található. A TML igen jelentős része a sejtekben gyorsan metabolizálódik és főként ninhydrin negatív és Dragendorff-pozitív természetű anyag képződik. Emellett azonban mindegyik makromolekulás frakcióban radioaktivitás volt észlelhető, amelyek közül jelentősnek tartható az, hogy a fehérjék hidrolizátumában radioaktívan jelzett trimethyllysin is kimutatható volt. A kezelési idő előrehaladtával a sejtben maradt radioaktivitás egyre nagyobb hányada volt található a makromolekulákhoz kötött állapotban, különösen figyelemre méltó a sejtmag nukleoluszában az emelkedés.

Kísérleteinkkel első bizonyítékát szolgáltatottuk a methylezett lysinek makromolekulákhoz való kapcsolódásának és gyors sejtben belüli átalakulásának.

## IRODALOM

- Benoiton, L.: Can. J. Chem. **42**, 2043 (1964).  
 Burton, K.: Biochem. J. **62**, 315–323. (1956).  
 Bhorjee, J. S. és Pederson, T.: Biochemistry **12**, 2767. (1973).  
 Cox, R. A. és Hoppel, C. L.: Biochem. J. **136**, 1083. (1973).  
 Desai, L. S., Wulff, U. C. és Foley, G. E.: Exptl. Cell. Res. **65**, 260–263. (1971).  
 Higashimura, T., Yamada, O., Nohara, N., Shidei, T.: Intern. J. Appl. Radiation Isotopes **13**, 308. (1962).  
 Kopper, L., Szende, B., Lapis, K. és Tyihák, E.: Neoplasma **18**, (1971).  
 Kopper, L., Jeney, A., Ferencz, G., Lapis, K. és Szende, B.: Z. Krebsforschung **85**, 117–124. (1976).  
 Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, L., Randall, R. J.: J. Biol. Chem. **193**, 265. (1951).  
 Löwer, R., Lange, H. W. és Hempel, K.: Clin. Chim. Acta **58**, 155. (1975).  
 Löwer, R., Lange, H. W. és Hempel, K.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **353**, 1545. (1972).  
 Löwer, R., Lange, H. W. és Hempel, K.: Pflügers Arch. **347**, 159. (1974).  
 Matsuoka, Y.: Seikagaku **44**, 353. (1972).  
 Paik, W. K. és Kim, S.: Science **174**, 114. (1971).  
 Puskás, J. és Tyihák, E.: Periodica Polytechnica, chem. Ingenieurwes. **13**, 261. (1969).  
 Scott, J. P., Frascastoro, A. P. és Taft, E. B.: J. Histochem. Cytochem. **4**, 1. (1956).  
 Stotz, Gy., Szende, B., Lapis, K. és Tyihák, E.: Exp. Pathologie **9**, 317–322. (1974).  
 Szarvas, T., Ömböly, Cs., Végh, G.: Radioisotopy **12** (5) 779. (1971).  
 Szende, B., Tyihák, E., Kopper, L. és Lapis, K.: Neoplasma **17**, 433. (1970).  
 Szende, B., Benedeczky, I., Jeney, A., Lapis, K.: Proc. Sixth Internat. Symp. on the Biol. Characterisation of Human Tumours. Excerpta Med. Suppl. (1976) II.  
 Tanphaichitr, V. és Broquist, H. P.: J. Biol. Chem. **248**, 2176. (1973).  
 Tyihák, E., Szende, B. és Lapis, K.: Life Sciences. Közlés alatt. (1976. a)  
 Tyihák, E.: Fehérjevizsgáló módszerek (Szerk.: Kerese I.) Műszaki Könyvkiadó, Budapest (1975).  
 Tyihák, E., Patthy, A., Ferenczi, S., Eckhardt, S., Kralovánszki, J., Lapis, K. és Szende, B.: Kísér. Orvostud. (in press) (1976. b).  
 Tyihák, E. és Vágújfalvi, D.: J. Chromatogr. **49**, 343. (1970).  
 Villanueva, V. R. és Lederer, E.: Neurospora Newsletter N° **22**, 7. (1975).

## EMBEREN VÉGZETT TUDOMÁNYOS KUTATÁS ETIKÁJA\*

PETRÁNYI GYULA, az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1976. VI. 7.

„Azí kell tehát megvizsgálunk,  
hogy mi a legfőbb jó . . . .”  
„. . . más az orvosi principium, és más  
az egészség, és az előbbi az utóbbi  
végett van”

*Arisztotelész*

### I.

#### *Történelmi visszpillantás*

Az emberrel együtt fejlődött a kíváncsisága, a természet, és benne önmagának a megismerésére. Általában a változó korszellem, erkölcsi fölfogás, vallásos elképzelés irányította az emberi test és lélek tudományos megismerésének módszereit. Már az ókorban is nyilvánvaló volt, hogy az állatok vizsgálatából az emberre csak megközelítő tájékoztatást lehet kapni. Az ősi Egyiptomban a vallás elősegítette az orvosi ismeretek fejlődését. Ógörögországban a megfigyelés adataira alapított következtetés vált a tudományos vizsgálódások módszerévé. A római birodalomban még jóval a kereszténység előtt megváltozott a korszellem és eltiltotta a halott ember vizsgálatát, boncolását, ami — mint a Galenosi Könyvek tanúsítják — gátjává vált a fejlődésnek. A középkor a természettudományi kutatásnak nem kedvezett és az újkor ott folytatta az ember kutatását, ahol az ókorban abbamaradt, a boncolásokkal, az anatómiával és kórbonctannal. Így azonban az igazi titkot, az életet megfejteni nem lehetett. Megindult az életten fejlődése békával, majd nyúllal, és a „kísérleti nyúl” az emberkísérletek szükségességének a felismerése idején is ható, átvitt értelmű fogalomává válik. Az ember nem lehet kísérleti nyúl. Kiderül azonban, hogy az állat-megfigyelések és a fiziológiai—patológiai állatkísérletek eredményei a hasonlóságok ellenére az egyes állatfajok közt is jelentősen különböznek. Pavlov már majmokat igényel, de még a ritka és nehezen kezelhető emberszabású majmok vizsgálata sem pótolja az ember közvetlen kutatását.

Az orvos-kutató tehát, ha a galenosi példa tévedéseit el akarja kerülni, márpedig a tudomány a valóság igaz megismerésére törekszik, akkor magát az embert kell hogy vizsgálja.

Az ember, a társadalom, egyre jobban igényli, követeli a tömegeket sújtó „nép”-betegségek gyógyítását, a megtizedelő járványok elleni védelmet. Óriási sikereket mutathat fel az orvostudomány a betegségek visszaszorításá-

\* Előadás. Elhangzott a Magyar Tudományos Akadémia 1976. május 3-i ülésén.

ban, az életkor meghosszabbításában. Számptalan emberkísérlet is történik a megelőző állatkísérletek biztonságosnak látszó alapján, a kutatók gondot fordítanak az élet tiszteletére, még az állatkísérletek humanitására is.

A szenzációs sikerek mellett azonban elvétve jelentkeznek kudarcok, melyek helyes dialektikával nemhogy elrettentenének az embert érintő kutatásoktól, hanem éppen újabb kutatásokra ösztönöznek, a hibák, kísérleti ártalmak elkerülésére.

Nyilvánvaló, hogy minden hatásos vizsgáló-gyógyító-megelőző eljárásnak megvan a maga „inherens” veszélye, a legnagyobb gondosság ellenére is. Ez megkérdőjelezi a „*primum nil nocere*” több évezredek orvosi jelszavát. A halálos acut appendicitis, gyomor-bél perforatio stb. csak egyébként súlyos testi sértés: hasmetszés árán gyógyítható. Kiderül, hogy minden, de minden bevált, általánosan használt orvosi beavatkozásnak megvan az ártalmi lehetősége is, tehát az orvosi kutatás tárgyává válik minden orvosi beavatkozás előnyének és hátrányának, jó és rossz oldalának a vizsgálata, az ártalom árán elérhető haszon, a beneficium és nem kívánt kár arányának, a kockázat, rizikó arányának a mérlegelése.

Az egyes orvosok, kutatók benyomásai alapján végzett értékelés csalóka. Kifejlődnek tehát a beavatkozások, kísérletek helyes megtervezésének és az eredmények értékelésének a módszerei. A matematika, valószínűségszámítás, biometria bevonul az orvostudományba.

Az emberiség büszke a tudomány eredményeire, melyek átalakították az életkörülményeket és az embert valóban a természet urává tették, amikor közbejött néhány, főleg három megdöbbentően tragikus katasztrófa.

Az első politikai. A nürnbergi per leleplezi a hitleri koncentrációs táborokban folyt kegyetlenségeket, köztük a barbár emberkísérleteket. Az Egyesült Nemzetek Szövetségének újra meg kell fogalmaznia az emberi jogokat, kodifikálnia a védelmüket. Ez a Nürnbergi Codex új tízparancsolat, mely először szabályozza az emberkísérletek feltételeit. A World Medical Association 1947-ben kiadja a *Genfi Declaratio* címen ismert tételét, majd 1964-ben a részletesebb *Helsinki Declaratiót*.

A második katasztrófa a II. világháború végén robban, az egész világot végveszély szélére sodró atombombával és az atomrobbantásos kísérletek megindulásával. A harmadik katasztrófa a Contergan (Talidomid) ártalommal, a gyógyszerártalmak és a környezetszennyezés veszélyeinek felismerésével kezdődött. Ezekben az emberiség maga alkotta tudománya fordult vissza, ellene. Az atomrobbantási kísérlet ellen talán könnyebb védekezni. Jól körülhatárolt a veszély és bízhatunk a Szovjetunió aktív békepolitikájában, mely megteremtette az atomcsend egyezményt.

Bármit is tegyen az ember, visszahat rá és nem ismerve az összes kihatásokat, minden új felfedezés előbb-utóbb az embert is érintő kísérletnek tekinthető. A gyógyszerártalmak és általában a környezetszennyezés a tudo-

mány diadalútját jelentő hasznos fejlődés melléktermékei, a jótól elválaszthatatlannak látszó dialektikus rosszak. Alattomos ártalmak, amelyek ellen még most kell megtalálnia az emberiségnek a megoldást. Az orvosi [az embert védeni, javát szolgálni kívánó] kutatási eredmények váratlan ártalmai elleni védekezés megoldása nehezebb.

A fölismert veszélyek elhárítására újabb kutatások, kísérletek szükségesek. Persze újabb tudományos kutatás, kísérlet — most már biztosan tudottan — megint újabb ismeretlen veszélyeket rejteget és az emberiség jogosan aggódik, meddig terjedhet a kutatók joga az emberek kísérleti fölhasználásában.

Az elmúlt évtizedekben — nagyrészt az orvostudomány nagyszerű jóléti eredményei és az említett katasztrófák ellentéte miatt — a biomedicinális kísérletek érthetően fölkeltek a közérdeklődést. Nagyszámú közleményt olvashattunk, elsősorban a kutatóktól. A tudományos kutatás emberkísérleteivel szembeni aggodalom időszerűségének egyik további oka az, hogy amíg régebben a tudományos kutatás egy nagyon szűk elit elhivatott kiváltsága volt, addig ma a „tudós” ill. „kutató” egyszerű foglalkozássá vált, munkakörre, az egyre bővülő kutató hálózatban. A kutatás kezd iparosodni. Az egyetemi orvosi-oktatói előmenetel megkívánja a tudományos minősítést. Ma a természettudomány nem lexikális, hanem kísérletes kutatási igényű (Korányi Társaság Vándorgyűlése 1972.) és a kandidatúrához általában kísérletes módszerekkel kapott új megállapítások szükségesek. A kutatóintézetekben munkaverseny folyik az egyre nagyszerűbb természettudományi, orvosi felfedezésekért, amelyekhez kísérletezéssel lehet eljutni. Ebben a versenyben ugyan egyelőre nálunk még a laboratóriumi állatmodellek a tudományosabbak, de (számos külföldi abusus és scandalum-példa tanulságából következtethetően) előfordulhat a transponálás emberre. A szűk látókörű „cél szentesíti az eszközt” elv alapján féltő, hogy elvész a *kutatás végcélja, a humanitás fejlesztése*. Az eredmény felmutatás minden áron való hajszolása áltudományos produktiókhoz vezethet.

Érthető tehát, hogy a társadalomban jogos aggodalom ébredt a bármilyen kitűnő eredményt ígérő emberkísérletekkel szemben. A humanitás fejlesztésén fáradozó orvos-kutatók érzik ezt leginkább és ez magyarázza az embert a kísérletek meggondolatlanságaival szemben védő Deklarációkat, a Nemzetközi Medicinális Etikai javaslatokat a WMA részéről, itthon az 1972. II. „Egészségügyi” Törvényt és az ide vonatkozó rendelkezések kidolgozását.

## II.

*Az emberen végzett tudományos kutatás humanitási kérdései*

Az alapkérdésre, hogy szabad-e tudományos kutatást végezni és kísérleteket a tudomány előrehaladása, tévedések elkerülése érdekében az emberen, a történeti visszapillantás alapján egyértelmű a válasz: nemcsak szabad, hanem nagyon is szükséges, csak éppen meg kell határozni, az ember-egyedek és nagyobb csoportok, az egész emberiség érdekében e vizsgálatok humanitárius oldalát.

Az emberen végzett, az ember javát célzó tudományos kutatás (kísérletek) szükségességét az adja meg, hogy az állatmodellekben szerzett adatok az emberre vonatkozóan csak előkísérleti, tájékoztató jellegűek, sőt éppen kiscsoportú emberkísérletek bizonyítják, hogy az így nyert adatok sem általánosíthatók az egész emberiségre. Már régebben ismertek voltak olyan egyes embercsoport-tulajdonságok (pl. enzim-hiányok), amelyek miatt ezek súlyos tünetekkel reagáltak bizonyos gyógyszerekre. A Contergan (Talidomid) katasztrófa pedig rádöbbentve tudásunk elégtelenségére, átalakította a gyógyszeriant, és aláhúzta az ember sokkal alaposabb megismerésének szükségességét. Tanulságos adat, hogy ma a kórházba kerülő betegek kb. 15—20%-a szenved gyógyszer, ill. iatrogén ártalomban. Ez arra utal, hogy részben a régi gyógyszerek nagy részének sem ismerjük a klinikai farmakológiáját, részben nem ismerjük az emberek azon eltérő tulajdonságait, amelyek miatt a jószándékú orvosi beavatkozásokra váratlan bajokkal fognak reagálni. Voltaire-t lehet idézni: „Az orvos egy anyagot, amelyről keveset tud, bead egy szervezetbe, amelyről még kevesebbet tud”. Szükség van tehát az emberi betegségek sokkal alaposabb megismerésére, újabb diagnosztikai módszerekre, sokkal alaposabb preklinikai és kontrollált klinikai farmakológia, hatás és mellékhatás vizsgálatokra a gyógyszerek forgalomba hozatala előtt, de ugyanakkor szükség van az emberiség sokkal alaposabb biomedicai megismerésére, az egészségesek vizsgálatára is, hogy a későbbi buktatókat elkerüljük.

Eddig kizárólag somatikus hatások kísérleti vizsgálatáról volt szó, de egyre rohamosabban nő a psychopharmakonok száma is, amelyeknek a preklinikai vizsgálata nem sok támpontot nyújt és kikísérletezése szinte kizárólag emberen történhet, még hozzá többségében egészséges emberen. Amíg a legtöbb diagnosztikai és therápiás módszer kikísérletezése csak betegen és éppen a beteg jobb gyógyítása érdekében történik, a psyche és a physiologia mélyreható kutatása elsősorban egészséges embereken végezhető. Ennélfogva, és a Helsinki Declariáció szerint is meg kell különböztetnünk az emberkísérleteknek két csoportját: 1. clinical research combined with professional care, 2. non-therapeutic research.

Az etika szempontjából 3 lehetőség van:

A) *Etikus a kísérlet*, ha a kísérleti személy beteg és a kísérlet az ő jobb gyó-



gyítását kívánja szolgálni és rajta keresztül a többi hasonló betegét, abban a reményben, hogy az alkalmazott eljárás előnyösebb az eddig ismerteknél.

B) *Vitatható a kísérlet etikája*, ha a személy — legyen egészséges vagy beteg — csak tárgya, anyaga a tudományos kutatásnak, de a kísérleti személy egészségét közvetlenül nem szolgálja. A kísérlet tehát a személy számára kellemetlen és potenciálisan vagy egyértelműen veszélyes, amely miatt bizonyos ellenszolgáltatásban részesülhet (anyagi vagy egyéb juttatás, baleset és életbiztosítás stb.). Itt különbség van a kapitalista és szocialista államok között. Ennek a nem-therápiás kísérlettípusnak két etikai alapfeltétele van: 1. a kísérlet valamiképpen a tudományt szolgálja és a várható eredménynek feltehetően (később) gyakorlati értéke is lehet; 2. a kísérleti személyek — ismerve az összes veszélyeket, a részükre adódható áldozatokat és az ezek árán elérhető eredményt — teljesen önkéntesen működnek közre („informed consent”).

C) *Etikátlan a kísérlet*, ha a megtervezett kutatás értelmetlen, vagy csak fölösleges a tudomány állásánál, és esetleg csak a kutató téves elképzeléseit vagy egyéni érdekeit szolgálja; hozzá kell tenni, hogy ilyen kísérlet akkor is kifogásolható, ha önkísérlet vagy nem emberen történik, mert energiát, munkaerőt, költséget pazarol el, mégpedig nem a sajátját, hanem a társadalomét, amelyet értékesen lehetne fölhasználni.

Nem minősül emberkísérletnek a tudományos kutatás, ha a kutatók új adatok meghatározása érdekében az emberek vérért, vadozókat vizsgálják anélkül, hogy őket (az egyéb célra történt) vérvétel, vizeletadason stb. kívül más terhelje. Ez inkább adatgyűjtés az emberre vonatkozólag. A kutatás in vitro történik az egyéb okból végzett élőanyag vétele után. Legfőképpen azt kéri a kutató az orvostól, hogy pl. ne 5, hanem 10—20 ml vért vegyen. A vizelet ilyen vizsgálata legfeljebb a gyűjtés, ill. ennek esetleges különleges módja miatt lehet kellemetlen. Nehezebb az ilyen vizsgálat kategorizálása, ha pl. egyéb okból végzett műtét közben kell a műtétnek nem tartozó valamit tenni (pl. egy máj-darabot, nyirokcsomót kivenni, valamilyen vizsgálatot végezni a műtét által közvetlenül hozzáférhetővé vált helyen). Többnyire az új kutatási eredmény ilyenkor is legtöbbször veszélymentes melléktermék, hiszen általában inkább az ében való kimetszés által (pl. tumor mellett) friss ép szövet is kapható a sebésztől anélkül, hogy ez a kutató részéről emberkísérletnek minősülne. Emberkísérletnek minősül azonban, ha nem tartozik a beteg javát szolgáló beavatkozáshoz (megnyújtja a műtétet, új veszélyt hoz stb.).

*A jól megalapozott therápiás kutatás*, kísérlet tulajdonképpen részben hozzátartozik a Helsinkai Declariationban is az orvos számára biztosított gyógyítási szabadságjoghoz, aminek persze a bevált eljárásokkal is mindig van bizonyos kockázata.

Tudományos kutatást folytatni, kísérletet végezni sokféleképpen lehet, és ezért félreértések elkerülésére fontos a kísérlet fogalmának a meghatározása.

Az értelmező szótárak szerint a kísérlet szinonimái: próbálkozás, tapasztal-

talatszerzés, teszt, trial, assay; módszer egy elmélet bizonyítására; eljárás, melynek eredménye nem jósolható meg az elvégzése nélkül; egy folyamat előidézése az egésznek és részleteinek a tanulmányozására. Így mutatnak be kísérleteket az oktatásban a kémián, fizikán, élettanon, így van kísérleti fizika, kísérleti élettan, sőt kísérleti gazdaság, kísérleti színház, oktatási reformkísérlet; jogilag: kísérlet büntett végrehajtására stb. A jelen tárgyalásunkban azonban a kísérlet fogalmán nem valamely már ismert jelenség létrehozásának a megkísérlését, reprodukcióját értjük (pl. pupilla reflex kiválthatósága, egy súlyos betegség műtéti vagy gyógyszeres elmulaszthatósága), bár a mindennapos szóhasználat erre is jogos. A tudományos kutatás kísérletei ettől különböznek.

A természettudományi kutatást szolgáló kísérlet mindenki számára új és általánosítható megismerést, egy elmélet vagy újabb megközelítési lehetőség bizonyítását, vagy cáfolását szolgáló olyan eljárás, amellyel egy folyamatba vagy kialakult egyensúlyi helyzetbe mesterségesen beleavatkozunk és ennek következményeit, eredményeit keressük. A kísérlet akkor helyes, ha a lehető összes szükséges alapismeret alapján lett megtervezve, ha részletfeltételeiben is jól ellenőrizhető és ezáltal egy pontossági határon belül reprodukálható, ha a várható, ill. kapott eredmény bizonyító értékű. Egyre több kísérlet, adatprodukción folyik, és a kísérletező egyre kevésbé lehet biztos abban, hogy többé-kevésbé eredeti a kísérlete (az eredményének prioritása van) vagy pedig már reprodukció. (Ezen legújabb információ centrum computer-szolgáltatása segíthetne, mert az óriási, részben nem is hozzáférhető irodalom egyéni áttekintése lehetetlenné vált.) Persze bizonyos mértékig a tudatos reprodukcióra, az utánvizsgálatokra is szükség van, hiszen az eredmények még egy kutató kezében is szórnak és fontos kérdés, hogy a hasznos eredmény reprodukálható-e? Ha a kísérlet olyan volt, hogy értéke miatt egyre gyakrabban reprodukálják diagnosztikai vagy gyógyítási célra, a mai kísérlet a holnap rutinjává válik.

Ahhoz, hogy egy kutatási kísérlet elérje a célját, legfontosabb, hogy 1. az elmélet, melynek bizonyítását, cáfolatát szolgálni akarja, helyes, reális legyen, 2. a kísérletet a kutató jól tervezze meg. Rossz elmélet alapján rosszul megtervezett és végzett kísérlet nem tükrözheti hűen a megismerni kívánt valóságot, igazságot, tehát nemesak fölösleges, hanem káros is, mert tévútra vezet és akadálya lehet a további helyes irányú kutatásnak. Különösen veszélyes, ha nagy tekintélyű kutató közöl téves eredményt nehezen megismételhető kísérlet alapján.

Az orvostudományi kísérleteknek, különösen a közvetlenül az emberen végzetteknek a legnagyobb nehézsége, hogy — minden objektivizálási törekvés ellenére — a medicina nem exact tudomány. Nagyon nagy véleménykülönbségek lehetnek ugyanazon esetben a vizsgálati-gyógyítási leghelyesebb módok tekintetében.

Szükséges tehát egy általános kötelező irányvonal érvényesítése a tudomány mindenkori állása szerint. Bár a magyar 1972. II. Eü. Törvény nem foglalkozik közvetlenül az emberkísérletekkel, van néhány tétele, mely ezzel szorosan kapcsolódik: (44 § 3.) „Az orvos gyógyító-megelőző tevékenysége közben csak olyan gyógyszer rendelhet és alkalmazhat, amely gyógyszer hatóanyagainak hatását, javallatait és ellenjavallatait, alkalmazásának módját, adagolását, valamint káros mellékhatásait és azok elhárításának módját ismeri” (44 § 1.). „Az orvos az orvosi gyakorlatban még kellően ki nem próbált . . . eljárást . . . csak akkor alkalmazhat, ha az nem késlelteti, ill. nem hiúsítja meg az orvosi gyakorlatban már kipróbált . . . eljárástól várható eredményt. Az új eljárás így csak akkor alkalmazható, ha az tudományosan alátámasztható és az alkalmazásához, valamint eredményeinek ellenőrzéséhez és értékeléséhez a szükséges feltételek fennállnak. Az új eljárás alkalmazásához a beteg-kiskorú vagy cselekvőképtelen, ill. korlátozott cselekvőképes nagykorú esetében a törvényes képviselő, illetőleg a hozzátartozó ( a továbbiakban együtt: hozzátartozó) — hozzájárulása szükséges” . . . (47/1). „Műtéthez . . . a vér vagy más vizsgálati anyag vételéhez a vizsgált, ill. gyógykezelés alatt álló személy hozzájárulása szükséges. A hozzájárulást megadottnak kell tekinteni, ha az érdekelt személy nem tesz észrevételt.” Az Eü. Törvény új gyógyszerekre vonatkozóan kötelezővé teszi az emberkísérletet, kimondva, hogy „A forgalomba hozatal engedélyezése előtt *emberen történő kipróbálás alapján is ellenőrizni kell, hogy a gyógyszer a kívánt gyógyászati célra alkalmas-e*”.

A törvények természetesen csak fő irányvonalakat adhatnak, az etikai deklarációk is csak általános irányt mutathatnak, ezért *az emberkísérletekre vonatkozólag minden fejlett társadalmú országban szabályozási rendszerek alakultak ki.*

*Nálunk* az elmúlt 25 évben az alakult ki, hogy minden orvosi kísérlethez elvben engedély kell és a kutatási témák rangsorolást kapnak: kap-e anyagi támogatást valamely országos szervtől (ETT, ill. Eü. Min. Tud. Főosztálya, MTA) vagy nem kap, utóbbi esetben pedig intézeti témaként kap-e engedélyt a kutatás elvégzéséhez. Az engedély megadása, ill. megtagadása *Témabizottságok* elbírálása alapján történik. A nagy kérdés ezek után, hogy ezek a *Témabizottságok* és a témákat Koordináló Intézetek, végül a főosztályok milyen etikai megfontolások alapján véleményeznek és adnak támogatást. Ennek a megbeszélése különösképpen időszerű most, amikor a következő öt-éves terv kutatási téma-tervezeteiről kell döntenet. Ebből az alkalomból sem lehet tehát eléggé hangsúlyozni, hogy minden kutatás kiindulási *alapja és nép célja az ember, a fejlődő társadalom.* Az in vitro és az állat kísérletek ehhez mindig csak segéd-kutatások maradnak.

## III.

*Javaslat*

Jó lenne, ha az emberkísérletekre vonatkozólag a Témabizottságok egy-  
séges irányvonalakat követnének. Javaslom, hogy az MTA V. Osztálya a követ-  
kező irányvonalat vitassa meg.

1. Minden olyan kutatási témát, mely emberrel kapcsolatos, külön cso-  
portban kell elbírálni.

2. El kell dönteni, hogy az embert közvetlenül vagy közvetve érintő témá-  
ról van-e szó. Utóbbiban is el kell bírálni, hogy mennyire veszi igénybe az  
érintett személyeket, mennyire veszélyes, invazív a kutatási módszer.

3. Az embert közvetlenül érintő kutatásban el kell dönteni, hogy meny-  
nyire alkalmaz eddig engedélyezett, elfogadott módszereket és az emberkísér-  
let mennyire van preklinikai in vitro, ill. állatkísérletekkel előkészítve, hogy  
annak az első végzése is emberi számítás szerint rizikómentesen vagy ismert  
jelentéktelen kellemetlenségek árán végezhető.

4. El kell dönteni, hogy a kísérlet a fent említett A) azaz diagnosztikai-  
terápiás-preventív kategóriába tartozik-e, vagyis a kísérlet a benne szereplő  
személyeknek is a közvetlen javát hivatott szolgálni, vagy a B) kategóriába.  
Az „A” kategóriájú témák legnagyobb része a gyógyszerkutatásból adódik.

5. Mind az A, mind a B kategóriájú emberkísérleti témakörre vonatko-  
zóan eldöntendő, hogy a kísérlet milyen ismert veszélyekkel jár és milyen  
veszélyei képzelhetők el. Külön mérlegelendők a kísérleti személyek nem köz-  
vetlen testi-szellemi károsodásai is (tovább van táppénzen, távol a családjá-  
tól, kórházi környezetben stb.).

6. Az „A” kategóriában el kell bírálni, hogy mennyire a beteg érdeke  
az elsődleges — a kutató, vagy esetleg egy új gyógyszerre, műszerre vonatko-  
zólag a gyógyszert, műszert előállító (cég, vállalat, vegyész, farmakológus)  
érdekeltségével szemben.

7. *Tudományos Etikai Bizottságot* kell szervezni (TEB), mely teljesen  
független az engedélyezendő téma kutatóitól, melyet nem irányít részrehajlás  
se pro, se contra. De azért ez ne elagott „vének tanácsa” (peer group) legyen,  
inkább egy társadalmi felelősségű akadémiai szaktestület. A témabizottságok  
által ajánlott minden B kategóriájú témát ide kell végső elfogadásra-jóváha-  
gyásra fölterjeszteni. A TEB foglalkozzék a kutatóknak a témabizottságok  
bírálata elleni panaszával akár az A, akár a B kategóriájú a téma.

Jó lenne ismerni már most az elmúlt tervidőszakra vonatkozólag az  
arányt az A és B kategóriájú témák számai közt.

A TEB-nek kellene ellenőriznie és felülbírálnia időnként etikai szempont-  
ból az A kategóriájú témákra vonatkozóan is a témabizottságok működését.

8. Emberkísérletek elbírálásakor különös szigorúsággal kell figyelembe  
venni, hogy a téma nem C) kategóriájú-e, tehát feltétlenül már témabizottsági

szinten elutasítandó (még önkísérletekre vonatkozóan is, bár ezt nehéz megtiltani).

9. A B kategóriájú kísérletek engedélyezésének a feltétele a kísérletbe bevont emberek önkéntességének, az önkéntes beleegyezésnek a biztosítása, amihez hozzátartozik a pontos felvilágosítás a kísérletről („*informed consent*”) és a kísérletből bármikori kilépés joga és lehetősége.

Az önkéntesség biztosítására ki kell dolgozni ennek a szabályait, a fölvilágosítás módjait (írásbeli fölvilágosítás kötelezettsége és megtörténtének igazolása a kísérleti személy, ill. jogi képviselője részéről). Kérdés, hogy a kutató maga vagy tőle független személy intézze-e az önkéntességet; mi legyen az önkéntesek toborzási módja, etikettje; milyen ellenszolgáltatások fölkinálása nem befolyásolja az önkéntességet; milyen áldozatvállalást lehet az önkéntesektől elfogadni stb. stb. Ehhez jogi jártasságú személyek is szükségesek.

Az áldozatvállalás a kutató és kutatást engedélyező-támogató állam részéről is fennáll, tehát a kutatás alanyai („tárgyai”) részéről is elvárando bizonyos etikai magatartás, aminek együttműködési készségben kell megnyilvánulnia; kérdés azonban mennyi aktív együttműködés kérhető a kísérleti személyek részéről.

10. A tudományos kutatás ezen új etikai bizottságának kellene alkalomszerűen döntenie az önkéntesség megkövetelésének a szigorúságáról, nemcsak a B, hanem bizonyos esetekben még az A-típusú kísérletekben, mert ez nem mindig lehetséges, sőt helyes, mert a) meghamisíthatja a kísérleti eredményt, ha a beteg tudja, hogy milyen hatás várható, különösen pszichológiai és psychopharmakon vizsgálatban, b) vitatható, hogy kötelező lehet-e a felvilágosítás halálosaknak ismert diagnosisokra vonatkozóan, c) kérdés, biztosítható-e az adott esetekben mindig az informatio helyessége, hiszen ez sokak számára eleve elrettentő. Ha a kutató vagy tájékoztató hisz a beteg számára is jó eredményben, akkor igyekszik rábeszélni, ha nem, akkor meg lebeszélni a beteget. Megtévészto lehet a fölvilágosítás, ha a kísérlet vakon, placeboval vagy az eddig legjobbnak vélt önkontrollal random, cross over megy, hiszen ezt éppen az eredmény objectivitása érdekében nem lehet a beteg részére elmondani. Nehéz lehet a döntés ahhoz, hogy ki legyen a párhuzamos kontroll, akit kizárunk az előnyösnek vélt beavatkozásból. Mindez természetesen csak az A típusra vonatkozik. A kettős-vak módszerrel még nehezebb az etikai megítélés.

11. A Bizottságoknak a human kísérletek előtt a körülményeket a helyszínen kellene megtekinteni, hogy alkalmasak-e a hely és körülmények a témában leírt kísérletek elvégzésére, nem volnának-e máshol non-invasiv módszerekkel kisebb kockázatúak e vizsgálatok; a munkatársak felkészültsége, etikai magatartása megfelel-e ennek a bizalomnak; ellenőrizni kellene az emberkísérleteket a kezdetükkor, menet közben, hogy megvannak-e a váratlanul fölmerült ártalmak elhárításának a lehetőségei. Figyelembe kell venni a

kísérletezés „ökonómiai efficienciáját”, a „minél kevesebb ráfordítással, minél több új információ” követelményét is, hiszen a kutatási költségek egyre nagyobbak. Ezt pedig — bármilyen nehéz is — össze kell egyeztetni az ember nem-veszélyeztetésének a kötelezettségével.

12. Ellenőrizni kellene, hogy az értékelés orvosi és matematikai módszereit helyesen alkalmazzák-e? A kísérlet folyamán kiderülhet, hogy a tervet módosítani kell; ehhez kikérték-e a témabizottság engedélyét? Nagy figyelem fordítandó arra, hogy a kísérletben szereplő nem lehet-e terhes (gravid), hogy az önkénteseknek milyen az életmódjuk, nem szednek-e önfeledten valamilyen gyógyszert. Számatalan kérdést ad az élet, amelyet előre nem lehet látni.

Mondhatjuk, hogy maga a jelenlegi tervezési, engedélyezési és ellenőrzési rendszerünk is kísérleti és erre kidolgozandó módszerekkel kell majd ennek is a határfokát, megbízhatóságát tesztelni. Ilyen vizsgálatokat is végeztek már (amikor tehát a különböző bíráló bizottságok munkáját vizsgálták, tették kísérlet tárgyává) érdekes tanulságokkal. „Ars longa, vita brevis, az ítélet nehéz”, főleg azért mert közelről az ördög sem olyan fekete és a hó se mindig annyira fehér. A jó szándék elegendhetetlen az etikus magatartáshoz, de „a pokolba vezető út is jó szándékokkal van kiköveve”. Távolról és túl közelről helytelen lehet a megítélés.

Mindez a szabályozás az emberkísérletekre vonatkozólag nem a kísérletezés gátlására, hanem eredményesebbé tételére szolgál, egyben biztosítékul is a társadalom, ebben a magunk, tehát a kutatók részére is, hogy abusus ne fordulhasson elő. Elősegíteni kívánja ezt a törekvést az *MTA elnökségének az 53/1975. sz. határozata*, mely az elméleti és klinikai orvostudományok fokozottabb támogatásának reális lehetőségeit kívánja megvizsgálni, mert nem alaptalan az a vélemény, hogy egyes kutatóhelyeken jobb az állatkísérleti berendezés, mint a betegek ellátását szolgáló. Mindezek ellenére az általános tapasztalat bizonyítja, hogy valamely betegcsoport tudományos kutatásával foglalkozó betegellátó intézményben az átlagbetegek is, de főleg a kutatók irányba eső betegségekben szenvedők sokkal magasabb szintű és eredményesebb ellátásban részesülnek, mint ahol az orvosok állandó továbbképzésétől elválaszthatatlan kutatási igény hiányzik. Végeredményben mindez racionálisan leginkább nagy egészségügyi kombinátokban oldható meg, ahol a kutató a maga mély, de szűk érdeklődési körével nem áll egyedül, hanem a más irányú kutatók is segítik. Így több mint egy évtizedes klinikai farmakológiai és módszertani kutatói tapasztalataim alapján állíthatom, hogy ennek kapcsán az A kategóriájú kutatási kísérletekben, éppen a különösen gondos elővizsgálatok és megfigyelés, nyomon követés által a mellékhatások, ártalmak nem érik el az általános betegellátásban előfordulóknak gyakoriságát és súlyosságát, a beteg részére nyújtott előnyök mellett.

Összegezve az elmondottakat, feltétlenül szükséges a tudományos kutatás tervezési, ellenőrzési és elbírálási rendszerének a fejlesztése. Ezen belül

kiemelt figyelmet kell kapniok az emberkísérleteknek. Meg vagyok azonban győződve arról, hogy minden rendszerbe — a javasolt fejlesztésbe is — hiba csúszhat, minden rendszer kijátszható. Ezért a legfőbb biztosítéka a tudományos kutatás etikájának és a kutatott ember jogainak, személyisége és emberi méltósága megőrzésének a kutatóhely fölszereltségét és a saját képességeiket figyelembe vevő kutatók szakértelme, etikai színvonala, amelyhez a szocializmust — kommunizmust — építő társadalom humanitárius etikai fejlődése adja meg a biztos alapot.

## IRODALOM

- Arisztotelész*: Eudemoszi etika. Gondolat, Budapest, (1975). 1217 b. és 1249 b.
- Ádám Gy.*: A személyiség védelme és az emberen végezhető kísérletek viszonya. Az emberkísérlet paradoxonjai. Előadás (kézirat): SOTE, Tud. Ülései, 1976. III. 30.
- Ádám Gy.*: Az orvos személyiségének történelmi átalakulása, SOTE Világnézeti Referáló Szemle, 2 : 34, 1976.
- Barber, B.*: The Ethics of Experimentation with Human Subjects Sci. Amer. 244: 25, 1976.
- Bradford Hill, A.*: Controlled Clinical Trials. Aims and ethics. Vienna, 1959. C. I. O. M. S.
- DHEW*: The Institutional Guide to DHEW Policy on Protection of Human Subjects, DHEW Publ. (NIH) 72—102. Dec. 1. 1971.
- Dunlop, Sir Derrick*: Medicines, Governments and Doctors, Drug 3 : 305—313 m 1972.
- Erdélyi Judit*: Vita az álltudományosságról. Beszámoló az MTA elnökségi ankétról (1975. dec. 10.) Magyar Tudomány, 1976. 83/21 : 1962.
- HEW's Grants administration Manual*: Full Text of Dept.- Wide, HEW Policy Statement on Patient Consent; Subject must be told he may withdraw from experiment at any moment. Drug Res. Rep. 14: n:13, S-33, 1971.
- Ingelfinger, F. J.*: N. Eng. J. Med. 287, 465, (1972).
- Juvancz I.*: Orvosképzés, 376, 19 (1972).
- Juvancz I.*: A gyógyszerkutatás során fenyegető iatrogen ártalmak. Korányi Társaság Vándorgyűlései 1975.
- Katz, J.*: Experimentation with human beings. Russel Sage Foundation, New York 1972, p. 1031.
- Káldor A.*: A klinikai farmakológiáról. Medicina, Bp. 1967.
- Ladimer, I.*: Ann. N. Y. Acad. Sci, 169, 564, (1970).
- Leake, Ch. D.*: Theories of Ethics and Medical Practice AMA 208, 842, (1969).
- Mathé, G.*: N. Press. Med. 5, 589, (1976).
- Moussong-Kovács E.*: Kutatásetikai problémák az orvosi pszichológia területén. A pszichológia módszerei. Bp. Akadémiai Kiadó, 1970, p. 359.
- Nellie, Westerman*: Clin. Res. 24, 27 (1975).
- NIH*: Forteenth Conference of Cardiovascular Training Grant Program Directors. National Invest. Inst. NIH, O5PH5, Bethesda, Md.
- Petrányi Gyula*: Iatrogén ártalmak a belgyógyászatban. Korányi Társaság Vándorgyűlései (1975). Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Petrányi Gyula*: Orvosi Hetilap, 109 Suppl. 16 (1968).
- Petrányi Gyula*: Orvosképzés, 45, 163 (1970).
- Reccomendations from the declaration of Helsinki*. Guiding Principles in the care and use of Animals. Amer J. Physiol. 230 N° 2 p. VI.
- Toole, J. F.*: Circulation, 48, 1 (1973).
- Tóth József*: Magyar Tudomány 83/21 154 (1976).
- WHO report*: Principles for the Clinical Evaluation of Drugs. WHO Technical report series N: 403, Geneva 1968.
- WMA*: Recommendations guiding doctors in clinical research, World Med. Ass. 1964 Brit. Med. J. 2:177, 1964.
- Witts, L. J.*: The ethics of controlled clinical trials. Conference on Controlled Clinical Trials. Vienna, 1959, C. I. O. M. S.







**TARTALOMJEGYZÉK**

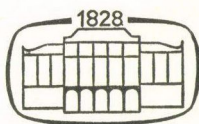
<i>Kesztyűs Lóránd: Az immunválasz kórokozó következményei.....</i>	87
<i>Petrányi Gyula: Az immunológiai kutatások módszertana és az immunológia mint kutató módszer.....</i>	103
<i>Jeney András, Dzurillay Éva, Kopper László és Lapis Károly: Daganatos sejtpopuláció növekedésének tanulmányozása II. Magi fehérjék vizsgálata gyorsan és lassan proliferáló NK/Ly ascites tumor sejtpopulációiban .....</i>	115
<i>Kopper László, Jeney András és Lapis Károly: Daganatos sejtpopuláció növekedésének tanulmányozása III. Kemoterápiás szerek hatásának vizsgálata eltérő növekedési ütemű NK/Ly ascites tumoron .....</i>	131
<i>Lapis Károly, Jeney András, Tyihák Ernő, Kopper László, Szarvas Tibor, Bursics László, Újhelyi Eszter és Szende Béla: ..... N-ε-<sup>3</sup>H-trimetil-l-lizin felvételének vizsgálata NK/Ly ascites tumoros egerek szerveiben .....</i>	147
<i>Petrányi Gyula: Emberen végzett tudományos kutatás etikája .....</i>	161

*Megjelent: 1977. III. 18.*

SZERKESZTI: KNOLL JÓZSEF

27.  
KÖTET

A MAGYAR  
TUDOMÁNYOS  
AKADÉMIA  
V. ORVOSI  
TUDOMÁNYOK  
OSZTÁLYÁNAK  
KÖZLEMÉNYEI



AKADÉMIAI KIADÓ, 1976

3-4.  
SZÁM

# ORVOSTUDOMÁNY

A Magyar Tudományos Akadémia V. Orvosi Tudományok Osztályának  
Közleményei

A SZERKESZTŐ BIZOTTSÁG TAGJAI:

BABICS ANTAL, ERNST JENŐ, GEGESI KISS PÁL, HAYNAL IMRE,  
KERPEL—FRONIUS ÖDÖN, MISKOLCZY DEZSŐ, ZSEBŐK ZOLTÁN

FŐSZERKESZTŐ

KNOLL JÓZSEF

TECHNIKAI SZERKESZTŐ

KNOLL BERTA

SZERKESZTŐSÉG: 1085 BUDAPEST, ÜLLŐI ÚT 26.

KIADÓHIVATAL: 1363 BUDAPEST, ALKOTMÁNY UTCA 21.

*Az Orvostudomány* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Négy füzet alkot egy kötetet. Évenként általában egy kötet jelenik meg.

*Az Orvostudományban* az Osztály rendezvényein elhangzott előadások, az Osztály tagjainak eredeti vagy összefoglaló közleményei, továbbá az MTA saját intézeteinek közleményei jelennek meg. Kéziratok a következő címre küldendők:

## *Orvostudomány*

1085 Budapest VIII., Üllői út 26.

A közlésre el nem fogadott kéziratokat a szerkesztőség lehetőleg visszajuttatja a szerzőhöz, de felelősséget a beküldött kéziratok megőrzéséért vagy továbbításáért nem vállal.

*Az Orvostudomány* előfizetési ára kötetenként 60 forint. Megrendelhető belföldre az Akadémiai Kiadónál (1361 Budapest Alkotmány u. 21. Pénzforgalmi jelzőszámunk 215-11488.), külföldre a „KULTÚRA” Könyv és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (1389 Budapest Postafiók 149. Pénzforgalmi jelzőszám: 218-10990 sz.) vagy annak külföldi képviselőiteinél és bizományosainál.

A Magyar Tudományos Akadémia V. Orvosi Tudományok Osztálya a következő idegen nyelvű folyóiratokat adja ki:

1. *Acta Chirurgica,*
2. *Acta Medica,*
3. *Acta Microbiologica,*
4. *Acta Morphologica,*
5. *Acta Paediatrica,*
6. *Acta Physiologica.*

E lapok hivatottak a magyar orvostudományok eredményeinek legjavát a külfölddel megismertetni.

A cikkek orosz, német, angol vagy francia nyelven jelennek meg a szerző kívánsága szerint, összefoglaló pedig további egy, ill. két nyelven. A dolgozatot magyar vagy a megfelelő idegen nyelven a következő címre kell beküldeni:

*Acta Chirurgica* szerkesztősége, 1082 Budapest VIII., Üllői út 78/b.

*Acta Medica* szerkesztősége, 1083 Budapest VIII., Szigony u. 43.

*Acta Microbiologica* szerkesztősége, Országos Közegészségügyi Intézet, 1097 Budapest IX., Gyáli út 4.

*Acta Morphologica* szerkesztősége, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, 1091 Budapest IX., Üllői út 93.

*Acta Paediatrica* szerkesztősége, 1083 Budapest VIII., Bókay J. u. 53.

*Acta Physiologica* szerkesztősége, 7642 Pécs, Rákóczi u. 80. Élettani Intézet.

## A VESEVÉRÁRAMLÁS ÉS A VÉRÁRAMLÁS INTRARENÁLIS MEGOSZLÁSA KUTYÁBAN NORMÁLIS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT ÉS URÉTER ELZÁRÁS ALATT

ROSIVALL LÁSZLÓ, FAZEKAS ÁRPÁD, PÓSCH ELEK az orvostudományok kandidátusa,  
SZABÓ GYÖRGY, az orvostudományok doktora és HÁRSING LÁSZLÓ, az orvostudo-  
mányok doktora

Közlésre érkezett: 1976. VI. 30.

A vesevéráramlásnak és a véráramlás vesén belüli megoszlásának vizsgálata mind kísérleti, mind klinikai körülmények között fontos feladat. Az utóbbi meghatározására a legelterjedtebb módszerek a  $Rb^{86}$ -felvétel és a radioaktív inert gáz kimosási technika (Kety, 1951; Ladefoged és Pedersen, 1968; Sapirstein, 1956, 1958; Thornburn és mtsai, 1963). A  $Rb^{86}$  izotóp módszer hátránya, hogy a kísérletben csak egyetlenegyszer, a kísérlet végén lehet véráramlást mérni, mert beadása után az állatot egy perc múlva meg kell ölni, előnye viszont, hogy szem ellenőrzése mellett a szövettani szerkezetnek pontosan megfelelően vágunk a veséből kéreg és velő mintákat és határozzuk meg a vesén belüli áramlási megoszlást (Hársing és mtsai, 1967; Sapirstein, 1956, 1958). A gáz kimosással a kísérlet során az áramlásmérés ugyan többször is megismételhető, ezzel szemben nem határozható meg pontosan, hogy a kapott sebesség értékek a veseszövet melyik részének áramlását jellemzik (Ladefoged és Pedersen, 1968; Kety, 1951; Thornburn és mtsai, 1963). Az irodalmi adatok szerint a két módszerrel normális körülmények között végzett mérések teljes vese-véráramlási (TRBF) értékei jól egyeznek egymással és a direkt úton mért értékekkel is, de a vesén belüli megoszlásban már jelentős az eltérés (Hársing és mtsai, 1967; Ladefoged és Pedersen, 1968; Sapirstein, 1958; Thornburn és mtsai, 1963).

Az eredmények nemcsak a meghatározásukra használt módszerektől, de a kísérleti körülményektől is függenek. A xenon és a rubidium módszerrel kapott áramlási értékek között a legnagyobb eltérések az uréterelzárásos kísérletekben találhatók.

Uréter nyomás növekedésekor a vesevéráramlásban és annak megoszlásában a diuretikus állapottól függően igen ellentmondók az eredmények (Carlson és Sparks, 1970; Franklin és Selkurt, 1964; Gilmore, 1964; Gosk, 1966; Miyazaki és McNay 1971; Selkurt, 1963). Kuttyában még összehasonlítható víz és sóürítés mellett is lértak csökkent, illetve emelkedett vesevéráramlást és változatlan, illetve megváltozott vesén belüli áramlásmegosz-

lást. Ezért mértük kísérleteinkben  $\text{Rb}^{86}$  felvétellel,  $\text{Xe}^{133}$ -kimosással és elektromagnetikus áramlásmérővel (ÁM) a vese véráramlását és az áramlás megszűlését normális körülmények között és uréter elzárás alatt.

### *Anyag és módszer*

Kísérleteinket mindkét nemű, 15—26 kg testsúlyú kutyákon pentobarbital narkózisban (30 mg/kg) végeztük. A veséket középilonali hasmetszésből transzperitoneálisan tártuk fel és az artéria femorálison keresztül 0,38 mm belső és 0,64 mm külső átmérőjű fluorokarbon katétert vezetünk fel az artéria renálisba. Elektromagnetikus áramlásmérő észlelőt (Nycotron, Dramon, Norvégia) helyeztünk néhány esetben mindkét oldali, de legtöbbször csak a bal artéria renálisra. A 0-pontot a kísérlet elején és végén kontrolláltuk az érzékelőtől disztálisan leszorítva az artériát. A femorális artériában és az uréterben a nyomást Statham elektromanométerrel folyamatosan regisztráltuk.

A  $\text{Xe}^{133}$ -at (kb.  $50\mu\text{Ci}$ ) 0,1—0,5 ml fiziológiás sóoldatban oldva gyors injekció formájában juttattuk a katéteren keresztül a veseartériába. A kollimált  $\text{NaJ}$  (Tl) kristály-detektort kb. 8 cm-re helyeztük a vese fölé úgy, hogy az egész szerv a látótéren belül essék. A detektort logaritmikussal rateméterrel kötöttük össze és az aktivitást direktíróval regisztráltuk. Mind a normál állatokban, mind az uréter elzárt esetekben több xenon-kimosási görbét vettünk fel és az utolsót mindenkor a rubidium késelem nélküli beadása követte. A kb.  $50\mu\text{Ci}$   $\text{Rb}^{86}$  izotópot gyors injekcióval a véna juguláris externába adtuk. A beadás kezdetétől két másodpercenként vérmintákat vettünk 40 másodpercen keresztül az artéria femorálisból. Pontosan az injekciót követő első perc végén a két vesét lefogtuk és eltávolítottuk. A vérben és a szövetekben talált aktivitásból a perctérfogatot és TRBF-ot a korábbiakban leírtak szerint számoltuk, (Hársing és mtsai, 1966).

A  $\text{Xe}^{133}$ -kimosási görbét Thorburn és mtsai (1963) szerint értékeltük. A multiexponenciális görbét négy monoexponenciális görbe eredőjének tekintve grafikusán előállítottuk az egyes összetevőket. A kapott egyenesekből következtettünk — az autoradiographiás bizonyítékok ismeretében (Thorburn és mtsai, 1963) — a kéreg, a külső-, és belső velő, valamint a perirenális zsírszövet áramlására:

$$F_{\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}} = \frac{0,693 \cdot \lambda}{T_{\frac{1}{2}} \text{ (sec)}} \cdot 60$$

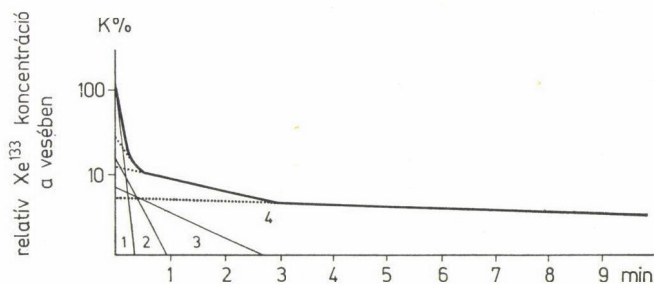
A veseszövetekre a  $\lambda$  megoszlási hányadost a haematokrit (Ht) ismeretében a következőképpen számoltuk (Ladefoged és Pedersen 1968):

$$\lambda = 0,70 \cdot \frac{1,69}{1,05 + 0,013 \cdot \text{Ht}}$$

A zsírszövetre a 9,8-es megoszlási koefficienszt használtuk.

Az eredő görbe egyes összetevőinek az ordinátára való extrapolálásával megkaptuk a négy tárolónak (compartment) relatív térfogatát (K%). (1. sz. ábra)

C	T 1/2 (sec)	$k = \frac{0,693}{T \ 1/2}$ (min <sup>-1</sup> )	F (ml·g <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	K (%)	F <sub>x</sub> K (%)	F (%)
1	4	10,39	7,27	75	545	93,8
2	15	2,77	1,94	15	29	5,0
3	64	0,65	0,45	7	3	0,5
4	311	0,13	1,32	3	4	0,7
vese	6	6,93	4,85	100	581	100,00



I. ábra: Xe<sup>133</sup>-kimosási görbe és a számított paraméterek

A teljes vese átáramlást az alábbiak szerint számoltuk:

$$TRBF_{\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}} = \frac{F_1 \cdot K_1 \% + F_2 \cdot K_2 \% + F_3 \cdot K_3 \% + F_4 \cdot K_4 \%}{100}$$

A vizsgálatok első sorozatában csak a mérésekhez szükséges műtéti beavatkozás történt. Kihasználva, hogy hasi műtétek hatására a vérnyomás gyakorta esik, alacsony perfúziós nyomás mellett is készítettünk Xe<sup>133</sup>-kimosási görbét, majd 6%-os dextrán infúziót adtunk és a vérnyomás helyreállítása után a méréseket megismételtük. Egy állatban 3–4 mérést végeztünk.

Az uréter elzárásos kísérletekben az állatok folyamatosan 6% mannitot és 0,7% NaCl-ot tartalmazó infúziót kaptak 2 ml · min<sup>-1</sup> sebességgel. A kontrollmérések után elzártuk az urétert és a méréseket megismételtük. Az uréternyomás stabilizálódása (50–90 Hgmm) után 15–20 perccel vettük fel az utolsó xenon görbét. Ezt a rubidium beadása követte.

Áramlási értékeket gramm vesesúlyra számoltuk. Az áramlásmérővel kapott kontroll áramlási értékeket uréter elzárás esetén az ellenkező oldali vese súlyával osztottuk. Adataink szerint normális kutyában a két vese súlya között nincs szignifikáns különbség.

### Eredményeink

A 9 normál altatott kutyán összesen 29  $Xe^{133}$ -kimosási görbét készítettünk, az átlagos  $Xe$ -TRBF  $5,01 \pm 0,2 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  volt. Ugyanakkor az áramlásmérővel  $4,97 \pm 0,22 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  áramlást mértünk (I. sz. táblázat).

#### I. sz. táblázat

$Xe^{133}$ -kimosási technikával mért nutritív vesevéráramlás 9 kutyán (29 mérés átlaga)

	F	K%	F%
Kéreg	$7,08 \pm 0,34$	$57,0 \pm 2,1$	$81,5 \pm 1,8$
Külső velő	$2,35 \pm 0,14$	$29,5 \pm 1,9$	$16,9 \pm 1,6$
Belső velő	$0,35 \pm 0,03$	$7,7 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,1$
Perirenalis zsír	$0,46 \pm 0,02$	$5,8 \pm 0,9$	$0,9 \pm 0,2$
TRBF	$5,01 \pm 0,22$	100	100
ÁM-TRBF	$4,97 \pm 0,22$		

F: Véráramlás  $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

K%: Az egyes tárolók/compartmentek/%-os nagysága

F%: Áramlás a TRBF %-ban

ÁM-TRBF: Elektromagnetikus áramlásmérővel mért TRBF

A 9 állatban  $Rb^{86}$ -tal mérve a TRBF  $4,45 \pm 0,40$ , az ennek megfelelő xenon áramlás  $4,99 \pm 0,39$ , ezalatt az áramlásmérővel mért érték pedig  $5,20 \pm 0,43 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  volt (II. sz. táblázat).

#### II. sz. táblázat

A vese nutritív véráramlása ( $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ )  $Rb^{86}$ -felvétel és  $Xe^{133}$ -kimosás alapján számolva (9 mérés átlaga)

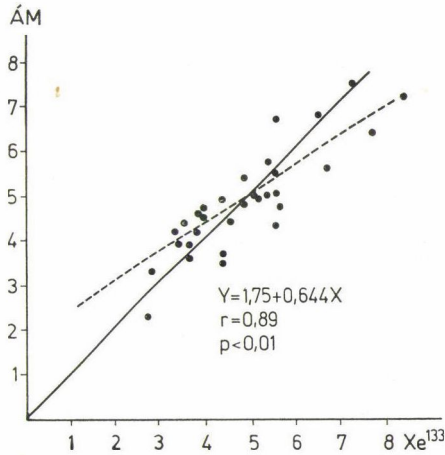
	$Rb^{86}$	$Xe^{133}$
Kéreg	$5,28 \pm 0,62$	$7,52 \pm 0,43$
Külső velő	$2,84 \pm 0,36$	$2,60 \pm 0,15$
Belső belő	$1,26 \pm 0,32$	$0,42 \pm 0,07$
Perirenalis zsír		$0,50 \pm 0,10$
TRBF	$4,45 \pm 0,40$	$4,99 \pm 0,39$
ÁM-TRBF		$5,20 \pm 0,43$

TRBF: A teljes vesevéráramlás

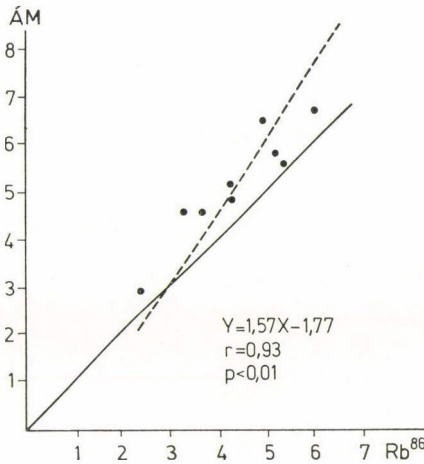
ÁM-TRBF: Elektromagnetikus áramlásmérővel mért TRBF

A xenonnal és az elektromagnetikus áramlásmérővel nyert áramlási értékek átlaga között nincsen szignifikáns különbség. A rubidium és a xenon átlagok, valamint a rubidium és az áramlásmérő átlagok közötti különbségek szignifikánsak ( $p < 0,05$ ). A xenonnal mért kéregáramlás is szignifikánsan



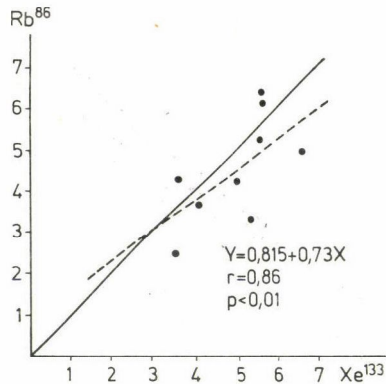


2. ábra: Xe<sup>133</sup>-mal és elektromagnetikus áramlásmérővel mért TRBF (ml · g<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>) közti összefüggés

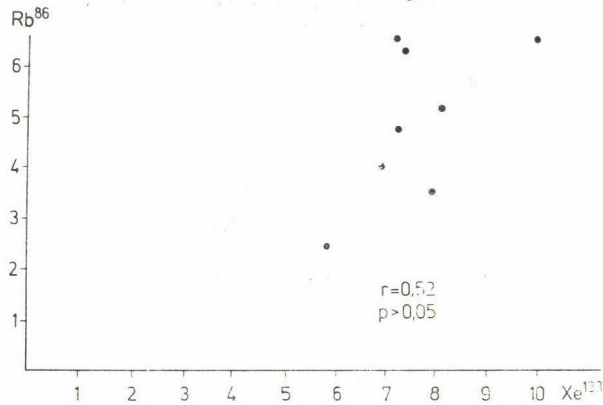


3. ábra: Rb<sup>86</sup>-tal és elektromagnetikus áramlásmérővel mért TRBF (ml · g<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>) közt összefüggés

magasabb, mint a rubidium-kéregáramlás, a külső velő átlagértékei közel azonosak, a belső velőnél pedig a rubidium-értékek átlaga közel háromszorosa a xenonénak. A Xe-TRBF és az ÁM-TRBF értékek között a korreláció szignifikáns ( $r = 0,89$ ;  $p < 0,01$ ) hasonlóképpen a Rb-TRBF és az ÁM-TRBF értékei között ( $r = 0,93$ ;  $p < 0,01$ ), valamint a Rb-TRBF és a Xe-TRBF között is ( $r = 0,86$ ;  $p < 0,01$ ). (2, 3, 4. sz. ábra.) Nem volt szignifikáns korreláció, azonban az egyes veserészek rubidiummal és xenonnal mért áramlásai között (Rb-Xe: kéreg:  $r = 0,52$ ;  $p > 0,05$ ; külső velő:  $r = 0,46$ ;  $p > 0,05$ ; belső velő:  $r = 0,17$ ;  $p > 0,05$ ). (5, 6. 7. sz. ábra.)



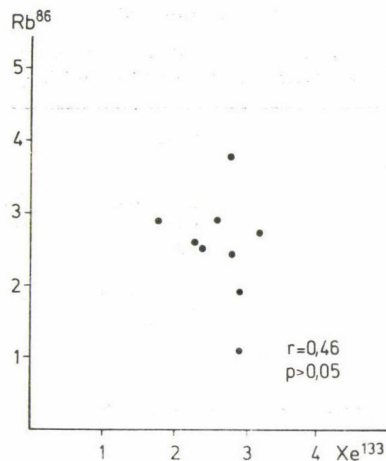
4. ábra: Xe<sup>133</sup>-mal és Rb<sup>86</sup>-tal mért TRBF (ml · g<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>) közti összefüggés



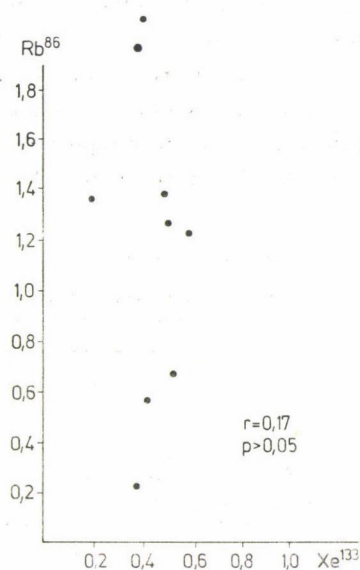
5. ábra: Xe<sup>133</sup>-mal és Rb<sup>86</sup>-tal mért kéreg véráramlás közötti összefüggés

14 kutyában az uréter elzárás hatására a nyomás fokozatosan 50–90 Hgmm-re emelkedett és a maximum elérése után legtöbbször néhány Hgmm-rel csökkent. Az artériás vérnyomás állandó volt vagy kissé emelkedett. Az elektromagnetikus áramlásmérővel kapott vesevéráramlás kezdetben emelkedett, majd csökkent. A csökkenés legkifejezettebb az uréter nyomás stabilizálódása után volt. A kísérlet végén 7 esetben alacsonyabb, 5 esetben ugyanakkora, 2 esetben pedig magasabb volt az áramlás, mint a kiindulási érték. Az átlagos vesevéráramlás  $256 \pm 15$  ml · min<sup>-1</sup>-ről  $224 \pm 12$  ml · min<sup>-1</sup>-re csökkent ( $p < 0,05$ ), a változás átlaga  $-9,2 \pm 4,4\%$ . Az uréter elzárt vese megduzzadt és a kísérlet végére súlya átlagosan  $21,7 \pm 2,2\%$ -kal nagyobb lett, mint az ellenoldali veséé.

A rubidiummal meghatározott TRBF jelentősen csökkent: a nem elzárt és a lekötött uréterű vesék közötti különbség  $36,8 \pm 3,0\%$ . Az áramlásmérő-



6. ábra: Xe<sup>133</sup>-mal és Rb<sup>86</sup>-tal mért külső velő véráramlás közötti összefüggés



7. ábra: Xe<sup>133</sup>-mal és Rb<sup>86</sup>-tal mért belső velő véráramlás közötti összefüggés

vel mért súlyegységre vonatkoztatott TRBF csak  $19,4 \pm 4,7\%$ -kal csökkent ( $p < 0,01$ ). A Rb-TRBF/ÁM-TRBF arány a kontrollhoz képest  $0,923 \pm 0,035$ -ről  $0,705 \pm 0,064$ -re csökkent ( $p < 0,01$ ). Ugyanakkor a Rb-módszerrel kifejezett intrarenális véráramlás átrendeződés volt megfigyelhető. A kéri áramlás az elzárt uréterű vesében  $38,1\%$ -kal csökkent, a külső velőben  $67,8\%$ -kal, a belső velőben pedig  $70,5\%$ -kal esett az áramlás (III. sz. táblázat) Ezzel szemben a xenon kimosás alapján számított TRBF  $23\%$ -kal emelkedett

## III. sz. táblázat

Az uréter elzárás hatása a vese véráramlására, illetve a véráramlás intrarenális megoszlására Rb<sup>86</sup>-felvétel alapján számolva, ml · g<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>. (14 mérés átlaga)

	Normál vese	Elzárt vese
Kéreg	4,59 ± 0,47	2,86 ± 0,25
Külső velő	3,01 ± 0,33	0,97 ± 0,19
Belső velő	1,32 ± 0,22	0,39 ± 0,08
Rb-TRBF	4,16 ± 0,30	2,46 ± 0,25
ÁM-TRBF	4,58* ± 0,28	3,54 ± 0,24
Vesesúly (g)	57,3 ± 6,2	70,6 ± 9,4

\* Az áramlásmérővel az elzárás előtt mért érték, az ellenkező oldali vesesúlyra számítva.

( $p < 0,05$ ). A xenon kimosással egyidejűleg áramlásmérővel mért és szövet súlyegységre számított TRBF a kísérlet végére 16,4%-kal csökkent. Ezért a Xe-TRBF/ÁM-TRBF arány a kontroll 0,932 ± 0,98-ről az elzárás alatt 1,365 ± 0,12-re emelkedett ( $p < 0,05$ ).

A Xe-módszerrel mérve nem találtunk intrarenális véráramlási átrendeződést az uréter elzárás hatására. Az első compartmenten, tehát feltételezhetően a kérgen, keresztül áramlott a kontroll állapotban a teljes vesevéráramlás 87,8 ± 6,1%-a, az uréter elzárás után pedig 86,3 ± 5,9%-a ( $p > 0,05$ ). (IV. sz. táblázat.)

## IV. sz. táblázat

Az uréter elzárás hatása a vese véráramlásra, illetve a véráramlás intrarenális megoszlására Xe<sup>133</sup>-kimosás alapján számolva, ml · g<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup> (14 mérés átlaga)

	Uréter elzárás előtt		Uréter elzárás után	
	F	K%	F	K%
Kéreg	5,85 ± 0,53	62,4 ± 4,6	6,95 ± 0,56	62,1 ± 5,6
Külső velő	1,59 ± 0,25	20,4 ± 2,9	1,80 ± 0,19	22,1 ± 3,8
Belső velő	0,35 ± 0,09	8,8 ± 1,4	0,37 ± 0,03	6,4 ± 1,5
Perirenalis zsír	0,52 ± 0,09	8,3 ± 2,3	0,63 ± 0,13	9,5 ± 2,1
Xe-TRBF	4,09 ± 0,40	100	4,92 ± 0,55	100
ÁM-TRBF	4,53 ± 0,29	100	3,73 ± 0,16	100

Xe<sup>133</sup>-TRBF: A Xe<sup>133</sup>-kimosás alapján számított TRBF

ÁM-TRBF: Az elektromagnetikus áramlásmérővel mért TRBF

## Megbeszélés

Az elektromagnetikus áramlásmérővel és a xenon-kimosási módszerrel altatott kutyában normális körülmények között mért vesevéráramlási értékek jól egyeznek. A Rb-módszerrel nyert értékek ennél valamivel alacsonyabbak,

de az elektromagnetikus áramlásmérővel és a Rb-módszerrel, valamint a Xe-kimosási módszerrel és a Rb-módszerrel kapott értékek között szoros korreláció áll fenn. A vesevéráramlási értékekben mutatkozó szoros korreláció ellenére a Xe-kimosási és a Rb-módszerrel meghatározott kéreg-, valamint velővéráramlás, vagyis a vesevéráramlás intrarenális megoszlására vonatkozó értékek között nem mutatható ki korreláció.

A Rb-módszernél a renális szöveteknek jól meghatározott részét vágjuk ki és az abban talált aktivitás alapján számoljuk a súlyegységre vonatkozó véráramlást, (Hársing és mtsai, 1966). A Xe-módszernél az eredő görbe monoexponenciális összetevői adják az egyes rétegekből való eliminációs sebességet. A négy egyenes meredeksége jelentősen különbözik egymástól és az autoradiographiás vizsgálatokkal azt találták, hogy ezek általában a kéreg, a külső-, a belső velő, valamint a perirenális zsírszövet áramlását jellemzik (Thornburn és mtsai, 1963).

A jelzett mikroszferákkal végzett vizsgálatok bizonyítják, hogy a kéreg áramlása az egyes mesterségesen szétválasztott rétegeken belül is eltérő (Katz és mtsai, 1971; Slotkoff és mtsai, 1971). Tehát a xenon-kimosási görbének látszólag egységes első monoexponenciális összetevője végső soron megszámlálhatatlan komponens összege, amely komponensek között lépcsőzetes áramlási különbségek, átmenetek vannak.

Ha feltételezzük például, hogy adott esetben a legbelsőbb kérgi zóna áramlása a vascularis ellenállás növekedése miatt úgy csökken, hogy inkább a külső velő véráramlásához válik hasonlónak, akkor az első monoexponenciális görbe, amely általában a kérgi áramlást jellemzi, most csak külső kortikális területek áramlását reprezentálja. Ennek megfelelően megnő a második compartmenten átáramló vér mennyisége, amely ebben az esetben a külső velőn kívül a legbelsőbb kéregrész áramlását is tartalmazza.

Kísérletünkben ugyanabban az állatban a perfúziós nyomásnak már kis változása jelentős eltérésre vezetett az első tároló (compartment) nagyságában anélkül, hogy különösebb változást kaptunk volna az ugyanabból a kimosási görbéből meghatározott TRBF-ben. Ennek megfelelően az első compartment nagysága 35%-tól 74%-ig (átlag 57%) terjedt, a második compartmenté pedig 12%-tól 42%-ig (átlag 25,5%).

Uréter elzárás alatt a második kísérlet-sorozatban 1—1 $\frac{1}{2}$  óra után a direkt úton mért teljes vesevéráramlás szignifikánsan csökkent, annak ellenére, hogy az első félórán jelentős emelkedés volt. Az irodalomban található eltérő eredmények tehát a különböző időpontban történő méréssel részben magyarázhatók. (Franklin és Selkurt; 1964, Gilmore, 1964; Selkurt, 1963). A súlyegységre számított áramlás még változatlan TRBF mellett is csökken az elzárás hatására létrejövő oedema miatt. Uréter elzárás hatására az elektromagnetikus áramlásmérővel, a rubidium-módszerrel, valamint a xenon kimosási technikával kapott vesevéráramlási értékek között jelentős különbségek

jöttek létre. A kísérlet végére a xenon-áramlás magasabb, a rubidium-áramlás pedig alacsonyabb lett, mint a kissé csökkent direkt úton nyert TRBF-érték. A három módszerrel mért TRBF értékek között normális állapotban meglevő szignifikáns korreláció is megszűnt.

A két kísérletsorozat között viszont nem volt elvi különbség és az uréter-elzárásos kísérletek kontroll értékei is jól egyeztek az előző sorozat áramlás-értékeivel. Másrészt a xenon és rubidium-áramlás mérések ugyanabban az állatban történtek. Ezért az uréter elzárás hatására a két módszerrel észlelt ellenkező irányú változások nem magyarázhatók a kísérleti körülmények különbözőségével, hanem csak a módszerekben rejlő okokkal.

A  $K^{42}$ , illetve a  $Rb^{86}$  azért alkalmas véráramlás mérésére, mert gyors injekciós beadás után az extrakciós hányadosuk magas és a legtöbb szervben egyforma. Az első keringésnél a szervekből kifolyó vénás vérben található mennyiségük igen csekély, tehát a szervek közötti megoszlásuk a véráramlással arányos (Sapirstein, 1956, 1958). Ez csak akkor lehetséges, ha az indikátor transzportja a vérből a szövetekbe akadálytalan, nem függ az áramlás nagyságától, vagyis a diffúziós sebessége és eloszlási tere a szövetekben elég nagy. A Rb ion a transzport szempontjából a K ionhoz hasonlóan viselkedik.

Uréter elzárás alatt a  $Rb^{86}$  teljes megoszlási tere, azaz a vesén belüli kicserélhető kálium-mennyiség nem változott, viszont a létrejött oedema miatt az egységnyi szövetre vonatkoztatva csökkent. Az egységnyi súlyú szövet véráramlásához tartozó kálium-raktárnak a csökkenése gátolhatja a  $Rb^{86}$ -felvételt. Meghosszabbodott ugyanakkor a szöveti oedema következtében a kapillárisok és a celluláris kálium készlet közötti diffúziós út is. Mindez csökkentheti az indikátor felvételét és így a számított áramlás hamisan alacsony értékéhez vezethet.

Mivel a folyadék akkumuláció a velőben nagyobb, mint a kéregben, ez a hiba velőnél különösen kifejezett lehet. Ez magyarázhatná a Rb-módszerrel kapott intrarenális áramlási átrendeződést. A rubidium áramlásnak az uréter elzárás hatására létrejövő változásának ez a magyarázata feltételezéseken alapszik, és ezek bizonytalansága miatt a vesén belül létrejövő tényleges véráramlás átrendeződés lehetőségét nem zárhatjuk ki.

Az inert gáz kimosási módszerekkel meghatározható az egységnyi súlyra eső véráramlás, ha ismert az illető gáznak a szövetekből való eltűnési sebessége, valamint a megoszlási hányadosa (Kety, 1951; Thornburn és mtsai, 1963). A  $Xe^{133}$  szövet/vér megoszlási hányados értéke 50-es haematokrit esetén 0,7 (Andersen és Ladefoged, 1965; 1967; Ladefoged és Pedersen, 1968). A  $Xe^{133}$ -nak vérben, fehérjében, zsírban és sóoldatban mért oldási adataiból (Miyazaki és McNay, 1971; Yeh és Peterson, 1963, 1965) kiszámítható, hogy a vizelet retentioja következtében, amely a vesesúlyok átlag 22%-os emelkedését eredményezte, a megoszlási hányados jelentősen csökken és ez számításunk szerint a TRBF-érték 10–12%-os felülbecsüléséhez vezet. A xe-

non-technikával kapott magas vesevéráramlási értékeket (36%-os növekedést) ez csak részben magyarázza meg.

A xenon-módszerrel uréter elzárás alatt véráramlási átrendeződés nem mérhető. A vese ellenáramlásos mechanizmusa azonban a velőből az inert gáz kimosását jelentősen módosíthatja. Lehetséges ezért, hogy a velőre kapott értékek nem a tényleges áramlást jelentik. Éppen ezért az, hogy a xenon-módszerrel nem kaptunk vesén belüli áramlási átrendeződést, nem zárja ki a rubidiummal talált redistributio meglétét.

### Összefoglalás

Kísérleteinkben különböző módszerekkel vizsgáltuk altatott kutyában normális körülmények között és uréter elzárás alatt a teljes vesevéráramlást és a véráramlás vesén belüli megoszlását. A  $Xe^{133}$  és  $Rb^{86}$ -módszerrel, valamint az elektromagnetikus áramlásmérővel kapott teljes vesevéráramlási értékek normális állatokban egymással megegyeznek, de a Xe és Rb módszerrel kapott intrarenális áramlás megoszlási értékei egymással nem összevethetők. Mérsékelt fokú mannit diuresisben az uréter elzárás hatására a xenon-veseáramlás magasabb, a rubidium-áramlás pedig alacsonyabb, mint az áramlásmérővel mért érték. Rubidiummal mérve a véráramlás intrarenális redistribúciója jött létre, xenonnal mérve a véráramlás megoszlása nem változott.

### IRODALOM

- Andersen, A. M. és Ladefoged: Scand. J. Clin. Lab. Invest. **19**, 72. (1967).  
 Andersen, A. M. és Ladefoged: J. Pharm. Sci. **34**, 1684. (1965).  
 Carlson, E. I. és H. V. Sparks: Circ. Res. **26**, 601. (1970).  
 Franklin, D. N. és E. E. Selkurt: Circ. Res. Suppl. I., 143. (1964).  
 Gilmore, J. P.: Am. J. Physiol. **206**, 707. (1964).  
 Gosk, A., W. Juzua, A. Paradowski és A. Kurbril: Acta Physiol. Polonica. **17**, 145. (1966).  
 Hársing, L., J. Bartha, T. Harza és K. Pelley: Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **30**, 215. (1966).  
 Hársing, L., G. Szántó és J. Bartha: Am. J. Physiol. **213**, 935. (1967).  
 Katz, M. A., R. C. Blantz, Jr. F. C. Rector és D. W. Seldin: Am. J. Physiol. **220**, 1903. (1971).  
 Kety, S. S.: Pharmacol. Rev. **3**, 1. (1951).  
 Ladefoged, J. és Pedersen, F.: Pflügers Archiv. **299**, 30. (1968).  
 Miyazaki, M. és J. McNay: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **138**, 454. (1971).  
 Morrison, T. J. és N. B. Johnston: J. Chem. Soc. 3441. (1954).  
 Sapirstein, L. A.: Circ. Res. **4**, 689. (1956).  
 Sapirstein, L. A.: Am. J. Physiol. **193**, 161. (1958).  
 Selkurt, E.: Am. J. Physiol. **105**, 286. (1963).  
 Slotkoff, L. M., A. Lozar, P. Yose, J. D'Avello és G. M. Assner: Circ. Res. **28**, 158. (1971).  
 Thorburn, G. D., H. H. Kopald, J. A. Herd, M. Hoüllenberg, C. C. C. O'Morchoe és A. C. Berger: Circ. Res. **13**, 290. (1963).  
 O'Morchoe és A. C. Berger: Circ. Res. **13**, 290. (1963).  
 Truniger, B., S. M. Rosen és D. E. Oken: Kli n. Wschr. **44**, 857. (1965).  
 Yeh, S. Y. és R. E. Peterson: J. Pharm. Sci. **52**, 453. (1963).  
 Yeh, S. Y. és R. E. Peterson: J. Appl. Physiol. **20**, 1041. (1965).





## PROSZTAGLANDINOK ÉS A PETEFÉSZEK VÉRÁRAMLÁSA KUTYÁBAN

VARGA BERTALAN, az orvostudományok kandidátusa, UNGVÁRY GYÖRGY,\* az orvostudományok kandidátusa, és FOLLY GÁBOR

Közlésre érkezett: 1976. VII. 15.

Az uteruszban a ciklustól (Bland és mtsai, 1971; Saksena és mtsai, 1971) és a terhességtől (Salmon és Amy, 1973) függően változó mennyiségű prosztaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) képződik. A  $PGF_{2\alpha}$  tengerimalacban (Blatchley és Donovan, 1969), patkányban (Pharris, 1971), nyúlban (Koering, 1974) és primátákban (Auletta és mtsai, 1973) luteolitikus hatású. Az uterusz luteolitikus faktora feltehetően azonos a  $PGF_{2\alpha}$ -val (Pharris, 1971; McCracken, 1971; Bland és mtsai, 1971), hatása az utero-ovarialis erek épségéhez kötött (Baird és Land, 1973). Az utero-ovarialis véna és az a. ovarica között egy „counter current” mechanizmus működne a luteolitikus faktor, azaz a  $PGF_{2\alpha}$  petefészekbe történő veno-arterialis bejuttatásának biztosítására, ami ott érszűkületet okozva a sárgatest regresszióját segíti elő (McCracken, 1971; Hixon és Hansel, 1974). Más adatok szerint juhban a  $PGF_{2\alpha}$  csökkenti a progeszteron szekréciót, de a petefészek véráramlását nem (Baird, 1974). Álterhes nyúlban fokozza a petefészek stromában a véráramlást, miközben a sárgatestben csökkenti (Novy és Cook, 1973). Mások hasonló kísérletben csak a stroma véráramlás növekedését észlelték (Janson és mtsai, 1975). Kutyában az exogén  $PGF_{2\alpha}$  csökkenti a petefészek progeszteron szekrécióját, a petefészek véráramlását azonban nem vizsgálták (Jöchle és mtsai, 1973).

Prosztaglandinok nemcsak az uteruszból juthatnak a petefészekbe. Gonadotrop hormon stimulusra mind a  $PGF_{2\alpha}$ , mind a prosztaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) szintézise fokozódik a petefészekben (LeMaire és mtsai, 1973; Bauminger és Lindner, 1975).

A fentiek szerint a petefészek érszerkezetének különös jelentősége van a prosztaglandinok ovarialis ciklust szabályozó hatásának létrejöttében. Kutyában tanulmányoztuk a petefészek érszerkezetét, a  $PGF_{2\alpha}$ -nak és  $PGE_2$ -nek a petefészek teljes és helyi véráramlására gyakorolt hatását. A változások értelmezésénél ezeket együttesen vettük figyelembe.

\*Munkahelye: Országos Munkaegészségügyi Intézet, Budapest.

### Módszerek

Kísérleteinket 10—20 kg súlyú, főként anösztruzsos, chloralose-urethannal altatott kutyákon végeztük.

#### *A petefészek keringési ellenállásának (a perfúziós nyomásnak) mérése:*

19 állatban a petefészeket a környező zsírszövetből és az uterusz szarvtól „in situ” izoláltuk. Mindkét oldalon kanülöztük a v. és az a. ovarica-t. A két a. ovarica-t a bal a. femoralisból kétesaternás perisztaltikus pumpával konstans volumenű vérrrel átáramoltattuk. Az ovariumok az állatok súlyától és a kívánt perfúziós nyomástól (100—120 Hgmm) függően 3—5 ml/min volumenű vért kaptak. Az a. ovarica-ba való csatlakozáshoz közel a kanülbe két elágazást építettünk: az egyikben Statham nyomásátalakítóval mértük és regisztráltuk a perfúziós nyomást, a másikban egy infúziós pumpa segítségével véletlen sorrendben a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  és  $\text{PGE}_2$  (Upjohn) dózisait adtuk be 0,1 ml/min vagy ennél kisebb volumenben 15 percen át. A két v. ovarica vérért a jobb v. jugulárisba csatlakoztattuk. Az infúzió alatt a csatlakozást megszakítottuk, nehogy az alkalmazott anyagok a szisztémás keringésbe kerüljenek. A véráramlást heparinnal (Richter) gátoltuk.

#### *A lokális véráramlás mérése:*

20 kutyában mindkét oldali petefészek stromájába a hossz tengellyel párhuzamosan a véráramlás változások folyamatos regisztrálására egy-egy hajlékony fűthető termoelemet (Hensel és Ruef, 1954) helyeztünk. A hővezetés elvén működő módszerek jól alkalmazhatók a lokális szöveti véráramlás minőségi változásainak folyamatos regisztrálására (McCaffrey és McCook, 1975). A véráramlás változásait a nyugalmi értékhez (100%) és az állat elpusztulása után kapott (0%) értékhez viszonyítva százalékban adtuk meg. A vérnyomást az a. femoralisban mértük Statham nyomásátalakítóval. Mivel a PG-ok jelentősen hatnak a szisztémás vérkeringésre, lokális alkalmazásuk szükséges volt. Az a. ovarica-ba való közvetlen csatlakozás nem volt megoldható, egyrészt az ér lumen beszűkítése miatt, másrészt az ér kanülözése heparinozást igényel, ez viszont a termoelem körüli hematoma kialakulásához vezethet. Ezek elkerülésére a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -t és  $\text{PGE}_2$ -t a bursa ovarica-ba adtuk egy vékony kanülon át 15 perces infúzióban, 0,1 ml/min volumenben. Az előkísérletek szerint a bursa ovaricából felszívódásuk jó, így a lokális adagolásnak ezt a módját alkalmaztuk.

### *Statisztikai analízis:*

A meghatározott idő alatt bekövetkezett változások nagyságát (görbe alatti terület) kiszámítottuk és variancia analízissel, illetve „t” próbával azokat egymáshoz hasonlítottuk.

### *Morfológiai módszerek:*

Anösztroszos és ösztroszos kutyákban izoláltuk a petefészkeket és kanülöztük az a. és v. ovarica-t. Az artériás és vénás rendszert különböző színű latex-al, illetve higított tusban oldott 1—3%-os zselatinnal töltöttük fel. Más esetekben a petefészkeket az uterusz szarvtól nem izoláltuk és az ovárium erek kanülözésén kívül mindkét méhszarv artériáját és vénáját is kanülöztük. Ekkor az ovárium irányából az uterusz, és fordítva, az uterusz irányából az ovárium erei egyaránt feltölthetők voltak. A szerveket az állatok elpusztulása után kiemeltük és a latex-al töltött preparátumokat sósavban korrodáltuk. A zselatinos tussal injiciált anyagot formalinban fixáltuk és fagyasztva sorozatban metsztük (40—100 $\mu$ ), majd Spalteholz (1948) szerint átderítettük. Mindkét eljárással nyert preparátumokat sztereofénymikroszkóppal vizsgáltuk. A vastag metszeteket „Amplival” mikroszkóp demonstrációs feltétjének koordináta rendszerére vetítettük és ennek segítségével térbeli rekonstrukciót végeztünk.

## *Eredmények*

### *A PGF<sub>2 $\alpha$</sub> és a PGE<sub>2</sub> hatása a petefészek véráramlására*

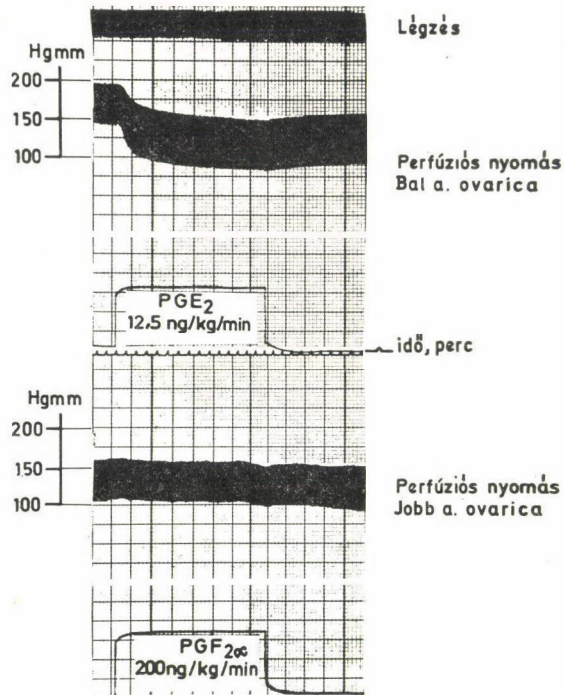
Az „in situ” izolált petefészekben a PGE<sub>2</sub> csökkenti a perfúziós nyomást, értágulatot okoz. Az ellenkező oldalra adott PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  hatástalan (1. ábra). A PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  dózisa 25,0—50,0—100,0 és 200,0 ng/kg/min tartományban nem okoznak következetes változást. A PGE<sub>2</sub> 3,1—6,2—12,5—25,0 ng/kg/min dózisainak perfúziós nyomást csökkentő hatása arányos a dózisok nagyságával (2. ábra).

PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  és PGE<sub>2</sub> a bursa ovaricaba adva jelentősen megnöveli a lokális véráramlást a petefészek stromájában (3. ábra). Az áramlásnövekedés dózis függő, összefügg a PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  25,0—50,0—100,0—200,0 ng/kg/min, valamint PGE<sub>2</sub> 25,0—50,0—100,0 ng/kg/min dózisaival nagyságával. A PGE<sub>2</sub> a véráramlást lényegesen jobban növeli, mint a PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (4. ábra).

A PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  bursa ovaricába történő infúziója után a stroma megnövekedett véráramlásában sinus-hullámszerűen ismétlődő periodikus változások figyel-

hetők meg (3. ábra). Adatainkból nem ítéltető meg, hogy az előfordulás gyakorisága mennyiben függ a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dózisaitól, viszont frekvenciája közel azonos az összes dózisok esetében (1. táblázat).

Kutyában általában évente kétszer van ösztrusz (tüzelés). Az ováriumok aktív állapota 20–30 napig tart. Mivel kísérleteink éves periódust fog-

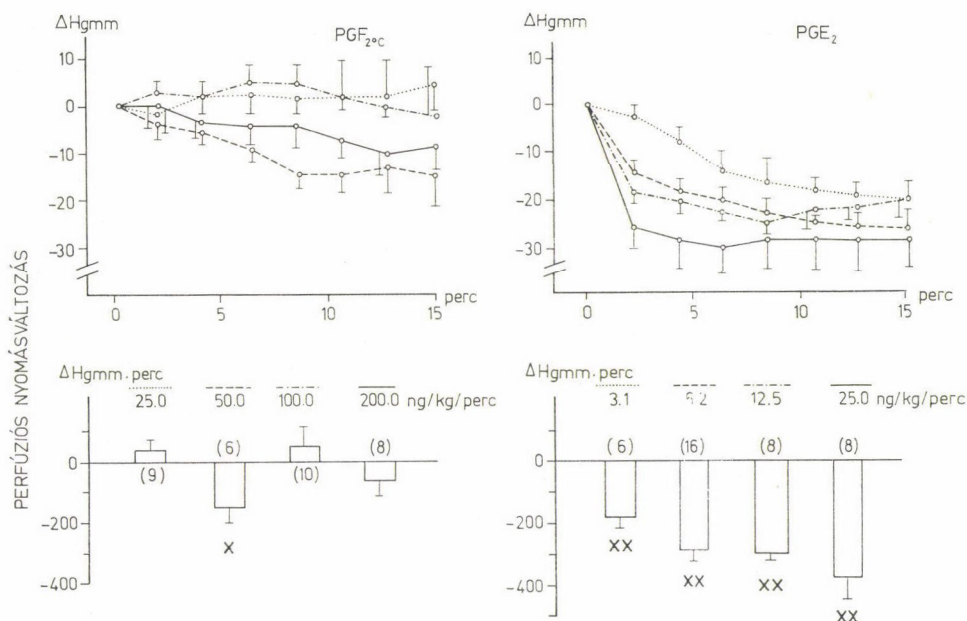


1. ábra: A  $\text{PGE}_2$  és  $\text{PGF}_{2\alpha}$  hatása „in situ” izolált petefészekben a perfúziós nyomásra

I. táblázat

A petefészek stroma lokális véráramlásának ritmikus változása a bursa ovarica-ba adott 15 perces  $\text{PGF}_{2\alpha}$  infúzió után

$\text{PGF}_{2\alpha}$ dózis (ng/kg/min)	Az előfordulás gyakorisága	Periódus/min
50,0	3/5	0,445
100,0	2/6	0,440
200,0	4/5	0,485



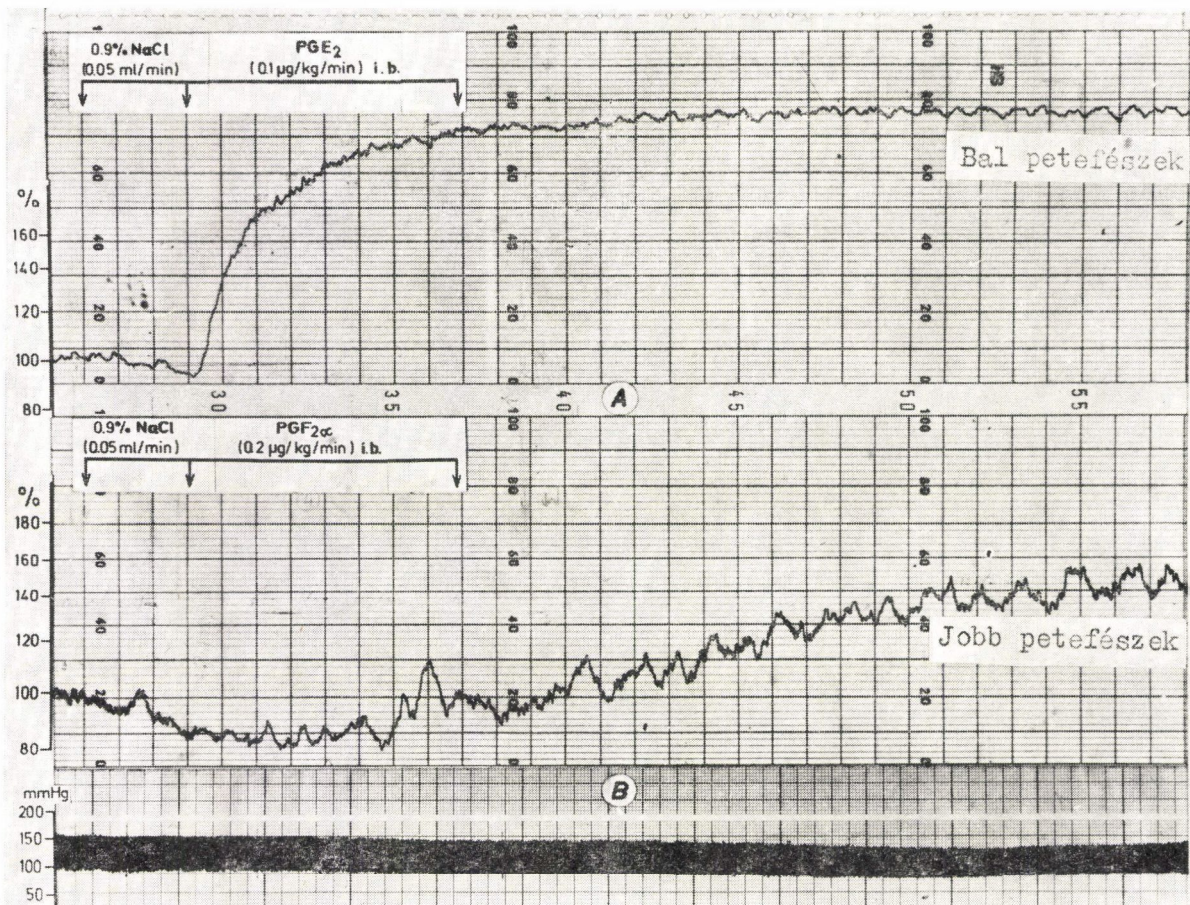
2. ábra: Különböző dóziszú PGF<sub>2α</sub> és PGE<sub>2</sub> hatása a perfúziós középnyomásra. ΔHgmm = eltérés a kiindulási értéktől. ΔHgmm · perc = a 15 perces infúzió alatti változások összege.  $\bar{x}$  = átlag ± S. E. = a kísérletek száma. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01

nak át, néhány ösztrozusban levő kutyán is elvégeztük a fenti vizsgálatokat. Szembetűnő különbség az ösztrozusos és anösztrozusos állatok között nem volt megfigyelhető.

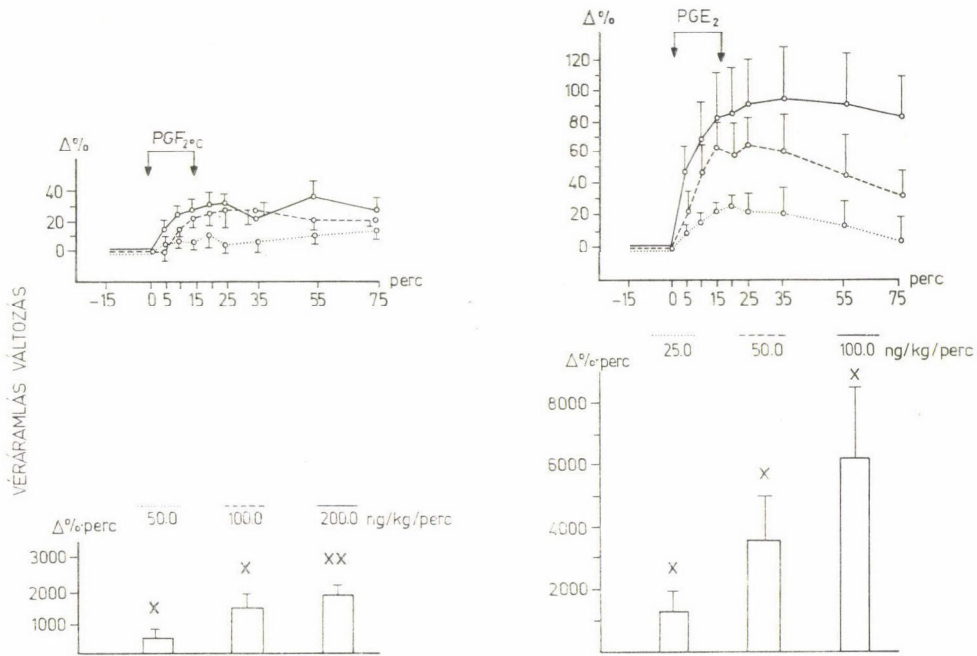
### Morfológiai vizsgálatok

A petefészek artériás és vénás rendszere a genitális vasculáris arcad részét képezi. Az ováriumot ellátó artériák a genitális arcadból spirál alakban lépnek a petefészek hilusába. A petefészekből a genitális arcadba két nagyobb véna csatlakozik, szorosan összefonódva az artériás ágakkal. A hilusban és a strómában mind a vénák, mind az artériák között saját rendszeren belüli (veno-venosus, arterio-arteriális,) és több arterio-venosus anasztomózis figyelhető meg (5/a. ábra).

A strómából a kéregbe lépő (secunder) artériák ágainak száma, kalibere, elágazási térségének alakja függ a petefészek funkcionális állapotától. A primér és secunder tüszőt néhány enyhén görbülő artériás kapilláris öleli körül. A follikulus növekedése során a theca sejtjei epitheloid jelleget öltenek és közéjük a számban megsokszorozódott artériákból a theca externa felől számos kapilláris nő be, amelyek bőséges hálózatot alakítanak ki (5/b—c ábra).



3. ábra: A bursa ovarica-ba(i. b.)adott PGE<sub>2</sub> illetve PGF<sub>2α</sub> hatása a petefészek stromájában a szöveti véráramlásra (A) és a vérnyomásra (B). — Időjelzés; az „A” görbe függőleges beosztása 2 perc, a „B” görbe ezzel szinkron



4. ábra: A bursa ovarica-ba adott különböző dózisu  $PGF_{2\alpha}$  és  $PGE_2$  hatása a petefészekstromájában a szöveti véráramlásra.  $\Delta\%$  = eltérés a kiindulási értéktől.  $\Delta\% \cdot perc$  = a 75 perces időtartam alatti százalékos változások összege.  $\bar{Q}$  = átlag  $\pm$  S. E., a kísérletek száma dózisonként = 5, \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$

A cortex felszínének vérellátása szegény. Az artériás és vénás kapillárisok a primér tüszők között a felszínre merőlegesen futnak, de azt nem érik el. A cortex-ben a-v- anasztomózisok nem találhatók. (5/b. ábra).

A sárgatesteket artériákból, arteriolákból, venulákból és vénákból álló érréteg veszi körül, amelyek a sárgatest sejtjei között gazdag kapilláris hálózatot alakítanak ki (5/d. ábra). A sárgatest belsejében az erek kiterjedten anasztomozálnak (5/e—f ábra), az egyik sárgatest vasculáris héja viszont a másik sárgatest vasculáris héjával nem közlekedik. A tüsző és a sárgatest artériás érhálózatának sémás vázlatát a 6. ábra mutatja.

### Megbeszélés

Juhban (Koering, 1974) és tengerimalacban (Horton és Poyser, 1973) igazoltnak látszik, hogy az uterusz luteolitikus faktora azonos a  $PGF_{2\alpha}$ -val. A petefészek és az uterusz szoros vasculáris kapcsolata vezetett arra a feltételezésre, hogy az uteruszban termelődött  $PGF_{2\alpha}$  az utero-ovarialis vénán vasoconstrictiót okozva (Pharris, 1971), vagy juhban egy „counter current” mechanizmus révén a petefészekbe jutva (McCracken, 1971) sárgatest ischémiát

vált ki, ami luteolizishez vezet. Baird (1974)  $\text{PGF}_{2\alpha}$  hatására juh petefészekben nem tudott ischémiát megfigyelni. A  $\text{PGF}_{2\alpha}$  áterhes nyúl petefészkében a vérelszólást változtatta meg úgy, hogy a corpus luteumban csökkenti a véráramlást, a stromában és follikuláris szövetben viszont fokozza (Novy és Cook, 1973). Mások hasonló kísérletben csak a petefészek stromájában figyeltek meg véráramlás növekedést, az ovárium többi kompartmentjének véráramlása nem változott (Bruce és Hiller, 1974; Janson és mtsai, 1975). Termoelemes méréseink alapján úgy tűnik, hogy a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  kutyában is fokozza a petefészek stroma véráramlását, a szerv vasculáris ellenállása ugyanakkor változatlan marad. A  $\text{PGF}_{2\alpha}$  tehát a petefészek véráramlásának a szerven belüli elszólását változtatja meg. Ez nem történhet a kéreg rovására, mivel a-v. anasztomózisok kutyákban is, más speciesekhez hasonlóan (Watzka, 1957) csak a hilusban és a stromában mutathatók ki. Valószínűbb, hogy a hilus-stroma határon levő shuntök záródásával és esetleges collateralisok megnyílásával a totál petefészek véráramlás nagyobb hányada lát el nutritív feladatokat a stromában.

A  $\text{PGF}_{2\alpha}$  terhes kutyában csökkenti a progeszteron szekréciót (Jöchle és mtsai, 1973). Fennállhat annak a lehetősége, hogy a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  kutyában is azonos az uterusz luteolitikus faktorával. Az utero-ovariális érszerkezet kutyában is megfelel azoknak a követelményeknek, amelyek alapján más speciesekben a „counter current” mechanizmust feltételezik. Vitatott azonban, hogy a veno-arterialis specialis anyagtranszport az uterusz és a petefészek között fiziológias körülmények között létezik-e (Coudert és mtsai, 1974). Kísérleteink alapján viszont nem valószínű, hogy a luteolizis kialakulásában ischémiának elsődleges szerepe lenne.

A sárgatest vérrellátása a bőséges anasztomózissal rendelkező érburok által különlegesen biztosított. A kapilláris hálózat rendkívül bő, minden sejtet kapilláris ölel körül. Ez lehetőséget biztosít arra, hogy a vérbe érkező trofikus vagy litikus agens egyidőben érje el az összes sejteket, és a gyors funkcionális változások végbemehessenek.

A bursa ovarica-ba adott  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a kísérletek nagy részében jellegzetes ritmikus változást idézett elő a petefészek véráramlásában. A kb. 2 percenként ismétlődő hullámok kialakulása feltehetően a petefészekben jelentős mennyiségben található simaizomelemek kontrakciós tevékenységével függ össze. A  $\text{PGE}_2$  adagolása után hasonló változás nem figyelhető meg. Észlelésünk összhangban van azokkal az adatokkal, miszerint a petefészek kontrakciós elemeit az  $\text{PGF}_{2\alpha}$  összehúzóásra serkenti, a  $\text{PGE}_2$  viszont elernyeszti (Virutamases és mtsai, 1972; O'Sea és Phillips, 1974).

Kutyában az ACTH jelentősen fokozza a petefészek véráramlását (Stark és mtsai, 1967; Stark és Varga, 1968). Az ACTH-hoz hasonló hatást fejt ki a  $\text{PGE}_2$ , az ACTH hatása viszont prosztoglandin szintézist gátló indomethacin-nal jelentősen csökkenthető. Úgy tűnik, hogy az ACTH véráramlást stimuláló hatásában a  $\text{PGE}_2$  mediátor (Stark és Varga, 1975). A gonadotrop hormonok



közül az LH vált ki vérbőséget a petefészekben (Wurtman, 1964), bár anösztruszos kutyában akut hatását nem tudtuk megfigyelni (Stark és Varga, 1968). A tüszőérés és az LH stimulus során a  $\text{PGE}_2$  és a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  fokozott mennyiségben képződik a petefészekben (LeMaire és mtsai, 1973; Bauminger és Lindner, 1975). A keletkezett prosztaglandinoknak a szteroidogenezisben (Kuehl 1974; Marsch és LeMaire, 1974) és az ovuláció folyamatában (Virutamasen és mtsai, 1972; O'Sea és Phillips 1974; Richman és mtsai, 1974) tulajdonítanak fontos szerepet. Eredményeink arra utalnak, hogy a  $\text{PGE}_2$  a petefészek teljes (totál) és helyi (szöveti) véráramlásnak szabályozásában egyaránt szerepet játszhat, míg a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a petefészekben belül a véreloszlás megváltozását okozhatja. Mindezeknek fokozott jelentőségük lehet az ösztrusz és a terhesség alatt, amikor a petefészek megnagyobbodik és benne a különböző szövetféleségek aránya megváltozik.

### *Köszönetnyilvánítás!*

Ezúton mondunk köszönetet Kiss Zsuzsannának, Töreky Gézánének és Horváth Jánosnak a kiváló technikai segítségért. A kísérleteinkben használt prosztaglandinokat Dr. J. E. Pike (Upjohn Co., Kalamazoo, U. S. A.) bocsátotta rendelkezésünkre.

### *Összefoglalás*

Az ovarialis ciklus különböző szakaszában levő kutyákat chloraloseurethannal altatták és középső laparotómiát végeztek. Az állatok egyik csoportjában a petefészeket „in situ” izolálták és mérték a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  és  $\text{PGE}_2$  hatását a perfúziós nyomásra, amelynek változásából a szerv teljes, (totál) véráramlására következtek. Az állatok másik csoportjában, a petefészek erek érintése nélkül, termoelemtel vezettek mindkétoldali petefészek stromájába és mérték a bursa ovarica-ba adott  $\text{PGF}_2 \alpha$  és  $\text{PGE}_2$  hatását a helyi, szöveti véráramlásra. A petefészek érszerkezetét latex és zselatinos tus feltöltéssel vizsgálták. A  $\text{PGF}_{2\alpha}$  25,0—50,0—100,0 és 200,0 ng/kg/min 15 perces i. a. infúziója nem okoz következetes változást a perfúziós nyomásban, ugyanakkor a  $\text{PGE}_2$  3,1—6,2—12,5 és 25,0 ng/kg/min 15 perces i. a. infúziója arányosan a dózisos nagyságával csökkenti azt. A bursa ovarica-ba 15 percig infundált 50,0—100,0 és 200,0 ng/kg/min  $\text{PGF}_{2\alpha}$  vagy 25,0—50,0—100,0 ng/kg/min  $\text{PGE}_2$  a dózisos nagyságával arányosan fokozza a petefészek stromájában a véráramlást. Feltételezésük szerint a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a hilus — stroma határon levő shuntökre hatva, úgy változtatja meg a petefészekben belüli véreloszlást, hogy a teljes véráramlás megváltozása nélkül annak nagyobb hányada áramlik át a stroma kapilláris szerkezetén. A  $\text{PGE}_2$  a petefészek teljes és helyi véráram-

lásának megnövelésére egyaránt képes. A két PG-nak jelentősége az az ovarialis ciklus és terhesség alatt a petefészkekben a véreloszlás és véráramlás szabályozásában.

## IRODALOM

- Auletta, F. J., L. Speroff és V. B. Caldwell:* J. Clin. Endocr. Metab. **36**, 405. (1973).  
*Baird, D. T.:* J. Endocr. **62**, 413. (1974).  
*Baird, D. T. és R. B. Land:* J. Reprod. Fert. **33**, 393. (1973).  
*Bauminger, S. és H. R. Lindner:* Prostaglandins, **9**, 737. (1975).  
*Bland, K. P., E. W. Horton és N. L. Poyser:* Life Sciences, **10**, 509. (1971).  
*Blatchley, F. R. és B. T. Donovan:* Nature, **221**, 1065. (1969).  
*Bruce, N. W. és K. Hillier:* Nature, **249**, 176. (1974).  
*Coudert, S. P., G. D. Phillips, C. Faiman, W. Chernenki és M. Palmer:* J. Reprod. Fert. **36**, 333. (1974).  
*Hensel, H. és J. Ruef:* Pflügers. Arch. **259**, 267. (1954).  
*Hixon, J. E. és W. Hansel:* Biol. Reprod. **11**, 543. (1974).  
*Horton, E. W. és N. L. Poyser:* Brit. J. Pharmacol. **49**, 98. (1973).  
*Janson, P. O., I. Albrecht és K. Ahrén:* Acta Endocrinol. **77**, 337. (1975).  
*Jöchle, W., R. V. Tomlinson és A. C. Anderson:* Prostaglandins, **3**, 209. (1973).  
*Koering, M. J.:* J. Reprod. Fert. **40**, 529. (1974).  
*Kuehl, F. A.:* Prostaglandins, **5**, 325. (1974).  
*LeMaire, W. J., N. S. T. Yang, H. H. Behram és J. M. Marsh:* Prostaglandins, **3**, 367. (1973).  
*Marsh, J. M. és W. J. LeMaire:* J. Clin. Endocr. Metab. **38**, 99. (1974).  
*McCaffrey, T. V. és R. D. McCook:* J. Appl. Physiol. **39**, 170. (1975).  
*McCracken, J.:* Ann. N. Y. Acad. Sci. **180**, 456. (1971).  
*Novy, M. J. és M. J. Cook:* Am. J. Obstet. Gynecol. **117**, 381. (1973).  
*O'Sea, J. D. és R. E. Phillips:* Biol. Reprod. **10**, 370. (1974).  
*Pharris, B.:* Ann. N. Y. Acad. Sci. **180**, 436. (1971).  
*Richman, K. A., K. H. Wright és E. E. Wallach.:* Obstet. Gynecol. **43**, 203. (1974).  
*Saksena, S. K., In-Fai Lau és A. A. Shaikh.:* Fertil. Steril. **25**, 636. (1974).  
*Salmon, J. A. és J. Amy.:* Prostaglandins, **4**, 523. (1973).  
*Spalteholz, A. B.:* In: Romeis, B.: „Mikroskopische Technik“ (16. Neubearbeitete und Auflage) verbesserte R. Oldenburg. München. Wien 210. pp. (1948).  
*Stark, E. és B. Varga.:* Acta med. Acad. Sci. hung. **25**, 367. (1968).  
*Stark, E. és B. Varga.:* Acta med. Acad. Sci. hung. **32**, 329. (1975).  
*Stark, E., B. Varga és Zs. Ács.:* J. Endocr. **37**, 245. (1967).  
*Virutamasen, P., K. H. Wright és E. E. Wallach.:* Fertil. Steril. **23**, 675. (1972).  
*Watzka, M.:* Weibliche Genitalorgane. Das Ovarium. In „Handbuch der Mikroskopischen Anatomie“, Bd. VII. Teil. 3. Springer. Berlin. (1957).  
*Wurtman, R. J.:* Endocrinology, **75**, 927. (1964).

## AZ IMMUNOLÓGIAI SPECIFICITÁS PROBLÉMÁI

GERGELY JÁNOS, az orvostudományok doktora

Közlésre érkezett: 1976. VIII. 16.

Az immunológiai folyamatok legfontosabb jellemzője azok specificitása. Az immunológiai specificitás klasszikus megfogalmazása Landsteiner nevéhez fűződik, aki sokoldalú vizsgálataival igazolta, hogy — kevés kivételtől eltekintve — egy immunsavó jobban reagál a termelődését kiváltó antigénnel, mint más rokon, vagy eltérő szerkezetű struktúrákkal (Landsteiner, 1942). Bár Landsteiner az ellenanyagok specificitásával foglalkozó klasszikus munkáiban viszonylag széles bázisra helyezi az antitestek specifikus reakcióját a megfelelő antigénnel — hiszen rávilágít a rokon-struktúrákkal való reakció lehetőségére, munkái és a kérdésre vonatkozó egyéb kutatások nyomán az immunológiai specificitás fogalma mégis úgy került át a köztudatba, hogy az immunfolyamatok specificitása egy adott antigén determináns, vagy haptén és a csak vele kapcsolatba lépni tudó ellenanyag antigén kötő helye közötti reakcióra szorítkozik. Ennek a felfogásnak joggal adott alapot az a számtalan megfigyelés, amely a megfelelő módon előállított immunsavók monospecificitását igazolta. Ezeknek a vizsgálatoknak „őse” éppen Landsteiner munkáiban található, aki hordozó fehérjéhez kötött haptének sztereoizomérjei között tudott immunsavóival különbséget tenni. Az immunsavók specificitásának illusztrálására jó példa az immunoglobulin molekulák könnyű lánc. Ennek, az általában 214 aminosavból álló lánchnak C terminális szekvenciája alapján kappa és lambda típusát különböztetjük meg. A kappa típusú láncok genetikusan polimorfizmust mutatnak és attól függően, hogy a 191. pozícióban leucin, vagy valin van, megkülönböztetünk Inv (1, 2) ill. Inv. (3) tulajdonságot. Azt a szerkezeti különbséget, amit ebben az egy pozícióban bekövetkező aminosav-csere eredményez megfelelő immunsavó jól detektálja.

Az immunológiai specificitásnak ezt a formáját *serológiai specificitásnak* nevezhetjük, mivel mindig egy adott antigén (haptén) és a csak vele reagáló ellenanyagot tartalmazó immunsavó közötti reakciót jelenti. A serológiai specificitást azonban általánosították valamennyi immunreakcióra, így az *in vivo* lezajló immunfolyamatokra is, abban jelölve meg az immunfolyamatok lényeg-

\* Előadás. Elhangzott az MTA Agrár-, Biológiai- és Orvostudományok Osztályának együttes ülésén 1976. május 4-én.

gét, hogy az antigén inger hatására azzal, és elsősorban csak azzal reagálni tudó ellenanyagok keletkeznek, amelyek végül az antigén specifikus eliminációját eredményezik. Ez a szemlélet később az immunválasz celluláris eseményeinek értelmezésénél éppúgy érvényesítette hatását, mint az antigén felismerés, vagy immunológiai tolerancia jelenségeinek magyarázatában.

Mindezek alapján az immunfolyamatok specificitását az antigén determináns (haptén) és a vele specifikusan kapcsolódó struktúra (ellenanyag aktív hely) kölcsönhatása biztosítja. Tekintettel arra, hogy mind a mai napig az ellenanyag molekulán kívül más struktúrát találni, amely az antigénnel effektor funkciókat megindító kapcsolatba tud lépni, nem sikerült, az immunológiai specificitás törvényszerűségeinek tanulmányozása a haptén-ellenanyag kölcsönhatás elemzésére korlátozódik *in vitro*, *in vivo* egyaránt.

Az elmúlt évtizedek kutatásai fényt derítettek az ellenanyagok szerkezetére, így az ellenanyagok specificitásának strukturális bázisára is (összefoglalva: Gergely 1975). Az ellenanyag tulajdonságot hordozó immunoglobulin molekulák 4 polipeptid láncos alegységből épülnek fel. A könnyű és nehéz polipeptid láncok eredetüket tekintve egy mintegy 110 aminosavból álló ősi fehérje struktúrára vezethető vissza, amelyből megfelelő génduplikációk eredményeképpen alakultak ki a ma ismert immunoglobulin molekulák. Ennek megfelelően a láncok szerkezete sok rokon vonást mutat. Legjellegzetesebb sajátosság az N-terminális láncszakaszokat jellemző nagyfokú variabilitás és a C-terminális láncszakaszok konstans aminosav sorrendje. Ez a szerkezeti kettősztottság egyben az N és C-terminális részek funkcionális különbségét is jelzi: a variábilis szekvenciákat tartalmazó molekularesz az antigénnel való kapcsolódást, a konstans szekvenciájú rész pedig az effektor funkciókat biztosítja. A variábilis láncrészek felépítése is sajátosságos. Viszonylag homolog aminosav sorrendet mutató ún. vázszekvenciák között rendkívüli variabilitást mutató pozíciókat találunk: ezek az ún. hypervariábilis régiói a láncoknak. 3 ill. 4 ilyen hypervariábilis régiót találunk a könnyű és nehéz láncokon, amelyek a molekula térszerkezeti elrendeződése folytán ellenanyagoként változó alakú és méretű „zsebet” alkotnak. Röntgendiffrakciós vizsgálatok például egy ilyen zsebet ék alakú üregként jellemeztek, amely 12Å mély, beszájadzásának átmérői pedig 15 ill. 20Å-öt mutattak (Segal és mtsai, 1974). A zseb falai kizárólag a hypervariábilis régióknak megfelelő aminosavakat tartalmazták. A röntgendiffrakciós vizsgálatok éppúgy, mint az affinity labelling segítségével nyert adatok azt igazolják, hogy a haptén „bekötődés” a hypervariábilis régiók alkotta zsebbe történik. (Amzel és mtsai, 1974, Richards és mtsai, 1974) A haptén-kötő helyeknek ez a nagyfokú variabilitása arányban áll a természetben előforduló antigén-struktúrák nagy számával és biztosítja a sok eltérő szerkezetű haptén komplementer struktúráit.

Az immunoglobulin szerkezetvizsgálatok tehát jól összhangban vannak az immunfolyamatok specificitására vonatkozó felfogással: az *ellenanyagok*

*N-terminális variabilitása biztosítja az antigének nagy számával adekvát, eltérő szerkezetű antigén kötő helyet a magasabb rendű szervezetekben.*

További kérdés, hogy genetikailag biztosított-e ilyen nagyszámú ellenanyag molekula képződése. Az immunoglobulin molekulák genetikai szempontból egyedülálló helyet foglalnak el a fehérjék között. A variábilis és konstans szakaszokból felépülő láncok kódolása — eltérően az egy gén egy polipeptid elvtől — legalább két, egy variábilis és egy konstans-gén részvételét feltételezi polipeptid láncként. Ez egyben azt is jelenti, hogy a variábilis szekvenciák kódolásához közel annyi V-génnek kell lenni a genomban, amennyi az antigének feltételezett száma. Az egymással szemben álló hipotézisek szerint az immunológiailag érett egyed rendelkezhet ennyi V génnel, ezek eredetére nézve azonban eltérőek a felfogások. A germinális hipotézis hívei szerint a  $10^5$ – $10^6$  nagyságrendű variábilis struktúra kódolásához szükséges génállomány a species evolúciója során alakul ki, a szomatikus mutációs elméletek viszont az egyedfejlődés idejére teszik a variábilis gének zömének keletkezését. Eltekintve a variábilis gén-struktúrák megjelenésétől végeredményképpen valamennyi hipotézis megegyezik abban, hogy a *rendkívüli heterogenitást mutató ellenanyagok képzésében szükséges nagy számú V-génnel az immunológiailag érett szervezet rendelkezik*. Az antigének nagy számával arányos, eltérő szerkezetű ellenanyag molekula kódolása tehát biztosított.

Az immunológiai specificitásnak fenti értelmezése jól összhangban áll az ellenanyagképzés klonszelektációs elméletével (Burnet, 1959), amely azon alapul, hogy egy ellenanyag-termelő sejt csak egy adott primer szerkezetű ellenanyag molekula termelésére képes. Ez az ellenanyag molekula — amikor az immunfolyamatokban kompetens lymphocyták antigén iránti elkötelezettsége az érési folyamat során kialakul — antigén felismerő receptorként a sejt felületén megtalálható. Az immunológiai specificitás tehát már az antigén felismerés alkalmával is érvényesül: klonális osztódás — a tulajdonképpeni immunfolyamat első fázisa — csak azokban a sejtekben következik be, amelyek felületén a specifikus receptor-haptén kapcsolódás létrejött.

Az ellenanyag szerkezetre, az ellenanyag képzés genetikai regulációjára vonatkozó adatok éppúgy, mint az ellenanyagképzés egyelőre időtállóan látszó klonszelektációs elmélete nem szól az ellen, hogy az immunfolyamatok specificitása az antigén-determináns és antigénkötő hely komplementer kapcsolódásán nyugszik. Nem szabad figyelmen kívül hagynunk azonban, hogy az antigén-antitest kapcsolódásnak ez a nagyfokú fajlagossága általában mesterségesen monospecifikussá tett immunsavókkal tanulmányozható. Ez pedig rendkívül leegyszerűsített situációt jelent az *in vivo* lezajló immunfolyamatokhoz képest. *Kérdés tehát, hogy a serologiai specificitás sokszorosan igazolt jelensége in vivo is jellemzi-e az antigén hatására meginduló folyamatokat.*

Mindenekelőtt vizsgáljuk meg azt a kérdést, hogy egy ellenanyag molekula antigén-kötő helye („zsebe”) csak egy hapténnel tud-e reagálni, vagy

esetleg többel, továbbá, hogy egy adott haptén csupán egy adott H-L-lánc párral reagál-e? Ez ugyanis a szerkezeti alapfeltétele annak, hogy a „serologiai specifitás” in vivo körülmények között is meghatározza az immunválasz specifitását.

Több olyan adatot találunk az irodalomban, amely azt mutatja, hogy egy *monotípusos immunoglobulin antigén kötő helye egynél több haptén kötésére alkalmas* (Richards és mtsai, 1974). Egy amerikai kutatócsoport pl. egy nyúlban termelt anti-DNP specifitású immunsavót 144 különböző hapténnel vizsgálva 4 esetben talált keresztreakciót. Még érdekesebbek azok a röntgenkristallográfiás vizsgálatok, amelyek azt bizonyították, hogy vannak olyan haptén-kötő helyek, amelyekben nemcsak egy, hanem több haptén is be tud kötődni, továbbá lokalizálva a különböző haptének kötődési helyét megállapították, hogy a különböző haptének a „zseb” más-más helyéhez kapcsolódnak. Ezekből a vizsgálatokból az a kép alakul tehát ki, hogy egy immunoglobulin molekula többféle haptén-specifitást is reprezentálhat. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy egy „A” hapténnel történő immunizálás után keletkező ellenanyag molekulák nemcsak az „A” hapténnel, hanem pl. „C” és „G” hapténnel is képesek reagálni. Ez természetesen azzal a konzekvenciával jár, hogy az „A” antigénnel történő immunizálás után „C” és „G” hapténnel reagáló „természetes ellenanyagok” keringenek a vérben és, hogy a „C” vagy „G” antigénnel való oltás nem primer, hanem sekunder immunválaszt vált ki.

A második kérdésre, tehát arra, hogy *egy adott antigén csupán egy meghatározott H-L-lánc párral reagál-e*, saját vizsgálataink alapján adhatunk választ.

Évek óta tanulmányozzuk azokat a szerkezeti tényezőket, amelyek a H és L láncok legkedvezőbb kapcsolódását meghatározzák (Gergely és mtsai, 1973a, Gergely és mtsai, 1973b, Gergely és Medgyesi, 1975, Rajnavölgyi és mtsai, 1975, Rajnavölgyi és mtsai, 1976). Ezekben a vizsgálatokban homogén immunoglobulin molekula-populációkból (myeloma fehérjékből) izoláltuk a H és L láncokat, majd azokat — a láncok különböző szerkezeti sajátosságait szem előtt tartva — rekombináltuk. Kompetitív rekombinációs kísérletekben, melyekben azt vizsgáltuk, hogy egy nehéz lánc az egyidejűleg azonos koncentrációban felkínált két különböző könnyű lánc közül melyikkel alkot inkább négyláncos immunoglobulin molekulát, azt tapasztaltuk, hogy a láncok preferenciális kapcsolódását térszerkezeti tulajdonságuk szabja meg. E tekintetben elsősorban a konstans szekvenciák a fontosak; ha ezek azonosak, akkor pedig a könnyű láncok alcsoport tulajdonsága — tehát a variábilis láncszakasz ún. vázszekvenciái befolyásolják a láncok kapcsolódását. Ennél a megfigyelésnél kísérleteink kritikus szakaszába jutottunk. Feltehetjük ugyanis azt a kérdést: mi történik, ha egy H láncnak egyidejűleg felkínáljuk azt az L láncot, amelyikkel eredetileg egy molekulát alkotott és egy olyan L láncot, amely ez utóbbtól csak hypervariábilis régióiban tér el. Joggal számítottunk

arra, hogy az ellenanyag tulajdonságot meghatározó hypervariábilis régiók befolyásolják ilyen körülmények között a láncok preferenciális kapcsolódását és a H lánchoz elsősorban azok a könnyű láncok kötődnek, amelyekkel eredetileg is egy molekulát alkottak. Eredményeink azonban nem ezt mutatták, hanem ez esetben is a láncok térszerkezete és nem az antigén kötő helyet kialakító aminosavak befolyásolták a láncok kapcsolódását. Ezek után érdemesnek láttuk megvizsgálni, hogy vajon a két lánc egyenrangú szerepet játszik-e az ellenanyag tulajdonság kialakításában. Vizsgálatainkhoz ismert ellenanyagtulajdonságú immunoglobulin molekulákat használtunk, izoláltuk azok polipeptid láncait és a H-láncokat heterolog molekulákból származó L-láncokból rekombináltuk, majd megvizsgáltuk, hogy az L-láncok ilyen módon történő kicserélése befolyásolta-e az ellenanyagok kapcsolódását a megfelelő antigénhez. Eddig 3 ilyen immunoglobulint vizsgáltunk; anti-I specificitású, vörösvérsejteket hidegen agglutináló ún. hidegagglutinineket, egy myelomás beteg IgG1 fehérjéjét, amelynek ló-alfa-2-makroglobulin ellenes antitest-specificitása van és egy anti-IgG specificitású kryoglobulint. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a könnyű láncok „cseréje” nem befolyásolja az ellenanyagok specificitását: az eredeti nehéz láncot tartalmazó heterolog rekombinátum kötődik az antigénhez. Ez csak abban az esetben képzelhető el, ha az antigénnel közvetlen reakcióba lépő ún. kontakt aminosavak a H láncokon helyezkednek el, és az antigénnel való kapcsolódás a H lánc funkciója. Ezt a vizsgált ellenanyagok esetében igazolni is tudtuk. Eredményeink jól egyeznek olyan régebbi vizsgálatokkal, amelyek szerint nem minden ellenanyag esetében kötődik mindkét lánc az antigénhez, (Utsumi és Karush, 1964, Padlan és mtsai, 1974) továbbá olyan röntgen diffrakciós vizsgálatokkal, amelyek szintén a H-lánc kitüntetett szerepe mellett bizonyítanak (Segal és mtsai, 1974, Amzel és mtsai, 1974).

*Vizsgálatainkból arra következtetünk tehát, hogy egy adott antigénnel nemcsak egy adott H-L-lánc pár tud kapcsolódni, hanem különböző láncpárok egész sora.*

Összevetve saját vizsgálati eredményeinket azokkal, amelyek az antigénkötő hely polispecificitását igazolják, az alábbi következtetésekre juthatunk:

1. Tekintettel arra, hogy egy adott ellenanyag több, különböző szerkezetű hapténnel reagálhat, továbbá arra, hogy egy meghatározott primer szerkezetű H lánc több különböző primer szerkezetű L láncsal azonos specificitású ellenanyag molekulát alkothat, a szervezet ellenanyag-reperoire-jának kódolásához lényegesen kevesebb V-génre van szükség, mint általában feltételezik.

2. A klasszikus értelemben vett serologiai specificitás csak in vitro körülmények között, adott haptén-ellenanyag párok vizsgálatakor érvényesíthető. Már ezen szerkezet-vizsgálatok eredményei alapján is feltételezhető, hogy in vivo ilyen természetű specificitással számolni nem lehet.

3. Egy antigén inger hatására keletkező ellenanyag-molekula populáció függetlenül attól, hogy szerkezetileg homogén, vagy heterogén — más hapténekkal is tud kapcsolódni, mint amely termelődését kiváltotta. Természetesen az ellenanyag termelést kiváltó antigén iránti affinitás dominál tekintve, hogy ez a tulajdonság valamennyi molekula sajátja, míg más haptének iránti specificitás egyedi molekulákként változik.

Az eddig elmondottak csak az ellenanyagok specificitására — tehát nem az immunológiai specificitásra általában — vonatkoznak és a következtetések az ellenanyag szerkezet-vizsgálatok eredményeire támaszkodnak. Ha általában az *immunológiai folyamatok specificitásának kérdését* kívánjuk elemezni, úgy figyelemmel kell lennünk az antigén sajátosságaira, a szervezetbe jutásának körülményeire, továbbá arra a rendkívül bonyolult, minden részletében még távolról sem ismert eseménysorozatra, amely a szervezetben az antigén hatására megindul. Nem kívánok az antigénnel foglalkozni: köztudott, hogy az antigén partikuláris, vagy oldott volta, behatolásának helye, a hordozó és haptén viszonya, az antigén elektrosztatikus töltése stb. jelentős mértékben befolyással van az immunválaszra.

Az immunválaszban kompetens lymphocyták szempontjából az antigének lehetnek thymus dependensek és thymus independensek. Az antigének túlnyomó többsége thymus dependens, ami annyit jelent, hogy az antigén felismerésében, az antigénről szóló információ átadásában, az immunválasz folyamatának megindításában a thymus-dependens ún. T-lymphocyták állnak előtérben. Csupán az antigének bizonyos szerkezeti jellegzetességet mutató kis hányada képes arra, hogy a B sejteket közvetlenül stimulálja. Megjegyzendő, hogy legújabb vizsgálatok szerint a T sejtek reguláló suppressor hatása ezen antigének esetében is érvényre jut (Baker, 1975). Ha ettől eltekintünk, úgy eredeti értelemben csak a T-independens antigének kis csoportja esetében számolhatunk olyan mechanizmussal, amit az ellenanyagtermelés klonszelekcíós elmélete alapján feltételezni lehet. A B lymphocyták felületén az antigén-felismerő receptorok ellenanyag molekulák, maga a sejt és a belőle differenciálódó plasmasejtek a receptornak megfelelő szerkezetű immunoglobulin molekulát tudják termelni. Így feltételezhető, hogy az antigén csak a megfelelő receptorokat felszínükön hordozó B lymphocytákkal reagál és azok stimulációja után viszonylag homogén ellenanyag molekulák képződése indul meg. Valóban, a korlátozott heterogenitást mutató ellenanyag termelés éppen T-independens antigének hatására következik be (Jaton és Haimovich, 1974, Krause, 1970).

Nem ismeretes ma még a T-lymphocyták antigén felismerő receptorainak szerkezete. Lehet, hogy ezek is immunoglobulinok, csak másként beépülve a sejtmembránba, mint a B-sejtek esetében, lehet, hogy H-láncuk szerkezete eltér az ismert immunoglobulinokétól — de az is lehetséges, hogy nem immunoglobulin természetű anyagról van szó (Ceppelini és mtsai, 1971, Marchalo-



nis és Cone, 1973, Rabellino és mtsai, 1971, Vitetta és Uhr, 1973). Az viszont kétségtelen, hogy az antigénnel való kölcsönhatáskor humorális faktorok egész sora szabadul fel ezekből a sejtekből. E faktorok egy része fontos szerepet játszik az antigénről szóló információ más sejteknek — köztük a B-lymphocytáknak — történő átadásában, és így jelentősen befolyásolhatják az immunválasz specificitását. A teljességre és részletek ismertetésére való törekvés nélkül kísérlem meg felhívni e faktorok immunológiai specificitást befolyásoló esetleges szerepére.

Az ellenanyag-válasz kiváltása szempontjából a T-sejtek legalább két populációjának — a helper és suppressor T sejtnek funkciójával kell számolnunk (Gershon, 1974). Ezek a sejtek a B-sejtek funkcióját segítő, ill. gátló faktorokkal befolyásolják azok működését. A helper és suppressor hatású faktorok között egyaránt találunk az antigénre specifikus ill. aspecifikus hatásúakat. Ez azt jelenti, hogy a T-sejtek produktuma az antigénre specifikusan reagálni tudó B-sejtek mellett olyanokat is mobilizál (vagy gátol), amelyeknek az antigénhez látszólag semmi közük nincs (Feldman és Basten, 1972, Moticha, 1974, Paraskevas és mtsai, 1972, Schimpl és Wecker, 1972, Taussig, 1974). Kimutatták olyan faktorok képződését is, amelyek meghatározzák, hogy milyen osztályba tartozó ellenanyag molekulák termelődjenek: az IgE és IgG képzést meghatározó komponensek izolálása is sikerült (Kishimoto és Ishizaka, 1975). A T-lymphocytákból felszabaduló faktorok hatására tehát immunválaszt megindító, antigénre specifikus és nem specifikus sejtek osztódása, toborzása indul meg. Ha szem előtt tartjuk mindazt, amit az ellenanyag molekulák polispecificitásáról, valamint a különböző láncpárokból felépülő, de azonos specificitást is kifejtő ellenanyag molekulákról leírtak, úgy nyilvánvaló, hogy *egy homogénnek imponáló haptén hatására is a különböző immunológiai specificitást reprezentáló sejtek egész sora mobilizálódik*. Cunningham (1974) számolt be arról, hogy antigénnel stimulált sejtek leány sejtjei között olyanok is találhatóak, amelyek teljesen más specificitású ellenanyagokat termelnek, mint ami a stimuláló antigénnek megfelelne. Nem tudni, hogy ez a V-génekben bekövetkező pontmutációnak, vagy pedig egy meglevő gén derepressiójának következménye-e. Mindenesetre arra mutat, hogy az antigén stimulusra meginduló klonális osztódás során is keletkeznek az antigénre nem specifikus ellenanyagokat termelő sejtek.

Az ellenanyagoknak a homolog, illetve heterolog antigének iránti affinitása az immunizáció után eltelt idővel változik. Az immunválasz kezdeti stádiumában — függően természetesen a vizsgáló módszer érzékenységétől — több specifikus, mint aspecifikus sejtet lehet találni, a termelt antitest affinitása nagyon kicsi. Később az általános affinitás nagyobb, de egyben nő a más antigénnel keresztreakciót adó ellenanyagokat termelő sejtek száma (Cunningham és Pilarski, 1974).

Az ellenanyagok szerkezetének alapos ismerete könnyebb tájékozódást

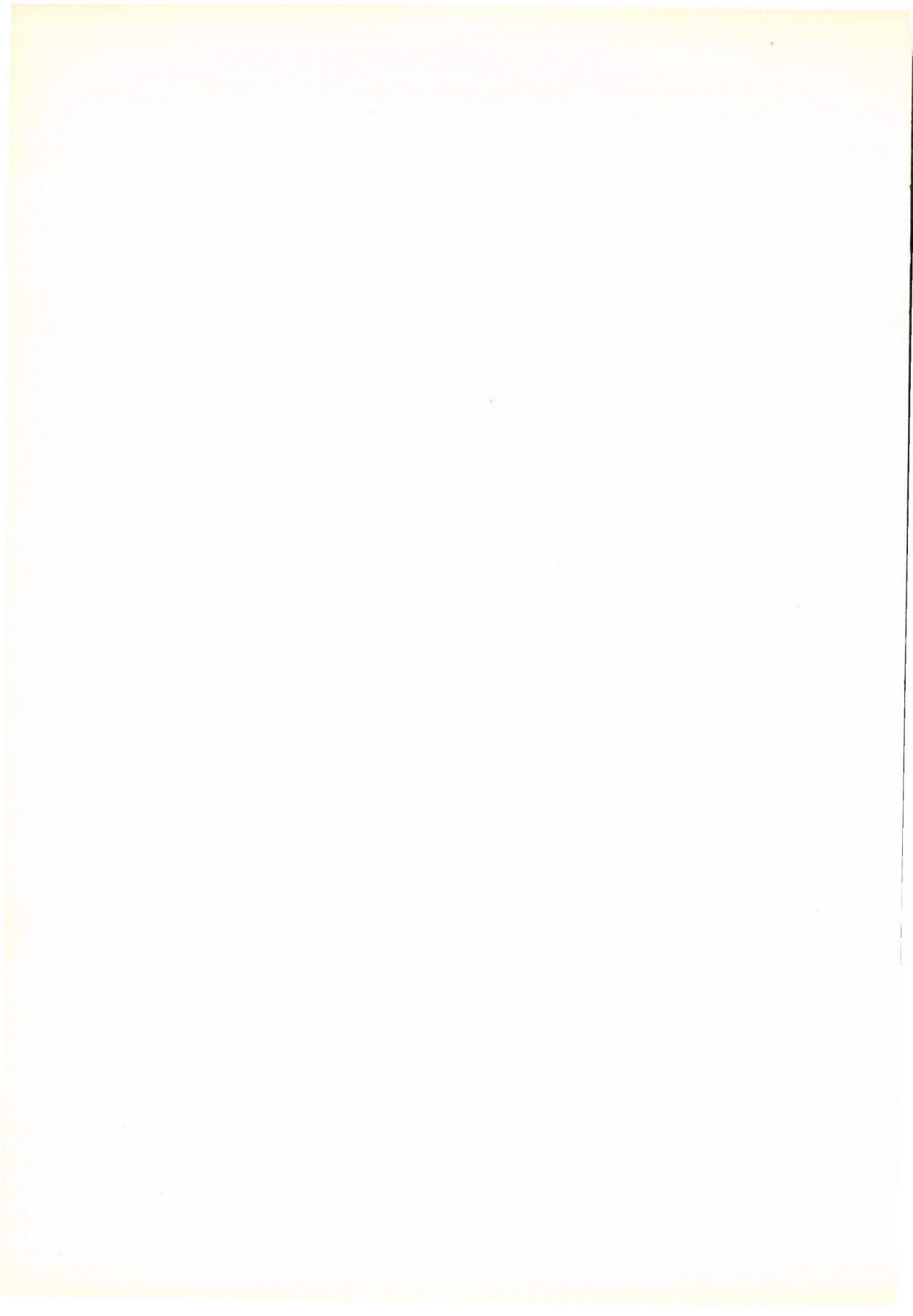
enged a humorális immunválasz specificitásának kérdésében. A *celluláris immunválaszról* e tekintetben is lényegesen kevésbé vagyunk tájékozottak. Ennek ellenére kétségtelennek látszik, hogy az ennek során lezajló folyamatokat csak receptor és antigéndetermináns közötti specifikus kapcsolattal magyarázni nem lehet. Ismeretes, hogy különböző egyedekből származó, allogén lymphocyták kölcsönhatása során a sejtek viszonylag magas százaléka (kb. 2%) proliferálódik (Wilson és mtsai, 1972). Ez azt jelenthetné, hogy a sejtek 2%-a rendelkezik olyan receptorokkal, melyek ugyanazon species másik egyedének antigénjeit felismerik. Ez azonban nem lehetséges, mert azt jelentené, hogy ezeknek az antigéneknek a felismerésére több nagyságrenddel nagyobb számú lymphocytá áll rendelkezésre, mint a természetben előforduló többi antigének részére. Sokkal valószínűbb, hogy ez a nagymértékű proliferáció más tényezőkkel áll összefüggésben. Feltehető például, hogy a sejt-sejt kapcsolódás során, az érintkező nagy felületen nemcsak az adott antigén és receptora között jön létre kapcsolat, hanem több ponton, esetleg egymással keresztreakciót adó struktúrákon. Ez a jelentős sejtproliferáció feltehetően a T-sejtekre ható antigén specifikus és nem specifikus faktorok hatását is tükrözi.

Az ismertetett adatok szem előtt tartásával *nem beszélhetünk olyan értelemben az in vivo lezajló immunfolyamatok specificitásáról, mint ahogy ezt a serológiai reakciók esetében megtehetjük*. A serológiai specificitás egy szűk értelemben vett fajlagosságot jelent, amit joggal tekintünk kémiai értelemben is specificitásnak. A serológiai specificitás a haptén és egy olyan immunsavó reakcióján alapul, amely túlnyomórészt már csak a hapténnel reagáló antigén-kötő helyeket reprezentálja, a más hapténnel reagáló kötőhelyek általában a kimutathatóság határa alatt vannak. Az antigén in vivo specificitás tekintetében rendkívül heterogén immunválaszt indukál. Úgy látszik, hogy az immunapparátus rendkívüli plaszticitásának éppen ez a specificitás tekintetében is heterogén immunválasz az alapja, hiszen egy — relatíve egyszerű szerkezetű haptén is képes széles körű specificitást reprezentáló sejtek és humorális-faktorok (ellenanyagok) mobilizálására. Vajon azt jelenti-e ez, hogy egyáltalán nem beszélhetünk az immunválasz specificitásáról? Természetesen nem, mert — ha az immunválasz különböző stádiumaiban különböző mértékben is — de az adott antigénre vonatkozó specificitás dominál. Az aspecificus „mobilizáció” jelentheti azt, hogy minden antigén inger számos más antigénnel szemben is allarmirozza az immunapparátust, de jelentheti azt is, hogy különböző információt átadó faktorok hatására a mobilizált nem specifikus sejtek elkötelezettsége változik meg. Ez utóbbi lehetőség az immunapparátus nagy tartalékaira utal. Nagyon kevés adat áll ma még rendelkezésre ahhoz, hogy ezekről egységes képet alkothassunk. Az azonban kétségtelen, hogy az immunológiai folyamatok specificitását meghatározó tényezők vizsgálata nem szorítkozhatik a determináns és receptor (ill. ellenanyag) közötti specifikus

kapcsolódás problémájára. Sejtek, sejt-produktumok bonyolult kölcsönhatására kell gondolnunk, amikor az antigén kiváltotta *in vivo* reakciók specificitását elemezni kívánjuk és ez szemléletileg jelent változást ahhoz képest, amikor az immunfolyamatok fajlagosságát a serologiai specificitás törvényszerűségei alapján ítélték meg.

## IRODALOM

- Amzel L. M., Poljak R. J., Saul F., Saul F., Varga J. M., Richards F. F.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 1427, (1974).
- Baker J. P.: *Transplant. Rev.* **26**, 3, (1975).
- Burnet F. M.: *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*, Cambridge University Press London, (1959).
- Cepellini R., Miggianno M., Curtoni E. S. és Pellegrino M.: *Transplant. Proc.* **3**, 63, (1971).
- Cunningham A. J., Fordham S. A.: *Nature* **250**, 669, (1974).
- Cunningham A. J., és Pilariski L. M.: *Europ. J. Immunol.* **4**, 319, (1974).
- Feldman M. és Basten A.: *Nature New Biology* **237**, 13, (1972).
- Gergely J.: Az ellenanyagok szerkezete. In: *Az orvostudomány aktuális problémái 1975/1*, Medicina Budapest, pp 169–189.
- Gergely J., Medgyesi G. A.: In: *Antibody Structure and Molecular Immunology*, FEBS Ninth Meeting, Budapest 1974, Gergely J., Medgyesi G. A. eds. North Holland—Akadémiai Kiadó, 1975, pp. 77–86.
- Gergely J., Medgyesi Gy., Csécsi-Nagy M., és Puskás É.: *Orvostudomány* **24**, 23/1973.
- Gergely J., Medgyesi Gy., Csécsi-Nagy M., és Puskás É.: *Nature* **107**, 92, (1973).
- Gershon R. K.: *Contemp. Top. Immunobiol.* **3**, 1, (1974).
- Jaton J. C. és Haimovich J.: *Biochem. J.* **139**, 281, (1974).
- Kishimoto T., és Ishizaka K.: *J. Immunol.* **114**, 1177, (1975).
- Krause R. M. *Advan Immunol* **12**, 1 (1970)
- Landsteiner K.: *The Specificity of Serological Reactions*, Dover Publications N. Y. 1942.
- Marchalonis J. J. és Cone R. E.: *Transplant. Rev.* **14**, 3, (1973).
- Moticka E. J.: *Immunology* **27**, 401, (1974).
- Padlan E. A., Segal D. M., Cohen G. H. és Davies D. R.: In: *The Immune System — Genes, Receptors, Signals*, Sercarz E.E., Williamson A. T., Fox C. F. eds. Academic Press N. Y. 1974. pp 7–14.
- Paraskevas F., Orr K. B. és Lee S. T.: *J. Immunol.* **109**: 1254, (1972).
- Rabellino E., Colon S., Grey H. M. és Unaune E. R.: *J. exp. Med.* **133**, 156, (1971).
- Rajnavölgyi Éva és Gergely J.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **9**, 303, (1974).
- Rajnavölgyi Éva, Wang A. C., Medgyesi G. A., és Gergely J.: *Immunochimistry* **12** 663, (1975).
- Rajnavölgyi É., Wang A. C., Medgyesi G. A., és Gergely J.: *Kísérl. Orvostudomány* **28**, 1, (1976).
- Richards F. F., Amzel L. M., Konigsberg W. H., Manjula B. N., Poljak R. J., Rosenstein R. W., Saul F. és Varga J. M.: In *The Immune System — Genes, Receptors, Signals*, Sercarz E. E., Williamson A. R., Fox C. F. eds. Academic Press N. Y. 1974. pp. 53–67.
- Schimpl A., és Wecker E.: *Nature New Biology* **237**, 15, (1972).
- Segal D. M., Padlan E. A., Cohen G. H., Rudikoff S., Potter M., és Davies D. R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 4298, (1974).
- Taussig M. J.: *Nature* **248**, 234, (1974).
- Utsumi S. és Karush F.: *Biochemistry* **3**, 1329, (1964).
- Venjaminov, Rajnavölgyi Éva, Medgyesi G. A., Gergely J. és Závodszy P.: *Eur. J. Biochem.* **67**, 81, (1976)
- Vitetta E. S. és Uhr J. W.: *Transplant. Rev.* **14**, 50, (1973).
- Wilson D. B., Howard J. C. és Nowell P. C.: *Transplant. Rev.* **12**, 3, (1972).



## IN VITRO KARCINOGENEZIS VIZSGÁLATOK EGÉR FIBROBLASZT SEJTEKEN

LAPIS KÁROLY az MTA levelező tagja, FERENCZ GÉZA, SZENDE BÉLA, az orvostudományok kandidátusa, KOVALSZKY ILONA, JENEY ANDRÁS, az orvostudományok kandidátusa

Közlésre érkezett: 1976. IX. 3.

### *Bevezetés*

Szövettenyésztetben fenntartott sejtek különböző kémiai karcinogén anyagok hatására malignusan transzformálódhatnak (Berwald és Sachs 1963, 1965). A policiklusos szénhidrogének közül gyakran használt vegyület a metil-kolantrén (MC); abból is elsősorban a 3-MC és a 3-MC 11., 12. oxid formát használják in vitro vizsgálatokhoz. A felhasznált dózis általában magas, 0,5—10  $\mu\text{g/ml}$  között mozog. (Chen 1969, Huberman 1972, Diamond 1972.) A karcinogén anyagok hatásában az alkalmazási módtól (in vivo vagy in vitro), a tesztobjektumként használt állatfajtól és sejtípustól függően különbségek mutatkoznak. A karcinogén hatás kialakulásához szükséges a kérdéses vegyület aktív formába történő átalakulása. Ez a folyamat a mikroszomális aril hidrokarbon hidroxiláz (AHH) enzim jelenlétéhez, ill. kellő mennyiségéhez kötött (Gelboin 1971). Ez az enzim emlős állatok májában megtalálható, de más szövetek izolált sejtjeiből (így pl. az emberi embrionális fibroblasztokból) hiányozhat (Kuroki 1974). Az aktív vegyület (hidroxid ill. epoxid) meghatározott kromatin fehérjéhez kötődik (H-protein, ligandin), melynek hiányában nem jön létre a DNS és a karcinogén anyag közötti, transzformációt eredményező kölesönhatás (Ketterer 1974). Megnehezíti az in vitro nyert eredmények értékelését az a tény is, hogy egy bizonyos passzálás-szám után a szövettenyésztetben fenntartott — különösen egér eredetű — sejtek spontán malignusan transzformálódhatnak (Sanford 1968). A malignus transzformáció vizsgálatára ajánlott in vitro módszerek önmagukban nem elegendők a malignus transzformáció igazolására (Sanford 1974). Az egyetlen bizonyító erejű kísérletnek az állatba visszaoltott sejtek daganatképző képességét tekintik (Eagle 1970).

Vizsgálatainkban a ritkábban használt 20-MC viszonylag alacsonyabb dóziséval CBA  $T_6T_6$  egérembrío-fibroblaszt sejtek malignus átalakítását igyekeztünk létrehozni. A kezeletlen és kezelt kultúrák összehasonlításával adatokat kívántunk nyerni a megváltozott tulajdonságokról, a malignus transzformáció és a sejtek AHH aktivitásának kapcsolatáról, a CBA  $T_6T_6$  egértörzs izolált embrionális sejtjeinek transzformálhatóságáról, a transzformáció során bekövetkező, azt kísérő és jelző, a biológiai sajátosságokat illető változásokról, különös tekintettel a sejtek AHH aktivitására.

### *Anyag és módszer*

#### *Szövettenyészetek kialakítása:*

A szövettenyészetek kialakítása a beltenyésztett CBA T<sub>6</sub>T<sub>6</sub> egértörzsből származó 20 napos embriók felhasználásával történt. Az embriók tüdejét steril körülmények között szövettani ollóval feldaraboltuk, majd PBS-ben történt mosás után 20 percig 0,25%-os tripsin oldattal emésztettük. Szűrés és centrifugálás után (1000/perc) a sejteket 10 ml médiumban (Parker médium + 10% borjúsavó) Falcon plasztik edényekben 37 C°-on inkubáltuk.

#### *A tenyészetek fenntartása:*

A kialakított sejttenyészetek passzálásához 0,25%-os tripsin oldatot, fenntartásához 10% borjúsavót tartalmazó Parker médiumot használtunk. A passzálás az első néhány alkalommal ritkábban és tápfolyadékcserevel felváltva, később a stabilizálódott sejtvonalak esetében átlagosan 5 naponként történt (500 000 sejt/10 ml).

#### *A kísérletre felhasznált sejtvonal kiválasztása:*

Az indított tenyészetek jelentős részéből nem sikerült stabilizálódott sejtvonalat kialakítani. A stabilizálódott sejtvonalak közül néhány a malignus transzformálódásra utaló jeleket mutatott már a 20. passzázs előtt is.

Ismertetendő vizsgálatainkhoz azt a sejtvonalat választottuk ki, amely kezeletlenül, állatba való visszaoltás után a 20. passzázsig még nem okozott daganatot. Ez a sejtvonal *in vitro* növekedése során sem mutatott malignus átalakulásra utaló biológiai, illetve morfológiai jeleket.

#### *Kezelések:*

A 20 MC-vel való kezeléshez 10 000 sejt/edény koncentrációban ülepítettük ki a sejteket, majd az MC-t DMSO-ban oldva adtuk a sejtek médiumához úgy, hogy a DMSO végkoncentrációja ne haladja meg a 0,05%-ot. Az MC-t tartalmazó médiumot 14 napig csere nélkül a tenyészeteken hagytuk. Kontrollként kezeletlen, ill. 0,05% DMSO-val kezelt tenyészeteket használtunk.

#### *Sejtdenzitás meghatározása:*

A kezeletlen és kezelt sejteket 0,5 millió sejt/edény koncentrációban ülepítettük ki a kísérleti edényekbe. Az összsejtszámot és az 1 cm<sup>2</sup> edényfelületre eső sejtszámot Buerker kamrában határoztuk meg naponként a tenyésztési idő alatt. A kultúrákon az 5. napon tápfolyadékcsereét végeztünk, így 9 napon át kísérhettük figyelemmel a sejtdenzitás alakulását.

### *Savókoncentráció-függés vizsgálata :*

A szokásos passzálásokhoz 10% borjúsavót tartalmazó médiumot használtunk. Ennek hígításával 5, 3, 1% savót tartalmazó médiumot állítottunk elő. Passzáláskor a sejteket alacsony sejtszám felhasználásával (5 000 sejt/edény) ülepítettük ki. Ilyen módon az egyes sejtekből képződő telepeket külön-külön tudtuk tanulmányozni. Az inkubációs idő elteltével (5. és 6. nap) vizsgáltuk a telepenként észlelt sejtszámot a különböző szérumkoncentrációknál.

### *Telepkezelés vizsgálata lágyagar-médiumban :*

A sejteket is tartalmazó komplett médiumhoz forró fürdőben tartott 5%-os agar-agar (Difco) törzsoldatot cseppentettünk olyan mennyiségben, hogy az agar-agar végkoncentrációja 0,4%-os legyen. Ezután a szuszpenziót 5 ml-enként 5 cm átmérőjű Falcon plasztik petricsészékbe mértük szét, majd 5% CO<sub>2</sub> — 95% levegővel átáramoltatott termosztátban 8 napig inkubáltuk. Az inkubálási idő elteltével a telepenkénti átlagos sejtszámot vizsgáltuk.

### *Állatoltások kivitelezése :*

A sejteket — tripsinnel eltávolítva az edényfalról — centrifugáltuk (1000/perc), háromszor mostuk fiziológiás konyhasóoldattal, majd ugyancsak fiziológiás konyhasóoldattal oly módon hígítottuk, hogy a kapott szuszpenzió 0,1 ml-e  $4 \times 10^6$  sejtet tartalmazzon. A sejtek befecskendezése újszülött CBA T<sub>6</sub>T<sub>6</sub> egerekbe, a hát bőre alá történt (0,1 ml/állat). A sejtekkel beoltott egereket — amennyiben azokban daganat nem keletkezett — 6 hónapos korukig megfigyelés alatt tartottuk. Daganatképződés esetében a tumor általában már az oltást követő 10. napon tapinthatóvá vált, és a 20. napra átmérője elérte az 1—1,5 cm-t. Ekkor az állatokat leöltük és a daganatokat kireparáltuk. A daganatszövetből egyrészt morfológiai vizsgálatokat végeztünk, másrészt a daganatsejteket újabb in vitro kultúrák létesítésére használtuk fel.

### *Biokémiai vizsgálatok*

A vizsgálatokhoz 48 órás tenyészeteket használtunk. Egy-egy minta 2 millió sejtet tartalmazott. Az AHH aktivitást *Nebert és Gelboin* (1968) módszere szerint mértük, és a 30 perc alatt képződött NaOH oldékony Benzpyren átalakulási termék 1 mg sejtfehérjére vonatkoztatott fluoreszcenciájában fejeztük ki. A képződött termék fluoreszcenciáját *Gelboin* által rendelkezésünkre bocsátott 3-OH-Benzpyren és máj mikroszomalis enzim által átalakított Benzpyren származék fluoreszcenciájával hasonlítottuk össze.

### Morfológiai vizsgálatok

A monolayer kultúrákat etanol-ecetsavas fixálás után Giemsa oldattal festettük meg. Szövetteni metszeteket 4%-os formalinos fixálás és paraffinos beágyazás után készítettünk; ezeket HE-al festettük.

### Eredmények

A kiválasztott sejtvonal a hatodik passzálás után stabilizálódott, de még nem mutatott malignus transzformációra utaló jeleket, így alkalmas volt a carcinogénnel történő kezelésre. Felszaporítás után a nyolcadik passzálásnál került sor a 20-MC toxicitásának vizsgálatára. Az eredményeket az 1. táblázatban

1. táblázat

Mc toxicitásának meghatározása CBA T<sub>6</sub>T<sub>6</sub> egér fibroblaszt sejtekben

Kiindulási sejtszám: 10 ezer sejt/edény

Kezelési idő: 5 nap

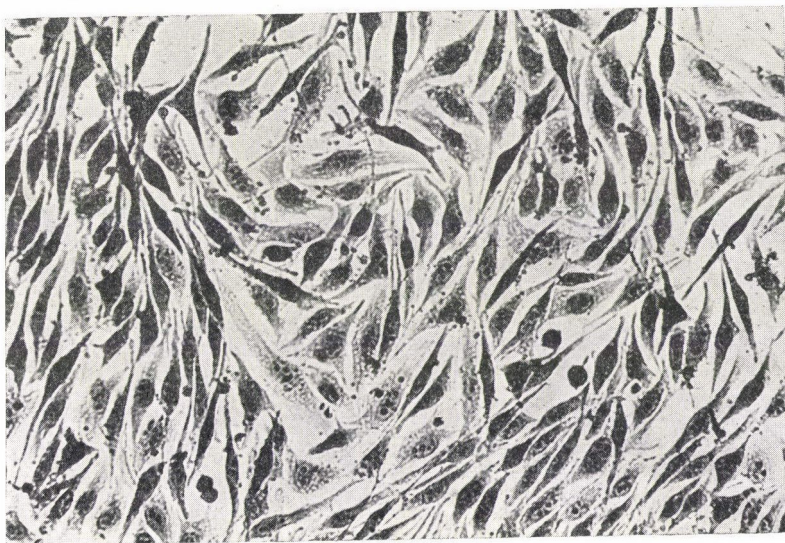
Passzálás-szám: 8

MC cc.	sejtszám/edény
0,01 $\mu\text{g/ml}$	310 ezer
0,1 $\mu\text{g/ml}$	320 ezer
1 $\mu\text{g/ml}$	310 ezer
10 $\mu\text{g/ml}$	270 ezer
50 $\mu\text{g/ml}$	180 ezer
K $\mu\text{g/ml}$	320 ezer
DMSO K $\mu\text{g/ml}$	310 ezer

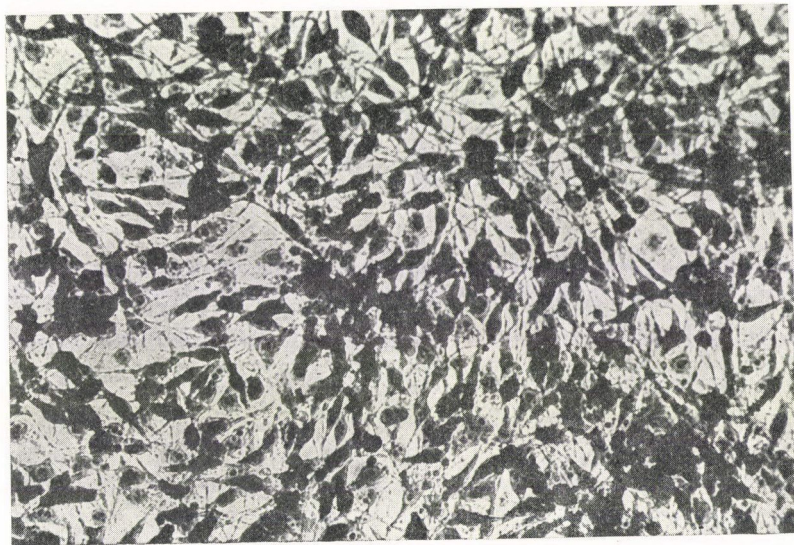
közzöljük. Az általunk alkalmazott és sikeres malignus transzformációt létrehozó MC-dózis a 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , tehát nem mutatkozott toxikusnak. A tenyészet kezelését a nyolcadik passzálás után végeztük 0,1  $\mu\text{g/ml}$  MC felhasználásával. A 14 napos kezelési periódus elteltével a kezeletlen és a kezelt sejtek morfológiája között jelentős eltérés mutatkozott (1. és 2. ábra). A kezelt kultúrákban a kontakt gátlás felfüggesztődött, a sejtek sokirányú növekedés mellett több réteget alkottak. A kezeletlen és kezelt kultúrák biológiai sajátosságainak további összehasonlítására a sejtek felszaporítása után került sor. A további passzázsok során tápfolyadékcsere nélkül, szokott tenyésztési viszonyok mellett a kezeletlen és kezelt sejtpopulációk *szaporodási sajátosságai* nem különböztek egymástól (2. táblázat).

A monolayer kialakulását követő tápfolyadékcsere után végeztük el a *sejtdenzitás* összehasonlítását. Jelentős különbséget kaptunk az edényenkénti összsejtszám és az ebből számított egységnyi felületre eső sejtszám vonatkozásában. Az 5. napon végzett tápfolyadékcsere után az 1 cm<sup>2</sup>-re eső sejtszám csak





1. ábra: Kezeletlen CBA  $T_6T_6$  egér tüdő fibroblaszt, 13. passzázs. A kontakt gátlás érvényesül. a sejtek egy réteget alkotnak. (Giemsa, 300x)



2. ábra: MC-kezelt (0,1 µg/ml) CBA  $T_6T_6$  egér tüdő fibroblaszt, 3. passzázs kezelés után. A kontakt gátlás felfüggesztődött, a sejtek helyenként több rétegben nőnek. (Giemsa, 300x)

## 2. táblázat

Kezeletlen és MC-kezelt sejtvonal sejtszámának alakulása szokásos passzálások során

Napok	Kontroll		MC-kezelt	
	Passzázs szám	Sejtszám/edény (x 10 <sup>6</sup> )	Passzázs szám	Sejtszám/edény (x 10 <sup>6</sup> )
0.	13	0,6	3	0,6
1.	13	0,6	6	0,6
2.	13	0,9	3	1,0
3.	13	1,6	3	1,6
4.	13	2,1	3	2,3
5.	13	2,2	3	2,3
0.	18	0,5	8	0,5
1.	18	0,4	8	0,4
4.				
2.	18	0,7	8	0,8
3.	18	1,1	8	1,1
4.	18	1,5	8	1,6
5.	18	2,1	8	2,1
6.	18	2,3	8	2,3

## 3. táblázat

A sejtdenzitás és összsejtszám alakulása a kezeletlen és MC-kezelt sejtvonalban tápfolyadékcseré előtt és után

Sejtszám a kísérlet indításakor: 0,5 mill/edény (10 mo)

Passzázs szám: Kontroll 15

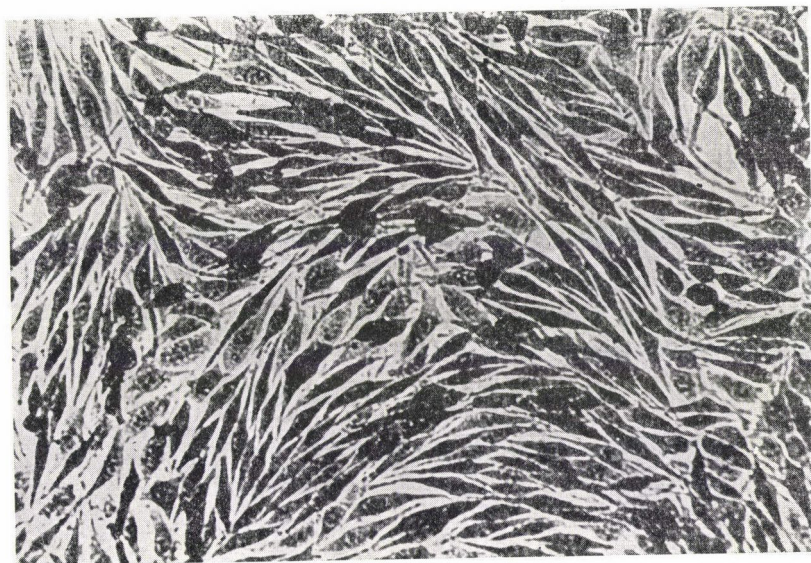
MC-kezelt 5

Tápfolyadékcseré: 5. napon

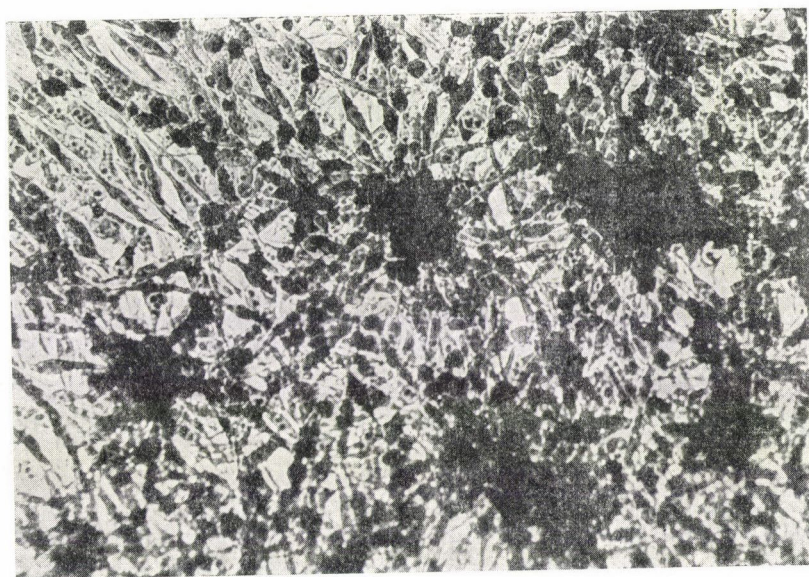
Napok	Kontroll		MC-kezelt	
	Sejtszám (x 10 <sup>6</sup> )	Sejt/cm <sup>2</sup> (x 10 <sup>4</sup> )	Sejtszám (x 10 <sup>6</sup> )	Sejt/cm <sup>2</sup> (x 10 <sup>4</sup> )
0.	0,5	0,2	0,5	0,2
1.	0,4	0,16	0,45	0,18
2.	0,7	0,28	0,8	0,32
3.	1,1	0,44	1,3	0,52
4.	1,8	0,72	1,8	0,72
5.	2,2	0,88	2,3	0,92
6.	2,4	0,96	2,7	1,08
7.	2,3	0,92	3,2	1,28
9.	1,8	0,72	2,4	0,96

az MC-vel transzformált kultúra esetében haladta meg a 6. és 7. napon az  $1 \times 10^4$  sejtszámot (3. táblázat, 3., 4. ábra).

A *szérumkoncentráció csökkentésének* hatását a sejtek osztódására a 14. passzázs (MC-kezelt sejtekre vonatkoztatva 4. passzázs) után vizsgáltuk. A 4. táblázatból látható, hogy a telepenkénti átlagos sejtszám a 3%-os savókoncentráció mellett mutatott jelentős eltérést a kezeletlen és MC-kezelt sejtpopuláció



3. ábra: Kezeletlen CBA T<sub>6</sub>T<sub>6</sub> egér tüdő fibroblaszt három nappal a tápfolyadékcseré után, 15. passzázs. A tápfolyadékcseré után a kezeletlen sejtek nem mutatnak többrétegű növekedést. (Giemsa, 300x)



4. ábra: MC-kezelt CBA T<sub>6</sub>T<sub>6</sub> egér tüdő fibroblaszt három nappal a tápfolyadékcseré után, 5. passzázs a kezelés után. A többrétegű ún. criss-cross növekedés kifejezettebbé válik. (Giemsa, 300x)

## 4. táblázat

Kezeletlen és MC-kezelt sejtvonal szérumkoncentráció függésének meghatározása

Sejtszám a kísérlet indításakor: 5000/edény (10 ml)

Passzázs szám: Kontroll 14

MC-kezelt 4

Szérumkoncentráció: 1–10%

Szérumkoncentráció (százalék)	Kontroll átlagos sejtszám/telep		MC-kezelt átlagos sejtszám/telep	
	5. nap	6. nap	5. nap	6. nap
1	0	0	3	3
3	1,5	0	9,5	15
5	8,2	14	9,7	17
10	9,8	16	10	17

## 5. táblázat

Kezeletlen és MC-kezelt sejtek telepképző képessége lágyagaras mediumban

Agar koncentráció: 0,4%

Kondicionálási idő: 8 nap

Passzázs-szám:

kontroll: 18

MC-kezelt: 8

Sejtszám a kísérlet indításakor: 1000/petrics. (8. ml)

Sejtvonal	2 sejt/telep	3–6 sejt/telep	7–10 sejt/telep
Kontroll	10%	—	—
MC-kezelt	12%	8%	2%

között. Míg a kezeletlen sejtek ennél a koncentrációnál osztódásra nem voltak képesek, a kezelt sejtek átlagosan 15 sejtet tartalmazó telepeket képeztek.

*Lágyagaros médiumban való telepképzésre* — bár alacsony százalékban — csak az MC-kezelt sejtek voltak képesek (5. táblázat).

A mikroszomális AHH enzimaktivitás vizsgálatára a passzálások során folyamatosan került sor. Így a kontroll-sejtek esetében a 13., 17., 26. passzálásnál, az MC-kezelt sejtpopuláció esetében a kezeléstől számított 3., 7., 16. passzálásnál. Az eredményeket az 5. ábrán mutatjuk be. A 3-OH-BP-re jellemző karakterisztikus fluoreszcenciát a kezeletlen vonal esetén a 13. és 17., a transzformált vonal esetén pedig csak a 3. passzázsban tudtuk észlelni, és ekkor is igen alacsonynak bizonyult. Ugyanakkor a NaOH-val extrahálható fázisban egy új fluoreszcenciás sajátossággal rendelkező anyag jelent meg, melynek gerjesztési maximuma 370 nm, fluoreszcencia maximuma pedig 480 nm volt. Ezt a fluoreszcenciát sem az oldott benzpyrenben, sem a hexan oldékony fázisban, sem a máj mikroszomális enzim által képzett NaOH oldékony fázisban nem

## 6. táblázat

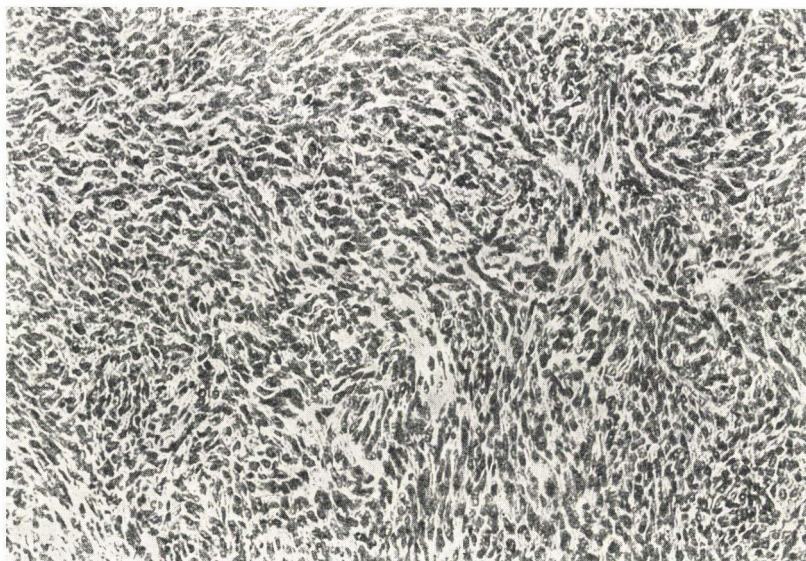
A kezeletlen és MC-kezelt sejtek visszaoltása újszülött CBA T<sub>6</sub>T<sub>6</sub> egerekbeSejtszám: 4 × 10<sup>6</sup>/állat, sc.

Kiértékelés: oltás utáni 20. napon.

Sejtvonalak	Passzázs szám	Testsúly	Tumorsúly	Tumorsejtek szaporodása ismét szövettanilag
Kontroll	9	9 g	—	—
		10	—	—
		9	—	—
	13	8	—	—
		8	—	—
		9	—	—
	16	11	—	—
		18	7	—
	18	10	—	—
		11	—	—
	19	10	—	—
		8	—	—
		9	—	—
	21	7	1	+
		26	8	1,2
30		7	2	+
		8	2,5	+
MC-kezelt	3	7,5 g	3,6 g	+
		8	3,2	+
		9	4	+
	6	8	3,2	+
		9	4	+
		6,5	3,2	+
	7	7,2	3,1	+
		10	4,2	+
	9	8 g	2 g	+
		7,9	3,8	+
		8,5	3,8	+
		8	3	+

tudtuk kimutatni, ezért feltételezzük, hogy egy általunk ismeretlen BP átalakulási termék képződött. A két vonal között az eltérés a következő volt. Míg a normál vonal esetén az első két passzázsban egyaránt megtalálható a 3-OH-BP és az új termék fluoreszcenciája, addig a transzformált vonal 3. passzázsában csak a normál vonalhoz viszonyítva igen alacsony 3-OH-BP fluoreszcenciát tudtuk mérni. Az új termék fluoreszcenciája, a malignus vonalban, a 7. passzázsban jelent meg, a normál sejtekhez viszonyítva magas intenzitással, ugyanekkor a 3-OH-BP-re jellemző fluoreszcencia eltűnt. A 16. passzázs során az új anyag képződése is a normál vonal által képzett mennyiség alá csökkent.

A kezeletlen és kezelt sejtpopuláció sejtjeit a passzálások során folyamatosan visszaoltottuk a CBA T<sub>6</sub>T<sub>6</sub> állattörzs újszülött egereibe. Az eredményeket a



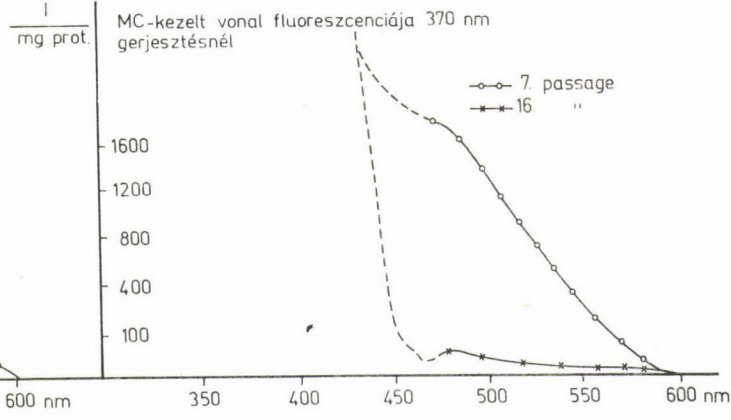
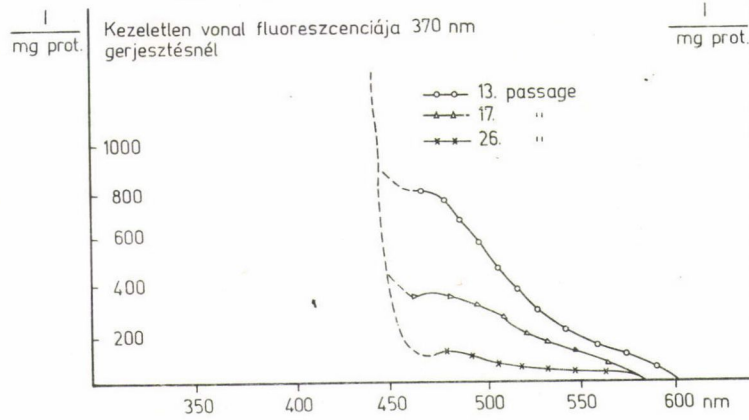
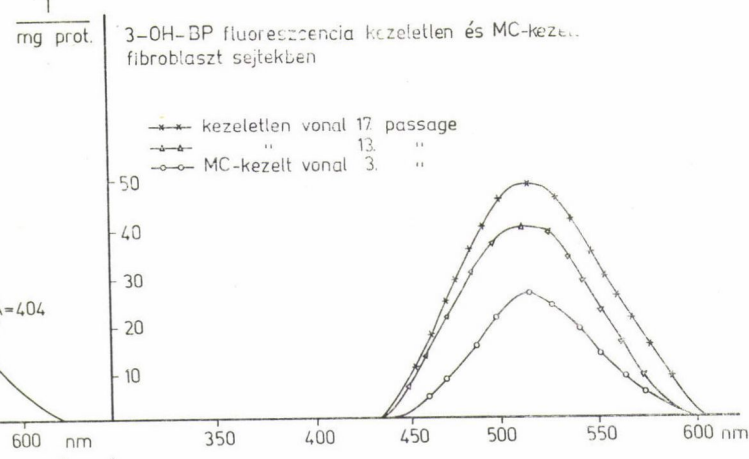
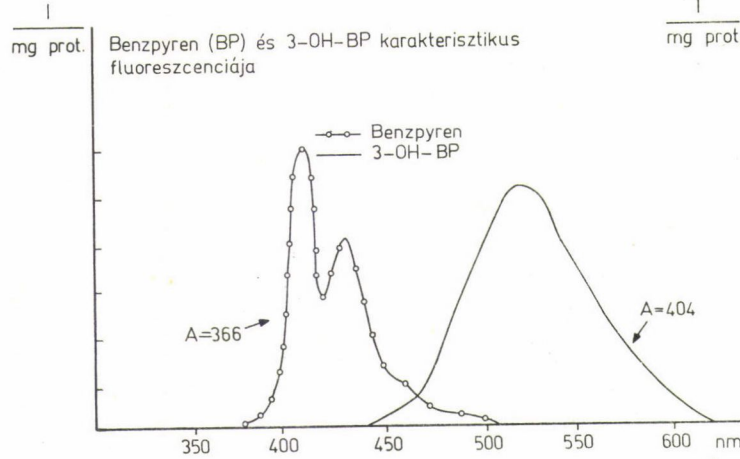
5. ábra: Az MC-kezelt fibroblaszt sejtekkel (6. passzázs a kezelés után) oltott egerek tumorából készített szövettani metszet fénymikroszkópos képe. Orsósejtes sarcoma. (HE, 300x)

6. táblázat mutatja. A visszaoltásokból megállapíthatjuk, hogy a vizsgálatokhoz felhasznált sejtvonal a stabilizálódás után a 21. passzázásig nem volt malignusan transzformálódottnak tekinthető. A 21. passzázás után a sejtvonal spon-tán transzformálódott. Ez a folyamat viszonylag gyorsan következett be és az MC-kezelt sejtvonalakhoz hasonlóan daganatot okozott a kísérleti állatokban. A 21. passzázás után különben a kezeletlen sejtpopuláció sejtjei is elvesztették kontakt szenzitivitásukat és egyéb biológiai tulajdonságaikban is a malignus transzformáció jegyeit mutatták.

*Morfológiailag* az 1–1,5 g súlyú, szürkésfehér, tömött daganatok jól körülírtak voltak, a bőr alatti kötőszövetben helyezkedtek el. Kórszövettani vizsgálattal valamennyi daganat orsósejtes sarcomának felelt meg (6. ábra). A keletkezett tumorok sejtjeit tripszines emésztés után ismét in vitro körülmé-nyek közé helyeztük. A tenyésztés minden esetben sikeres volt. Az MC-kezelt sejtekből kialakult tumorokból indított szövettenyészetek fénymikroszkópos morfológiája és in vitro szaporodási tulajdonságai megegyeztek az MC-kezelt sejtpopulációval.

#### *Az eredmények megbeszélése*

Az általunk kialakított CBA T<sub>6</sub>T<sub>6</sub> egérembrío fibroblaszt sejtvonal vi-szonylag alacsony, 0,1 µg/ml 20-MC dózissal malignusan transzformálható. Kísérleteink során több, az említett egértörzsből származó fibroblaszt tenyészete-t kísértünk figyelemmel. Megfigyeltük, hogy a tenyészetek nem mindig te-



kinthetők egyértelműen malignusan nem-transzformálódtak, vagy transzformálódtak. Előfordult, hogy a malignus transzformációra utaló jelek a passzálások során lassan, fokozatosan, egymástól függetlenül jelentek meg, más esetben a spontán transzformáció hirtelen következett be. A spontán malignus transzformáció vizsgálatára egyelőre csak viszonylag durva módszerek állnak rendelkezésünkre. E vizsgálatok alapján úgy látszik, hogy a leírt kísérlethez használt sejtvonalunkon a spontán transzformáció a 20. passzálás körül viszonylag rövid idő alatt következett be. Ugyanakkor az AHH aktivitásban megfigyelt lassú csökkenés arra figyelmeztet, hogy a malignus transzformáció mérhető jeleinek megjelenése előtt már megindul valamilyen átalakulás a sejtek anyagcseréjében. A megfelelő sejtvonal kiválasztásával elérhető, hogy a karcinogén anyaggal való kezelés után a biológiai tulajdonságok egyszerre, egy lépésben változzanak meg. Vizsgálatainkban az MC-nek egyes sejttelepek morfológiájára kifejtett közvetlen hatását nem tanulmányoztuk, mivel az általunk kiválasztott sejtvonal a 8. passzálás idején még nem képzett jól elkülöníthető telepeket.

Eredményeinkből megállapítható, hogy rendszerünkben a malignus transzformáció során a sejtpopuláció osztódási üteme nem változik, ugyanakkor a sejtek életképessége, ellenállóképessége növekszik. Erre utal a növekedési képesség megtartása megváltozott körülmények között (alacsony szérumkoncentráció, lágyagar). A kontakt gátlás megszűnésére viszont a mediumcseré után megfigyelt nagyobb sejtdenzitás alapján következtethetünk. A mikroszomális vegyes funkciójú oxidase vizsgálata során nyert adatok arra utalnak, hogy a BP metabolikus átalakulása kvalitatív és kvantitatív különbséget mutat egyfelől a passzálások folyamán, másfelől a normál és az MC transzformált vonalak között. A BP irodalomból ismert és leggyakrabban mért átalakulási termékét a 3-OH-Benzpyren-t, mindkét vonalnak csak a korai passzázsaiban (normál 13, 17, transzformált 3) tudtuk észlelni. Ugyanakkor egy eddig ismeretlen átalakulási termékből származó fluoreszcenciát találtunk (A/F 370/480), amely hasonlóképpen a OH-BP-hez a további passzázások folyamán szintén egyre kisebb mértékben képződik. Az MC kezelés hatására transzformálódott sejtvonalban a 3-OH-BP képződés kisebb fokú volt, majd teljesen megszűnt. Ezzel egyidőben jelent csak meg az új átalakulási termék fluoreszcenciája, mely a további passzázások során rohamosan csökkent. 10 passzázás elteltével az időegység alatt képződött anyag mennyisége 20-ára csökkent, míg a normál vonal esetén az előző aktivitás egyharmada volt megtalálható. E vizsgálatok valószínűsítik, hogy az enzimaktivitás nemcsak szükséges a malignus transzformáció bekövetkezéséhez, hanem annak bekövetkezése vissza is hat az enzimaktivitásra.

### *Összefoglalás*

Szerzők CBA T<sub>6</sub>T<sub>6</sub> egérembrió — fibroblaszt sejtvonalakat állítottak elő. E sejtvonalak közül a spontán biztosan nem transzformált sejtvonalat 20 metilkolantrén, viszonylag alacsony (0,1 µg/ml) dóziséval malignusan transzformál-



ták. A malignus transzformáció során a kezeletlen, metilkolantrén kezelt sejt-populáció összehasonlításával vizsgálták meg a megváltozott biológiai tulajdonságokat; a kontakt szenzitivitás elvesztését és a malignus transzformáció és az aril hidrokarbon hidroxiláz enzimaktivitás kapcsolatát. Megállapították, hogy a transzformáció után a sejtek szaporodási üteme nem változott, ugyanakkor ellenállóbbá váltak a megváltozott körülményekkel szemben. A kezeletlen vonal aril hidrokarbon hidroxiláz aktivitása fokozatosan csökkent a passzálások során, a metilkolantrén kezelés hatására pedig eltűnt, illetőleg jelentősen alacsonyabbá vált, mint a kontroll esetében.

A munka támogatásáért köszönetet mondunk a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi II. (biológiai) Főosztályának és az International Agency for Research on Cancer (Lyon)-nak. (Grant N° RA 70/003)

#### IRODALOM

- Berwald, Y. és Sachs, L.*: Nature (London) **200**, 1182. (1963).  
*Berwald, Y. és Sachs, L.*: J. Natl. Cancer Inst. **35**, 641. (1965).  
*Chen, T. T. és Heidelberger, C.*: Intern. J. Cancer **4**, 166. (1969).  
*Diamond, L., McFall, R., Miller, J. és Gelboin, H. V.*: Cancer Res. **32**, 731. (1972).  
*Eagle, H., Foley, G. E. és Koprowski, H.*: J. Exp. Med. **131**, 863. (1970).  
*Gelbion, J. A., Donovan, P. J. és Nelson, R. L.*: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **68/12**, 2958. (1971).  
*Huberman, E., Kuroki, T., Marguardt, H., Selkirk, J. K., Heidelberger, C., Grover, P. L. és Sims, P.*: Cancer Res. **32**, 1391. (1972).  
*Ketterer, B.*: XI. International Cancer Congress, Firenze **1**, 14. (1974).  
*Kuroki, T.*: XI. International Cancer Congress, Firenze, **1**, 13. (1974).  
*Nerbert, D. W. és Gelboin, H. W.*: J. Biol. Chem. **243**, 6242. (1968).  
*Sanford, K. K.*: Natl. Cancer. Inst. Monogr., **26**, 387. (1968).  
*Sanford, K. K.*: J. Natl. Cancer Inst. **53**, 1481. (1974).



## AZ ADENOVÍRUSOK PENTON ANTIGÉNJÉNEK VIZSGÁLATA

NÁSZ ISTVÁN az orvostudományok doktora, LENGYEL ANNA, ÁDÁM ÉVA  
és MEDVECZKY PÉTER

Közlésre érkezett: 1976. IX. 29.

Az adenovírusok tulajdonságainak vizsgálata során Pereira és mtsai írták le először (Klemperer és Pereira 1959, Pereira és mtsai 1959; Pereira M. S. és mtsai 1959), hogy a vírus tenyésztésében három különböző antigén található, melyeket A, B és C jelöléssel láttak el. A továbbiakban tisztázták ezen antigének bizonyos jellegzetes tulajdonságait, a bennük található antigén-determinánsokat, később pedig morfológiájukat is (Valentine és Pereira 1965). A három komponens elnevezése — a velük foglalkozó víruskutatók javaslatára — 1966 óta hexon, penton és fiber (Ginsberg és mtsai 1966).

A penton elnevezésű antigén komponens az ikozahedralis szimmetriájú virion csúcsain helyezkedik el. Morfológiailag három részből áll. Bázisát a virion csúcsát alkotó — megközelítőleg gömb alakú — vertex kapszomer képviseli, melyhez egy hosszúkás, fonal-, vagy pálcika alakú nyúlvány kapcsolódik, végén egy kisebb gömbbel. Ez utóbbi két rész önmagában az adenovírus fiber komponense, mely a virion csúcsaiból radiálisan nyúlik ki és melynek hossza a különböző alcsoportba tartozó típusoknál más és más. A 252 kapszomerból álló adenovírus kapszid összesen 12 pentont tartalmaz egy-egy virionban, mivel az ikozaédernek 12 csúcsa van. A többi 240 kapszomert, melyek az ikozaéder élén és lapjain helyezkednek el, hexonnak nevezik. Egyes szerotípusok tenyésztésében előfordulnak 12 pentonból álló szabályos képletek, ún. dodekonok is (Norrby 1966a).

A penton a legtöbb adenovírus típusnál hő- és tripszinérzékeny, e behatások ugyanis a csúcsi kapszomer bomlását okozzák és ilyenkor az izolált pentonok vagy dodekonok elvesztik a penton bázist és csak a fibernek megfelelő rész marad épen. Emiatt, valamint a struktúrával magyarázható fragilitás következtében a penton a leglabilisabb komponens az adenovírus kapszid összetevői között. E labilitás, valamint a már említett relatíve kis mennyisége miatt a penton tanulmányozása igen nehéz, s egyes típusok esetében nem is sikerült eddig a többi vírus komponenstől szeparáltan, tisztított formában előállítani.

Az adenovírusok pentonja nemcsak struktúrájában tér el a kapszidot alkotó többi morfológiai egységtől, hanem antigén tulajdonságok tekintetében is, továbbá számos fontos és speciális funkcióval bír. A penton antigénről ismeretes, hogy legalább három antigén-determinással rendelkezik. Ezek közül a  $\gamma$

típuspecifikus és feltételezik, hogy a penton végén levő kis gömbben található, a  $\delta$  pedig az egyenes pálcá részben helyezkedik el, s ezek együtt alkotják a fiber antigént. A penton bázisban, tehát a csúcsi kapszomerben található  $\beta$  antigén determinánst pedig csoportspecifikusnak tartják. A  $\delta$  determináns a különböző alcsoportokba tartozó típusoknál különböző, egyeseknél alcsoportspecifikus, másoknál ettől eltérő reaktivitású (Norrby 1968a).

Az adenovírusok pentonja számos funkcióval rendelkezik. Feltételezik, hogy a vírus a pentonjai révén kapcsolódik a sejthez vírusfertőzéskor, s a vírus hemagglutinációban is ezek tapadnak a fiber gömbjével a megfelelő vörösvértestekre (vvt). Ennek alapján érthető, hogy a virion, vagy a több pentonból álló polimer (pl. dodekon és penton dimer) több tapadási ponttal rendelkezvén teljes, komplett agglutinációt tud létrehozni (Nász 1975). Az egyes pentonok azonban csak egy ponton tudnak a vvt-hez kapcsolódni, így agglutinációt csak akkor tudnak létrehozni, ha másik végüket (azaz a csúcsi kapszomereket) valamilyen heterotípusos, adenovírus elleni immunglobulin molekulával összekapcsoljuk. Ezért a penton monomert inkomplett hemagglutininnak nevezik. Hasonló inkomplett hemagglutinin a fiber is, ennek agglutinációjához azonban nem alkalmas bármely heterotípusos ellenanyag molekula, hanem csak alcsoporton belüli, mert ennek a  $\delta$  determinánssal kell kapcsolódnia, mely — mint említettük — szűkebb reaktivitású.

A penton rendelkezik toxikus hatással, mely a sejtek ún. „korai cytopathogen (CP) hatásával” mutatható ki. Nagyobb mennyiségű penton hatására a sejtek le is válnak az üvegfalról, ezért korai sejtleválasztó faktornak is nevezik (Nász és mtsai 1967).

A pentont összefüggésbe lehet hozni az adenovírusok interferon-indukáló hatásával is (Pusztai és mtsai 1974). Az utóbbi években nukleáz aktivitást is kimutattak az adenovírral kapcsolatban (Burlingham és mtsai 1971).

Jelen közleményünkben a penton egyes funkcióira, aktivitására és immunológiai tulajdonságaira vonatkozó több mint 10 éve folyó vizsgálataink eredményeit foglaljuk össze.

#### *Anyagok és módszerek*

*Vírusterzsek, sejtenyészetek.* Az 1-, 5-, 9-es prototípus, valamint a Pinckney jelölésű onkogén 7-es és a betegből izolált 8-as (Nász és mtsai 1963) típusú humán adenovírus törzseket monolayer HeLa, HEP-2, AV<sub>3</sub> és primer emberi amnion, továbbá szuszpenziós HEP-2 sejt kultúrákban tenyésztettük a már ismertetett módon (Nász és mtsai 1963, Medveczky és mtsai 1976). A vírussal fertőzött sejtekből többszöri fagyasztás és olvasztás és homogenizálás után nyert kivonatot használtuk fel kísérleteinkben, megfelelő tisztítási eljárások után.

*Immunsavók.* A fenti sejt kivonatokkal, ill. az azokból tisztítási és szeparációs eljárások után nyert szolubilis komponensekkel nyulakat és tengerimalaco-

kat immunizáltunk a már ismertetett módon (Nász és Pereira 1965, Lengyel és mtsai 1965, Lengyel és Nász 1970a, Medveczky és mtsai 1975).

*Penton preparátum előállítása. Anioncserés kromatográfia.* DEAE cellulóz, DEAE Sephadex A-25 és A-50 oszlopokról emelkedő koncentrációjú NaCl oldatokkal, folyamatos grádiens vagy lépcsőzetes elució alkalmazásával nyertük a szeparált adenovírus komponenseket, a már ismertetett módon (Nász és Pereira 1965, Lengyel és Nász 1970a, Nász és mtsai 1968, Nász és mtsai 1971).

*Gélfiltráció.* Az adenovírus komponensek tisztításához Sephadex G-200 oszlopot használtunk a már leírt módon (Nász és mtsai 1971).

*Ultracentrifugálás.* A virionok tisztításához equilibrium centrifugálást alkalmaztunk, melyet egyes esetekben egy CsCl párnán való 1 órás előzetes tisztítási ultracentrifugálás előzött meg (Nász és Pereira 1965, Lengyel és Nász 1970b, Nász és mtsai 1971, Medveczky és mtsai 1975). A szolubilis komponensek vizsgálatához (Lengyel és Nász 1970b,) valamint a DNS szedimentációs profiljának meghatározásához (Medveczky és mtsai 1975) szaharóz gradiensen való zóna-centrifugálást alkalmaztunk.

*Komplementkötési reakciót (KKR), hemagglutinációt (HA) és hemagglutináció gátlást,* valamint „hemagglutination enhancement” tesztet az inkomplett hemagglutináció kimutatására Takátsy féle mikrotitrátorban, vagy esetenként csövekben végeztünk (Nász és Pereira 1965, Lengyel és Nász 1970b, Norrby és mtsai 1967).

*Géldiffúziós precipitációt, immunelektroforézist, immunozmoforézist és ún. rakéta elektroforézist* a már ismertetett módon (Nász és Pereira 1965, Nász 1967, Nász és mtsai 1968, 1971, Renn és Evans 1976, Ádám és mtsai közlés alatt) Difco Noble agar ill. SeaKem<sup>TM</sup> agaróz felhasználásával végeztünk.

*Enzimkezelések.* Tripszinkezelést 5x kristályosított tripszin (Serva) felhasználásával 37 C°-on végeztünk, majd equivalens mennyiségű szója inhibitor (Serva) adtunk a reakcióelegyhez. Receptor destruáló enzim (RDE) kezeléshez cholera filtrátumot (Philips-Roxane) használtunk. Lizozim, pronáz és ribonukleáz kezelést a P<sup>32</sup> jelzett E.coli DNS izolálására a már leírt módon (Medveczky és mtsai 1975) végeztünk.

*Nukleáz aktivitás kimutatására* P<sup>32</sup> jelzett E.coli DNS-t használtunk s meghatároztuk a reakcióelegy savoldékony nukleotid tartalmát és a DNS szedimentációs profilját vagy elektroforetikus mobilitását a már ismertetett módon (Medveczky és mtsai 1975, Medveczky és mtsai 1976).

*A radioaktivitás mérése* Packard Tri-carb típusú liquid scintillációs spektrométerben történt (Medveczky és mtsai 1975), a *fehérje meghatározás* Lowry és mtsai módszere szerint (1951), a *DNS mennyiségi meghatározása* 260 nm-en mért abszorpció alapján PYE-Unicam SP 800 ill. Spektrom 204 spektrofotométerben.

*A DNS elektroforetikus mobilitását* agaróz gél elektroforézissel (Medveczky és mtsai 1976) vizsgáltuk.

*Az aminosav összetételt JLC-5 AH (Jeol) automata aminosav analizátor segítségével a már ismertetett módon (Ádám és mtsai közlés alatt) határoztuk meg.*

Az izoelektromos pont meghatározás 100 ml-es (LKB 8100 Ampholine Electrofocusing Equipment) készülékben történt (Ádám és mtsai közlés alatt).

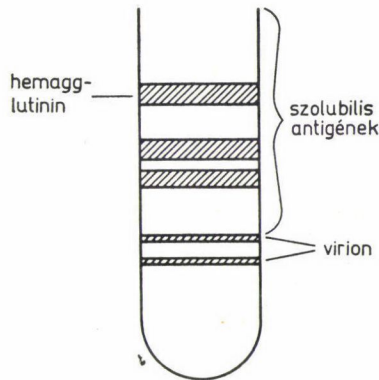
### *Eredmények*

#### *Kísérletek a penton és dodekon szeparálására. Ultracentrifugálás.*

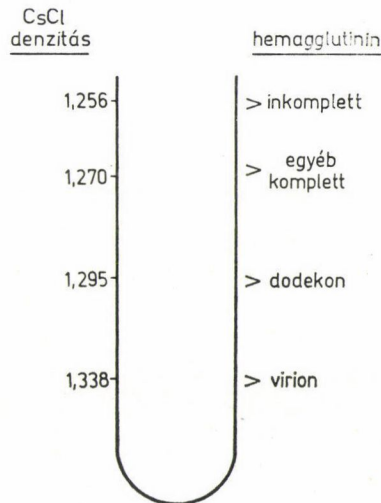
E kísérletek során CsCl equilibrium centrifugálással szeparáltuk a teljes vagy részben előzőleg Arceton 113-mal tisztított vírustartalmú sejtkivonatból a szolubilis komponenseket. Miután ismeretes, hogy az adenovírus hemagglutinációs tulajdonságáért a penton felelős valamilyen formában, így a pentont, vagy annak aggregátumait tartalmazó frakciók megfelelő species vvt-jeivel komplett vagy inkomplett agglutinációt mutatnak (Norrby 1968a). A 7-es (7P) típusú onkogén adenovírus törzs, mely a Rosen szerinti (1960) I. hemagglutinációs csoportba tartozik, s ennek megfelelően majom vvt-eket agglutinál, az equilibrium centrifugálási kísérletben egy jól meghatározott, éles hemagglutinációs csúcsot mutatott a 9—10. frakcióban (1. ábra). Ez a szolubilis komplett hemagglutinin jóval alacsonyabb denzitású, mint az infektív vírus, így attól jól elválasztható ezzel a szeparálási módszerrel, viszont ugyanitt más szolubilis komponensek, hexon és fiber is található, amit az azonos típusú és más adenovírus típus ellen termelt immunsavókkal végzett pozitív KKR reakcióval bizonyítottunk. Miután ez a hemagglutinin komplett hemagglutinációt adott, s titerét heterotípusos adenovírus immunsavó hozzáadása nem befolyásolta, ez a szolubilis komponens minden valószínűség szerint több penton aggregátuma, valószínűleg tehát dodekonnak felel meg.

A Rosen szerinti (1960) II. hemagglutinációs alcsoportba tartozó típusok közül, melyek a patkány vvt-ekkel adnak teljes agglutinációt, a 8-as és 9-es típust vizsgáltuk centrifugálási módszerekkel. A két típus equilibrium centrifugálással kapott eredményei igen hasonlóak, így a 2. ábrán a 8-as típussal kapott hemagglutinációs eredményeket mutatjuk be. A három komplett hemagglutinációt mutató csúcs közül az első az 1,34 g/ml denzitású adenovirionnak felel meg. A második, 1,295 g/ml denzitás körüli a dodekonnak, míg az alacsonyabb denzitású frakciókban komplett és inkomplett hemagglutininek egyaránt található. Utóbbiak kimutatására a hemagglutinációt heterotípusos adenovírus immunsavó jelenlétében kell elvégezni. Az itt található komplett hemagglutininek penton dimereknek felelhetnek meg, míg az inkomplett hemagglutininek monomer pentonnak és fibernek.

E típusok különböző komponenseit előzetes kromatográfiás szeparálás után (l. később) szaharóz grádiensen való zóna-centrifugálással is vizsgáltuk.

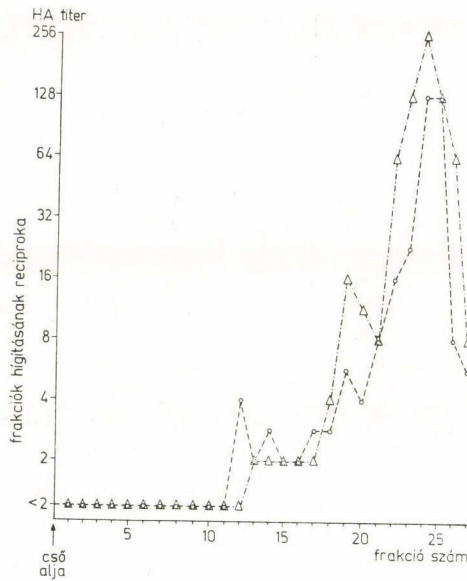


1. ábra: 7-es típusú adenovírus CsCl equilibrium centrifugálása során nyert sűrűsödési csíkok. A víruskomponensek elhelyezkedése

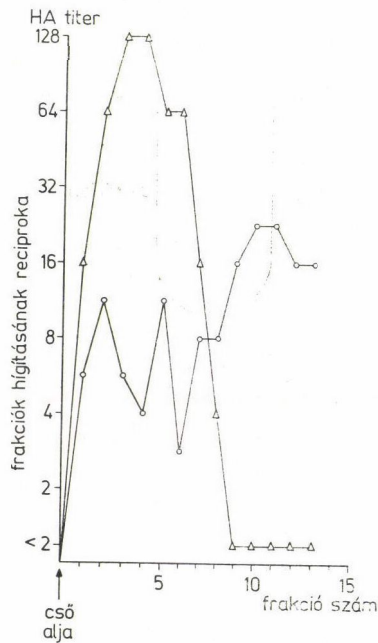


2. ábra: 8-as típusú adenovírus hemagglutininjeinek elhelyezkedése CsCl equilibrium centrifugálás után

A penton a centrifugacső felső harmadában helyezkedett el (3. ábra), legnagyobb mennyiségben a felszínhez közel, a 22—26. frakcióban. A két típus dodekonjának vizsgálatakor az eredmények már nem voltak ennyire egybehangzóak. A 9-es típus dodekonjának zóna-centrifugálásakor egy határozott csúccsal rendelkező, nagyobb ülepedési sebességű komplett hemagglutinint találtunk a cső alsó felében (4. ábra) és egy kisebb ülepedési sebességű inkomplett hemagglutinint a cső felső harmadában (5. ábra). A 8-as típus dodekonja sokkal labilisabbnak bizonyult és a cső alján és közepén is találtunk a komplett hemagglutinin mellett (4. ábra), azt meghaladó mennyiségű inkomplett hemagglutinineket (5.



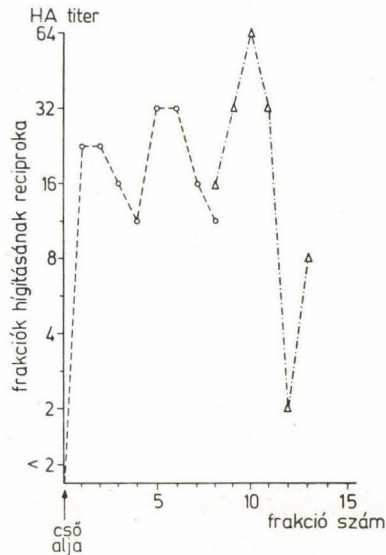
3. ábra: 8-as és 9-es típusú adenovírus pentonjának zóna-centrifugálása szaharóz grádiensen. A frakciók HA titeré heterotípusos adenovírus elleni immunsavó jelenlétében.  
 Jelek: ○ — ○ 8-as típus      △ — △ 9-es típus



4. ábra: 8-as és 9-es típusú adenovírus komplett szolubilis hemagglutininjének zóna-centrifugálása szaharóz grádiensen.  
 Jelek: ○ — ○ 8-as típus      △ — △ 9-es típus



ábra), jelezve, hogy a centrifugálási folyamat végére már a dodekon elbomlott kisebb számú pentonból álló poli- vagy dimerekre, illetve monomerekre. Előbbiek még komplett hemagglutininékként mutathatók ki, utóbbiak már csak heterológ adenovírus immunsavó jelenlétében agglutinálnak, tehát inkomplett hemagglutininékként.



5. ábra: 8-as és 9-es típusú adenovírus szolubilis komplett hemagglutininjének zóna-centrifugálása során kimutatható inkomplett hemagglutininékként. Jelek: 1. 3. ábra.

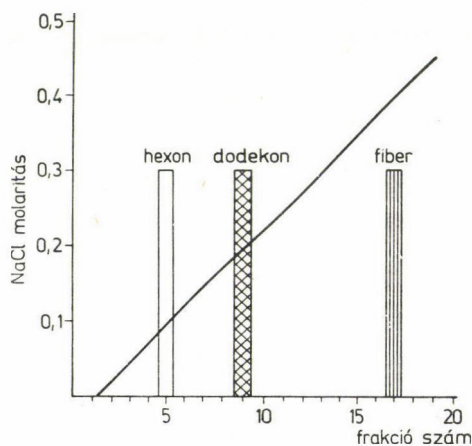
### Anioncserés kromatográfia

A 7-es típusú adenovírus DEAE cellulózon való kromatográfiája során (6. ábra) a szolubilis komplett hemagglutinin (dodekon) 0,2M koncentrációjú NaCl oldattal eluálódott az oszlopról, a többi szolubilis komponens közül a hexon ennél előbb, 0,1M koncentrációnál, a fiber pedig jóval hátrább, 0,4M NaCl-dal. DEAE Sephadex A-50 oszlop használata esetén a dodekon eluciója zömmel 0,25—0,35M NaCl oldatnál következett be.

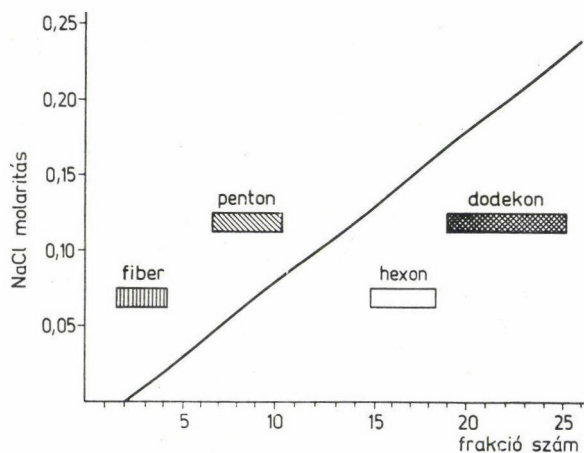
A II. hemagglutinációs alcsoportba tartozó típusok anioncserés kromatográfiájakor a DEAE Sephadex A-25 oszlop biztosította a legjobb szeparálást (Lengyel és Nász 1970b, Nász és mtsai 1971), bár a komponensek eluciójának sorrendje mindkét DEAE Sephadex készítménynél azonos volt: fiber, penton, hexon, dodekon. Ezt illusztrálja a 7. ábra, melyen a 8-as típusú adenovírus szolubilis komponenseinek elució sorrendjét mutatjuk be. Az azonos alcsoportba tartozó 9-es, 10-es és 13-as típus anioncserés kromatográfiája hasonló sorrendet mutatott, sőt a III. alcsoportba tartozó 1-es és 5-ös típusé is. Utóbbiak azonban

dodekonnal nem rendelkeznek, így ezeknél sorrendben csak fibert, pentont és hexont mutattunk ki (8. ábra).

A kísérletek során a penton és dodekon tartalmú frakciók sejttenyészeteken kifejezett toxikus hatást mutattak. E „korai CP hatás”, valamint a tripszinérzékenységi vizsgálatok bizonyították, hogy a hemagglutináció alapján identifikált komponens valóban pentont tartalmaz.

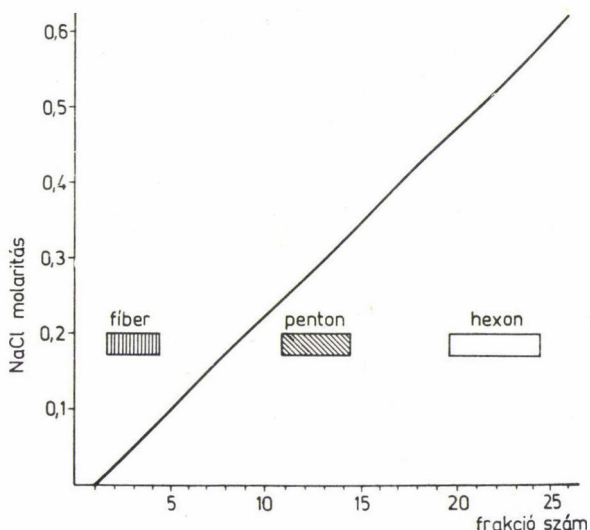


6. ábra: 7-es típusú adenovírus szolubilis komponenseinek elúciós sorrendje DEAE cellulóz oszlopon végzett anioncserés kromatográfiában



7. ábra: 8-as típusú adenovírus szolubilis komponenseinek elúciós sorrendje DEAE Sephadex A-25 oszlopon végzett anioncserés kromatográfiában

A penton ill. dodekon tartalmú frakciók mindhárom alcsoportba tartozó típusok esetében hő- és tripszinérzékenynek bizonyultak. A 7-es típus hemagglutininjének titere 10 perces 56 C°-on való hőkezelés vagy 1 órás 0,1%-os trip-



8. ábra: 1-es típusú adenovírus szolubilis komponenseinek elúciós sorrendje DEAE Sephadex A-50 oszlopon végzett anioncserés kromatográfiában

szinkezelés hatására tizedére csökkent. Az I. táblázatban bemutatjuk a 8-as típus pentonjának és komplett hemagglutininjének tripszinkezelés hatására bekövetkezett változását. A penton, mely saját és más alcsoportba tartozó heterotípusos adenovírus immunsavó jelenlétében egyaránt agglutinálja a patkány és bizonyos típusok esetében a humán vvt-eket, tripszinkezelés hatására már csak saját alcsoporton belüli immunsavó jelenlétében agglutinált, vagyis fiberré alakult. A dodekon hemagglutinációs titere is kb. huszadrésztére csökkent, s tripszinkezelés után nagy mennyiségű fiber keletkezett. Mindkét anyag korai CP hatása is megszűnt a tripszinkezelés után.

I. táblázat

8-as típusú adenovírus penton és dodekon tripszinerzékenységének vizsgálata

Vizsgált hemagglutinin	tripszin kezelés	komplett HA titer	inkomplett HA titer		korai CP hatás
			azonos	más	
			alcsoportba tartozó immunsavó jelenlétében		
penton	0	- <sup>1</sup>	32 <sup>2</sup>	32	+
	+	-	48	4	-
dodekon	0	512	512	512	+
	+	24	768	96	-

<sup>1</sup> < 1 : 4

<sup>2</sup> reciprok érték

### Vörösvértestre való adszorpció és elúció

A 7-es típus szolubilis hemagglutininjé teljes mértékben adszorbeálódott a rhesus vvt-hez, 1 órán át 37 C°-on. Más komponensek számottevő adszorpciót nem mutattak. Éjszakán át 4 C°-on a hemagglutinín legnagyobb része eluálódott a vvt-ekről, ily módon a hemagglutinín visszanyerhető és más szolubilis komponensektől elválasztható.

#### II. táblázat

8-as típusú adenovírus dodekonnal és pentonnal végzett vvt adszorpciós és RDE elúciós kísérletek

Vizsgált hemagglutinín	kezelés	komplett HA titer	inkomplett HA titer	
			azonos	más
			alcsoportha tartozó immunsavó jelenlétében	
dodekon	0	32 <sup>1</sup>	32	32
	humán vvt	— <sup>2</sup>	16	12
	RDE a vvt-hez	256	256	256
penton	0	—	32	32
	humán vvt	—	32	32
	Ad-13 savó <sup>3</sup>	24	32	32
	humán vvt	8	12	8
	humán vvt RDE a vvt-ekhez	— 192	— 192	— 192
penton	0	—	24	24
	Ad-11 savó <sup>4</sup>	12	24	24
	humán vvt	4	12	8
	humán vvt RDE a vvt-ekhez	— 24	4 48	— 48

<sup>1</sup> reciprok érték

<sup>2</sup> < 1 : 4

<sup>3</sup> azonos alcsoportha tartozó heterotípusos immunsavó

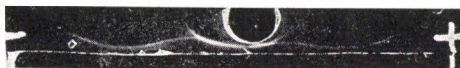
<sup>4</sup> más alcsoportha tartozó heterotípusos immunsavó

A II. hemagglutinációs alcsoportha tartozó típusok komplett hemagglutininjé szintén adszorbeálódik a patkány és (bizonyos típusok esetében) humán vvt-ekhez, elúciójuk azonban semmilyen hőfokon sem következik be. Ha a 8-as vagy 9-es típus szolubilis komplett hemagglutininjét humán vvt-ekhez adszorbeáltuk, úgy RDE kezeléssel azok eluálhatók voltak a vvt-ekről s ily módon tisztított formában kvantitativ visszanyertük azokat. Monomer pentonok esetében azonban, melyek inkomplett hemagglutinációt mutatnak csak, ez az adszorpció csak alig, vagy egyáltalán nem következett be. Ha azonban az inkomplett hemagglutinínhez először heterotípusos adenovírus immunsavót adtunk, s így komplett hemagglutininné alakítottuk át, úgy az adszorpció létrejött, s ha humán vvt-eket használtunk és két egymás utáni vvt kezelést végeztünk, úgy a penton legnagyobb részét tisztított és koncentrált formában RDE kezeléssel

vissza tudtuk nyerni. A II. táblázat mutatja e kísérletek eredményeit. Láthatjuk, hogy a penton előkezelésére mind saját, mind más alcsoportba tartozó heterológ adenovírus immunsavó alkalmas volt. Eluciót csak humán vvt-ek és csak RDE kezelés hatására értünk el, patkány vvt-ekkel adszorpció elérhető ugyan, de elució RDE-vel nem lehetséges.

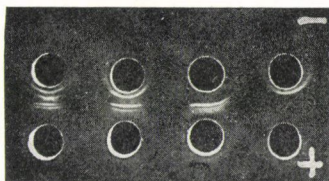
### *Immunológiai vizsgálatok*

Az 5-ös adenovírus típus géldiffúziós vizsgálatakor három precipitációs csíkot kaptunk, melyek közül kettő részleges azonosságot mutatott, ez a penton és fiber antigénnek megfelelő csíkokra volt jellemző. Elektromos térbe helyezve a vírusanyagot a három antigén, a hexon, a penton és a fiber más-más elektroforetikus mobilitást mutatott. Az 5-ös típusal végzett immunoelektroforézis eredményét mutatja a 9. ábra. A három precipitációs ív közül a középső, amelyik



9. ábra: 5-ös típusú adenovírus immunoelektroforézise homológ immunsavóval

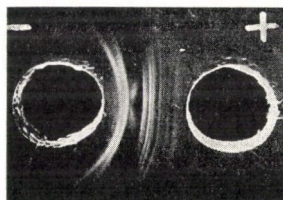
tehát a legkisebb mobilitást mutatja, a penton. Immunozmozforézissel az antigén kimutatása már három óra alatt is teljes mértékben sikerül, a penton ennél a módszernél is középső pozíciót foglal el (10. ábra). A vírusanyagot tripszinnel



10. ábra: 5-ös típusú adenovírus immunozmozforézise. A felső rezervoárookban balról jobbra: teljes vírus, tripszinnel kezelt teljes vírus, hexon és fiber. Az alsó rezervoár sorban 5-ös típus ellen termelt immunsavó

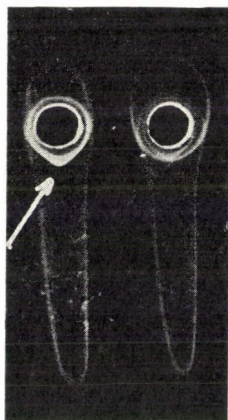
kezelve a csík eltűnik és a fibernek megfelelő csík növekszik, jelezve, hogy a penton elbomlott, s belőle fiber szabadult fel. Ezzel a módszerrel a penton precipitációs csíkja már az első órában megjelenik, s három órás futtatás után pedig egyes komponensek több csíkot is adhatnak, melyek között középen a penton  $\beta$  determinánsának megfelelő vattaszerű precipitációs köteg, mely néha ívelt, és a negatív pólus felé hajlanak a végei, jól kivehető (11. ábra).

Az 1-es típusú adenovírus antigénjeit rakéta elektroforézis módszerével vizsgálva a hexonnak megfelelő precipitációs terület kúp alakú, az ugyancsak



11. ábra: 5-ös típusú adenovírus immunozenomoforézise. + pólus felőli rezervoárban 5-ös típus elleni immunsavó. – pólus felőli rezervoárban 5-ös típusú adenovírus

pozitív irányba vándorló penton precipitátuma homogén opálosodás formájában jelenik meg, a hexon precipitációs területén belül. Tripszinkezelés után ez a precipitátum eltűnik és a fiber csíkja, mely körívszerűen veszi körül az antigén rezervoárt, megnövekszik (12. ábra).

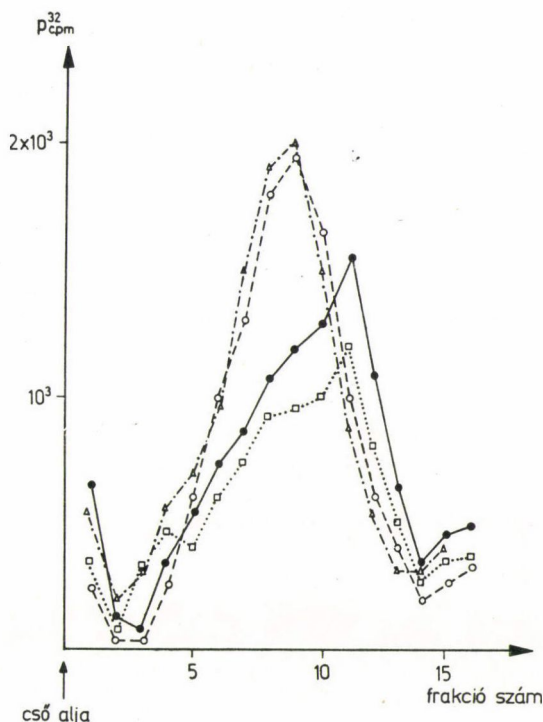


12. ábra: 1-es típusú adenovírus „rakéta” elektroforézise homológ immunsavót tartalmazó agaróz gélben. A nyíl a pentonnak megfelelő precipitációs területet jelöli

A 7P típusú adenovírus törzs tisztított hemagglutininje KKR-ban elsősorban a homológ vírustörzs ellen termelt immunsavóval reagált, kis mértékben azonban a heterológ 2-es típus elleni immunsavóval is. A teljes vírust tartalmazó anyag homológ immunsavóval géldiffúziós precipitációban, az 5-ös típushoz hasonlóan szintén három csíkot adott, melyek közül a középső feltehetőleg a pentonnak felelt meg (Nász és Pereira 1965).

*A penton nukleáz aktivitásának vizsgálata*

Egyes adenovírus típusokról megállapították, hogy tartalmazznak olyan endonukleázt, mely bontja az adenovírus DNS-t (Burlingham és mtsai 1971, Burlingham és Doerfler 1972), s az enzim a virionon belül a pentonnal hozható összefüggésbe. Kísérleteinkben az 1-es típusú adenovírussal fertőzött sejtek kivonatával sikerült olyan endonukleáz aktivitást kimutatnunk, mely az izotóp-



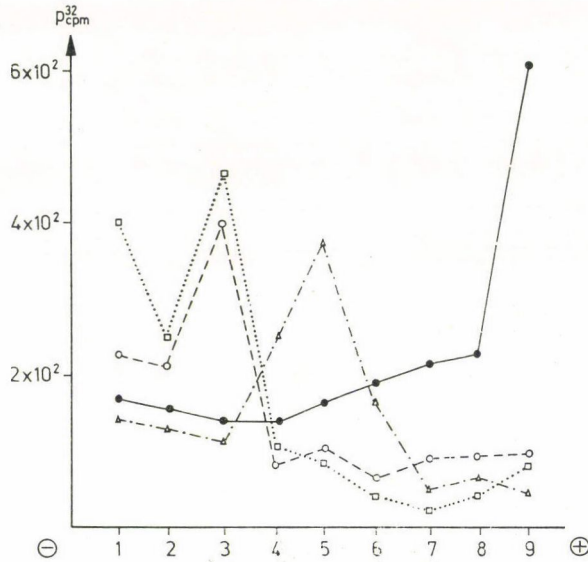
13. ábra: Tisztított 1-es típusú adenovirionok endonukleáz aktivitása anti-HEp IgG és tripszinnel előkezelés után.

Jelek:  $\triangle$  - - -  $\triangle$   $P^{32}$  DNS + puffer     $\bullet$  - - -  $\bullet$   $P^{32}$  DNS + virion  
 $\square$  .....  $\square$   $P^{32}$  DNS + anti-HEp IgG-vel kezelt virion     $\circ$  - - -  $\circ$   $P^{32}$  DNS + tripszinnel kezelt virion

pal jelzett DNS-t savoldékony oligonukleotidokig lebontotta. A kontroll sejtkivonat, mely nem fertőzött sejtekből készült, nem mutatott ilyen aktivitást. Sejtekből kivont, tisztított virionokkal viszont vírusához asszociált endonukleázt mutattunk ki, melynek hatására kisebb molekulásúlyú DNS fragmentumok keletkeztek, mint a kontroll sejtek kivonatának hatására. Az esetleges virionra kötődött, sejteredetű enzimek lehetőségének kizárására anti-HEp IgG-vel kezelt virionokkal is elvégeztük a kísérletet, ez azonban nem tért el a kezeletlen

virionnal kapott szedimentációs profiltól. Tripszinnel kezelt virionokkal azonban a virion nukleáz aktivitása megszűnt (13. ábra), ami a penton szerepére utal a nukleáz aktivitásban.

Az 1-es típusú adenovírusból ezért megfelelő tisztítási lépéseken keresztül tisztított pentont állítottunk elő, és megvizsgáltuk annak endonukleáz aktivitását mind *E. coli*, mind pedig 1-es típusú adenovírus DNS-ével. A 14. ábra a



14. ábra: 1-es típusú adenovírus tisztított pentonja endonukleáz aktivitásának vizsgálata  $P^{32}$  jelzett *E. coli* DNS szubsztráttal. A DNS elektroforetikus mobilitása 0 (□), 5 (○), 20 (△), és 60 (●) perc inkubáció után

különböző ideig pentonnal inkubált *E. coli* DNS elektroforetikus mobilitását mutatja. Míg a 0 és 5 perces inkubáció után nem látszik még lényeges bomlás, 20 perc után már erősen nő az elektroforetikus mobilitás, 60 perc után pedig a DNS nagyrészt lebomlott gyorsan vándorló fragmentumokra. Szubsztrátként 1-es típusú adenovírusból kivont, tisztított DNS-t használva, hasonlóképpen kimutattuk a nukleáz aktivitást (15. ábra). Tisztított hexon és fiber készítmények nem okozták a DNS szubsztrát hasonló bomlását.

#### *A penton aminosav összetételének meghatározása*

Az 1-es típusú adenovírus szolubilis pentonjának aminosav összetételét összehasonlítottuk a virion és a nem fertőzött kontroll sejtpreparátumok aminosav összetételével (III. táblázat). A virionban a bázikus aminosavak relatív





15. ábra: 1-es típusú adenovírus szeparált DNS-e elektroforetikus mobilitásának változása tisztított 1-es típusú penton jelenlétében, agaróz gélelektroforézisben.

Jelzések: 1 = kezelés előtt, 2 = pentonnal való 5 perces inkubáció után, 3 = pentonnal való 60 perces inkubáció után

aránya magasabb, mint a pentonban (lys, arg), utóbbiban viszont magasabb aszparaginsav, treonin és szerin tartalmat találtunk, mint akár a virionban, akár a kontroll sejtekben.

#### *A penton izoelektromos pontjának meghatározása*

Az 1-es típusú adenovírus szolubilis komponenseinek izoelektromos pontját vizsgálva az egyes vírusfehérjék a 72 órás vizsgálati idő alatt a nekik megfelelő pH tartományban opaleszkáló korong formájában gyűltek össze. A pentonnak megfelelő frakciók fehérje meghatározás és géldiffúziós precipitáció mód-

## III. táblázat

1-es típusú adenovírus tisztított pentonjának és virionjának aminosav összetétele

Aminosav <sup>1</sup>	Penton	Virion	HEp-2	AV <sub>3</sub>
Lys	5,04	6,34	14,86	17,61
His	2,03	2,11	nyom <sup>2</sup>	nyom
Arg	3,80	7,99	2,35	1,50
Asp	13,19	11,14	10,68	8,39
Thr	8,23	6,90	5,58	4,67
Ser	9,47	6,86	6,95	5,60
Glu	10,11	9,86	14,70	20,00
Pro	7,01	7,30	5,62	5,30
Gly	7,69	7,45	7,05	6,50
Ala	7,69	8,40	8,30	7,10
Val	5,72	5,69	5,20	4,30
Met	nyom	nyom	nyom	2,50
Ile	2,91	3,17	3,00	2,98
Leu	8,28	7,30	8,10	6,81
Tyr	2,67	3,12	2,71	2,25
Phe	3,78	3,68	3,52	2,71
Trp	NH <sup>3</sup>	NH	NH	NH
1/2 Cys	NK <sup>4</sup>	NK	nyom	nyom

<sup>1</sup> aminosav összetétel mol/100 mol aminosavban megadva<sup>2</sup> nyomokban<sup>3</sup> nem történt meghatározás<sup>4</sup> nem kimutatható

szerével vizsgálva pI 4,69 izoelektromos pontnak feleltek meg. A másik két szolubilis komponens ettől eltérő izoelektromos pontot mutatott (Ádám és mtsai közlés alatt).

## Megbeszélés

A penton antigén szeparálására végzett kísérleteink során tisztáztuk az eddig ilyen szempontból még nem vizsgált 7-es és 8-as típusú humán adenovírusok hemagglutininjainak természetét. Az I. hemagglutinációs alcsoport tagjai közül (Rosen 1960) ugyanis elsősorban a 3-as típust vizsgálták behatóan (Norrby 1966a, 1966b), majd pedig a 11-est (Norrby 1968b).

A 7P törzs szeparálása során nyert szolubilis komplett hemagglutinin tulajdonságai nagyrészt azonosak a 3-as típus dodekonjáról ismertekkel (Norrby 1966a). Érdekes jelenség viszont, hogy anioncserés kromatográfiában az igen nagyszámú vizsgált adenovírus típus közül eddig csak ennél és a legkifejezettebb onkogenitású 12-es típusnál fordult elő, hogy a típuspecifikus fiber (mely egyúttal a penton alkotórésze) a többi szolubilis komponens után, a magas NaCl koncentrációjú eluensekkel oldódott le az oszlopról (Huebner és mtsai 1964, Norrby és Ankerst 1969, Lengyel, Nász, Béládi nem közölt adatok).

A 8-as típus esetében elsőként sikerült szolubilis pentont és szolubilis komplett hemagglutint izolálnunk ebből a nehezen tenyészthető és fokozott

labilitást mutató törzsből. A kidolgozott vvt adszorpció — RDE elució módszerével új és gyors szeparálási eljárást kaptunk e típus kutatásához. A módszer minden valószínűség szerint az azonos alcsoportba tartozó, hasonló hemagglutinációs tulajdonságú típusok antigénjeinek szeparálására is alkalmas lehet (Norrby és mtsai 1967).

A 8-as típusból ilyen módon izolált pentonnal sikerült nyulakban anti-penton immunsavót előállítanunk, mellyel gátolni tudtuk a 8-as típusú adenovírus interferon indukcióját (Pusztai és mtsai 1974). Ezzel indirekt módon a pentonnak az interferon indukcióban játszott szerepére kaptunk újabb bizonyítékot.

Ugyancsak hasznos kutatási módszernek bizonyult az immunelektroforézis és — főleg gyorsasága és az adenovírus kutatásban való újszerűsége miatt — az immunozmoforézis. Ez utóbbi, valamint a rakéta elektroforézis segítségével néhány órán belül meghatározható egy vírustörzs vagy ellenanyag típusa.

A pentonhoz asszociált endonukleázt eleinte csak a 2-es és 12-es adenovírus típusnál tudták kimutatni (Burlingham és mtsai 1971, Burlingham és Doerfler 1972), újabban más típusokkal is sikeres kísérletekről számolnak be (Marusyk és mtsai 1975). Az 1-es típusról eddig nem volt adat az endonukleáz jelenlétére és első esetben sikerült izolált, tisztított pentonnal is endonukleáz aktivitást kimutatnunk (Medveczky és mtsai 1976). A tripszinkezeléssel és a többi tisztított szolubilis vírus komponenssel kapott eredményeink arra utalnak, hogy az enzimaktivításban a tripszinérzékeny penton bázis játszik szerepet.

Először sikerült meghatározni az 1-es típusú adenovírus pentonjának aminosav összetételét és e szolubilis komponens izoelektromos pontját (Ádám és mtsai közlés alatt).

### Összefoglalás

A humán adenovírusok három különböző alcsoportjába tartozó 1-, 5-, 7-, 8- és 9-es típusú vírustörzsek szolubilis penton antigénje fizikai, kémiai, immunológiai és biológiai tulajdonságait vizsgáltuk. A kísérletek során komplett és inkomplett hemagglutináció módszerével tanulmányoztuk a penton mono-, di- és polimereket s eljárást dolgoztunk ki a II. hemagglutinációs alcsoportba tartozó típusok pentonjának szeparálására. A penton antigén gyors kimutatására immunológiai módszereket dolgoztunk ki. Meghatároztuk a különböző típusok pentonjának elució tulajdonságait anioncserés kromatográfiában és meghatároztuk az 1-es típusú adenovírus tisztított pentonjának izoelektromos pontját és aminosav összetételét. Kimutattuk e vírustípus virionhoz kötött endonukleáz aktivitását s tisztított, szeparált pentonnal végzett kísérletekkel igazoltuk, hogy az enzim-aktivitás a pentonnal kapcsolatos.

## IRODALOM

- Ádám, É., Nász, I. és Medveczky, P.: Kísérletes Orvostud., közlés alatt.  
 Burlingham, B. T. és Doerfler, W.: *Virology*, **48**, 1, (1972).  
 Burlingham, B. T., Doerfler, W., Petterson, U. és Philipson, L.: *J. Mol. Biol.* **60**, 45, (1971).  
 Ginsberg, H. S., Pereira, H. G., Valentine, R. C. és Wilcox, W. C.: *Virology* **28**, 783, (1966).  
 Huebner, R. J., Pereira, H. G., Allison, A. C., Hollinshead, A. C. és Turner, H. C.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **51**, 432, (1964).  
 Klemperer, H. G. és Pereira, H. G.: *Virology* **9**, 536, (1959).  
 Lengyel, A., Dán, P., Cserba, I. és Nász, I.: *MTA V. Orv. Oszt. Közl.* **16**, 213, (1965).  
 Lengyel, A. és Nász, I.: *J. Virol.* **6**, 406, (1970a).  
 Lengyel, A. és Nász, I.: *Orvostudomány* **21**, 213, (1970b).  
 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. és Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265, (1951).  
 Marusyk, R. C., Morgan, A. R. és Wadell, G.: *J. Virol.* **16**, 456, (1975).  
 Medveczky, P., Csuzi, S., Nász, I. és Antoni, F.: *Orvostudomány* **26**, 213, (1975).  
 Medveczky, P., Csuzi, S., Nász, I., Ádám, É., Berencsi, Gy. és Antoni, F.: *Arch. Virol.* **52**, 315, (1976).  
 Nász, I.: *Lancet* **i**, 394, (1967).  
 Nász, I.: Újabb eredmények a szemészetben **1**, 6, (1975).  
 Nász, I., Béládi, I. és Lengyel, A.: *Az adenovírusok és kórokozó szerepük. Akadémiai Kiadó, Budapest* (1967).  
 Nász, I., Cserba, I. és Rózsa, K.: *Orvostudomány* **19**, 55, (1968).  
 Nász, I., Kulcsár, G., Dán, P., Lengyel, A. és Cserba, I.: *Orv. Hetil.* **104**, 442, (1963).  
 Nász, I., Lengyel, A. és Cserba, I.: *Orvostudomány* **22**, 101, (1971).  
 Nász, I. és Pereira, H. G.: *MTA V. Orv. Oszt. Közl.* **15**, 327, (1965).  
 Norrby, E.: *Virology* **28**, 236, (1966a).  
 Norrby, E.: *Virology* **30**, 608, (1966b).  
 Norrby, E.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **43**, 1, (1968a).  
 Norrby, E.: *J. Gen. Virol.* **2**, 123, (1968b).  
 Norrby, E. és Ankerst, J.: *J. Gen. Virol.* **5**, 183, (1969).  
 Norrby, E., Nyberg, B., Skaaret, P. és Lengyel, A.: *J. Virol.* **1**, 1101, (1967).  
 Pereira, H. G., Allison, A. C. és Farthing, C. P.: *Nature* **183**, 895, (1959).  
 Pereira, M. S., Pereira, H. G. és Allison, A. C.: *Lancet* **i**, 551, (1959).  
 Pusztai, R., Béládi, I., Lengyel, A., Nász, I. és Taródi, B.: *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **21**, 269, (1974).  
 Renn, D. W. és Evans, E.: *Anal. Biochem.* **71**, 588, (1976).  
 Rosen, L.: *Amer. J. Hyg.* **71**, 120, (1960).  
 Valentine, R. C. és Pereira, H. G.: *J. Mol. Biol.* **13**, 13, (1965).

## UNDULÁLÓ MEMBRANÓZUS SZERKEZETEK CITOKÉMIAI VIZSGÁLATA

BENCSÁTH MÁRTA, SCHAFF ZSUZSA és LAPIS KÁROLY az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1976. IX. 30.

Napjainkban a daganat-kutatás területén a vírusetiológia lehetőségének felvetésével a vírus-indukált tumorok komplex vizsgálata előtérbe került (Lapis és Schaff 1974.). Ismeretessé vált, hogy az RNS tumor-vírusok szaporodási ciklusa során a fertőzött sejtekben különböző átíróadási termékek jelennek meg, amelyek többféle módszerrel kimutathatók (Temin, 1966). Egyidejűleg morfológiailag is észleltek különböző vírus-szerű, vagy vírus-alkotórészre emlékeztető részecskéket a daganatsejtekben (Lapis és Schaff, közl. elfog.), és felvetődött, hogy ezen „zárványok” kapcsolatban állnak a vírus szaporodási ciklusával, illetve magát a fertőző részecskét reprezentálják.

Az MC 29 RNS tumor-vírus-indukált transzplantálható hepatóma (Langlois és mtsai, 1974. Lapis és mtsai, 1975.) sejtjeinek elektronmikroszkópos vizsgálatakor sajátos zárvány, az ún. unduláló membranózus szerkezetek (UMS) megjelenését észlelték (Schaff és mtsai, 1975.). Az 1–2  $\mu$  átmérőjű inkluziót a durva felszínű endoplazmatikus retikulummal összefüggő, annak mintegy folytatását képező, változatos lefutású membrán-szerkezetek alkotják.

Az UMS morfológiailag elkülöníthető az endoplazmatikus retikulummal ugyancsak kapcsolatos, annak ciszternáiba betüremkedő, citokémiailag már jellemzett tubuloretikuláris struktúráktól (TRS; Schaff és mtsai, 1973. Schaff és mtsai, 1975.). Mindkét zárvány-típust kimutatták néhány normál szövetben (Bassot, 1966. Schaff és mtsai, 1975. Van Lennep, Lanzing, 1967.), de leginkább kóros elváltozások során, elsősorban virális fertőzések és daganatok kapcsán (Bloodworth, Shelp, 1970. Chandra, 1968. Pincus és mtsai, 1970. Smith, Deinhart, 1968. Uzman és mtsai, 1971.) jelenik meg.

Jelen vizsgálataink célja, hogy citokémiailag jellemezzük a vírus-indukált transzplantálható hepatómában előforduló UMS-t és összehasonlítsuk a citokémiailag ismert TRS-sel.

### *Anyag és módszerek*

1. Kísérleteinkben az MC 29 RNS vírussal indukált primaer májtumorból kialakított transzplantálható csirke hepatómát alkalmaztuk (Langlois és mtsai, 1974. Lapis és mtsai, 1975.).

## 2. Elektronmikroszkópos eljárások

Vizsgálati anyagunkat  $\text{OsO}_4$  2%-os veronál-acetát pufferrel készített oldatában rögzítettük ( $\text{pH} = 7,4$ ), esetenként alkalmaztuk a 2,5%-os glutáraldehid előfixálást is ( $\text{pH} = 7,4$ ). A preparátum egy részét káliumpermanganát 0,6%-os vizes oldatával készítettük elő a beágyazáshoz (Luft, 1956.). A növekvő koncentrációjú alkohol-soros víztelenítést propilénoxid és Durcupan-ACM (Fluka) beágyazó gyanta követte. Az ultravékony metszeteket LKB III. és Reichert ultramikrotómmal készítettük. A kontrasztozást Reynolds szerint végeztük (1963). Az elektronmikroszkópos felvételek JEOL JEM 100B és Tesla BS613 elektronmikroszkóppal készültek, 60 kV gyorsítófeszültségnél.

## 3. Citokémiai módszerek

### a. Szénhidrát-tartalom kimutatása

Az ultravékony metszeteket Marinozzi gyűrűre vettük (1964.) a reakciók elvégzéséhez. A szénhidrát (poliszaharid)-tartalom kimutatásában Thiery módszerét (1967.) követtük, azaz 1%-os perjódsavas oxidáció után a tiokarbohidraziddal adott reakciót ezüsthidráttal tettük láthatóvá.

### b. Enzimatiszus vizsgálatok

Az enzim-emésztéses eljárások Monneron és Bernhard szerint (1966.) történtek, a fentiekben említett Marinozzi gyűrű segítségével. Pronase (Calbiochem; Grad B) 0,5%-os bidesztillált vizes és pepsin (Sigma; 2x krist., liof.) 0,5%-os 0,1 N sósavas oldatában inkubáltuk a vizsgálandó anyagot  $37\text{ C}^\circ$ -on, 10%-os perjódsavas oxidáció után. Mindkét enzim hatását a 0,5—1—1,5—2—4—6—18—24 órás időintervallumokban figyeltük meg. A kontroll preparátumoknál ugyanolyan körülményeket teremtettünk, csak az enzimeket hagytuk el az inkubálás során.

### Eredmények

Az MC 29 vírus-indukált transzplantálható csirke hepatóma tumoros sejtjeinek 6—8%-a tartalmazta a jellegzetes, denz gyűrűkből, membrán-hurkokból felépülő UMS-t. Megfigyelhető a membrán-szerkezetek és az endoplazmatikus retikulum kapcsolata is (1. kép).

A káliumpermanganáttal rögzített anyagban az UMS igen erős kontrasztot ad, hasonlóan a többi citomembránhoz (2. kép). Igen szembe-tűnő a membránok unduláló lefutása.

A Thiery-féle ezüstproteinátos metodikával az UMS a Golgi készülék és az endoplazmatikus retikulum membránjaihoz hasonlóan denz (3. kép), de a szénhidrátokra (glikogénre) jellemző erősen kontrasztos reakciót nem adja.

Ugyanakkor feltűnő a citomembránokkal ellentétben a széles membránrajzolat. Itt is megfigyelhető az UMS és az endoplazmatikus retikulum membrán-képleteinek összefüggése.

Az enzimatiskus emésztések eredményeit az idő függvényében a következő csoportokba oszthatjuk: (I. táblázat)

I. táblázat

Az UMS enzimatiskus érzékenysége pepsin és pronase hatására

Idő (óra)	Pepsin	Pronase	Kép
	hatás		
0,5–1	enyhe denzitás csökkenés		5. és 8.
1–2	denzitás csökkenés		6. és 9.
2–6	további denzitás csökkenés	denzitás és méret csökkenés	11. és 13.
6–18	csekély változás a 2–6 órához viszonyítva	erős denzitás csökkenés	14. és 15.
18–24	nem értékelhető		

A különböző időpontokban jó ultraszerkezeti megtartottság tapasztalható, és az enzimek UMS-specifikus emésztő aktivitása a 18 órai inkubációs időtartamig észlelhető. A kontrollokhoz hasonlóan (4, 7, 10, 12. képek) az emésztések során az UMS-t kivéve az összes egyéb sejt-komponens megtartotta integritását, és legfeljebb denzitásukban tértek el (5, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 15. képek).

Az I. táblázatból kitűnik, hogy rövid idejű inkubáció során nincs különbség a két enzim hatásában (0,5–1 óra: 5. és 8. kép). Egy órával később a pronase már hatásosabbnak tűnik (6., 9. kép). Az enzim-aktivitások a 2–6 órás intervallumban megközelítőleg kiegyenlítődnek (11., 13. kép). Ezt tapasztaltuk a 18 órás emésztésnél is (14., 15. kép). Ezen időpontban az UMS nehezen felismerhető szerkezetű szubsztanciát mutat (14., 15. kép), melyben helyenként a membrán-vonulatok még azonosíthatók. A 18–24 órás időintervallum értékelhetetlen az aspecifikus enzim-hatások miatt.

### Megbeszélés

Citokémiai vizsgálataink arra utalnak, hogy az UMS a TRS-hez (Schaff és mtsai, 1973.) és az egyéb membranózus szerkezetekhez hasonlóan magas lipoproteid-tartalmú struktúra. Bizonyítja a káliumpermanganátos fixálás utáni kontrasztos megjelenése, valamint a Thiery-reakció utáni denzitása. Ez utóbbi hívja fel a figyelmet az UMS és egyéb citomembránok közötti különbségre is.

Ugyanis, amint azt az eredményekben elemeztük, az UMS membrán-vonulatai kontrasztosabb, vastagabb formát adnak. A TRS esetén ezt a jelenséget a káliumpermanganáttal végzett fixálásnál tapasztaltuk (Schaff és mtsai, 1973.). Ezen adatok szerint citokémiai eltérés észlelhető a TRS, UMS, valamint a citomembránok között.

Enzim-emésztéses vizsgálataink bizonyítják az UMS fehérje tartalmát. A zárvány pepsinre és pronasera egyaránt érzékeny, de egyik enzim sem ért el a másikkal szemben kiemelkedően jellegzetes hatást. Mindezekből közelebbi következtetések nem lehetségesek az UMS-t felépítő fehérjék természetét illetően.

Az UMS citokémiai vizsgálatait a funkció közelebbi megismerése érdekében végeztük. Megállapítottuk, hogy az inklúzió lipoproteid-tartalmú szerkezet, amely összefüggésben van az endoplazmatikus retikulum membránjaival, azok folytatásában helyezkedik el. Az UMS nukleinsav tartalmáról még nincsenek adataink, de a káliumpermanganátos vizsgálatokból úgy tűnik, negatív eredményt remélhetünk ebben a kérdésben, mivel e reagens extrahálja a nukleinsavakat a sejtekből; az UMS azonban pozitív reakciót adott (Wetzel, 1961.).

Több szerző ismertette az UMS fiziológiai szerepét bizonyos állatfajoknál, így a tengeri macskahalak dendritikus szerveinek sejtkomponenseként, vagy az alacsonyabb rendű fajok esetében a víz- és ionháztartásban betöltött resorpciós funkciót (Schaff és mtsai, 1975. Van Lennep, Lanzing, 1967.). Figyelemre méltó azonban, hogy az UMS — hasonlóan a TRS-hez (Schaff és mtsai, 1975.) —, jóval gyakrabban fordul elő a kóros elváltozásoknál. Mivel funkciója még tisztázatlan, csak elképzelések állnak rendelkezésünkre.

Ha a normál sejtben betöltött funkciót tekintjük, feltételezhető, hogy az UMS a durva felszínű endoplazmatikus retikulum-termelte, egyfajta sima felszínű endoplazmatikus retikulum módosulat. Ez az elképzelés összeegyeztethető Baringer TRS-re alkotott megfontolásával, miszerint a membrán-képletek adott külső stimulus (pl. vírus-fertőzés) hatására a gazdasejt produktumai (Baringer, Swoveland, 1972.).

Tekintve, hogy a transzformált sejtek morfológiai és funkcionális változásáért az onkogén vírus genomja felelős, e vírusok a produktív infekció mellett olyan malignus elváltozásokat hozhatnak létre, amelyek során új vírus-specifikus antigének — tumor antigének — jelennek meg. Ezek az antigén-tulajdonságok nem azonosíthatók a normál sejt antigénjeivel, sem a vírus antigénekkal. Így lehetséges, mint az a TRS-nél sem kizárható, hogy az UMS a sejttranszformációval fellépő jellegzetes antigén tulajdonság, vagy virális komponens (Chou, 1967. Grimley és mtsai, 1973.). Ez utóbbinak azonban ellentmond egyes onkogén vírusok TRS-től (és a permanganátos vizsgálatok alapján feltehetően UMS-től is) eltérő nukleáz-érzékenysége (Schaff és mtsai, 1973.). A virális eredetet azonban nem cáfolja az 5-bróm-desoxiuridinnel humán lymphoid sejtekben indukált TRS-mintázatú szerkezetek megjelenése (Grimley és mtsai, 1973.).



Ez utóbbi vizsgálat alapján lehetséges, hogy az UMS, csakúgy, mint a TRS, a sejt anyagcsere-változásaival kapcsolatban álló aktív produktum, amelyről feltételezhető, hogy elsősorban a vírus-fertőzésekkel kapcsolatos sejtes anyagcsere-zavarok markere.

### Összefoglalás

A szerzők citokémiai módszerekkel vizsgálták az MC 29 RNS vírus-indukált transzplantálható csirke-hepatóma sejtjeiben leírt sajátos citoplazmatikus zárványokat, amelyek a durva-felszínű endoplazmatikus retikulummal kapcsolatos unduláló membránózus szerkezeteknek bizonyultak (UMS). Az UMS a permanganátos és enzim-emésztéses vizsgálatok szerint a korábbiakban leírt tubuloretikuláris struktúrákhoz (TRS) hasonlóan lipoproteid tartalmú inklúzióknak bizonyult. Az UMS a szénhidrát-kimutatásnál a TRS-től eltérő reakciót adott. Az UMS ugyanúgy, mint a TRS, leginkább neoplasztikus kórképeknél, valamint vírus-fertőzéseknél tapasztalható. A morfológiai és citokémiai jellemzések kibővítése az eddig még ismeretlen funkció megközelítését szolgálja.

### IRODALOM

- Baringer, J. R., Swoveland, P.: J. Ultrastruct. Res. 41, 270. (1972).  
 Bassot, J. M.: J. Cell Biol. 31, 135. (1966).  
 Bloodworth, J. M. B. és Shelp, W. D.: Arch. Pathol. 90, 252. (1970).  
 Chandra, S.: Lab. Invest. 18, 422. (1968).  
 Chou, S. M.: Science 158, 1453. (1967).  
 Grimley, P. M., Barry, D. W. és Schaff, Zs.: Fed. Proc. (Abs) 32, 964. (1973).  
 Langlois, A. J., Lapis, K., Ishizaki, R., Beard, J. W., és Bolognesi, D. P.: Cancer Res. 34, 1457. (1974).  
 Lapis, K., Beard, D. és Beard, J. W.: Cancer Res. 35, 132. (1975).  
 Lapis, K. és Schaff, Zs.: Orvosi Hetilap 115, 1083. (1974).  
 Lapis, K. és Schaff, Zs.: Medicina, Budapest. Könyvfejezet (közl. elfog.)  
 Luft, J. H.: Biophys. Biochem. Cytol. 2, 1799. (1956).  
 Marinozzi, V.: J. Ultrastruct. Res. 10, 433. (1964).  
 Monneron, A. és Bernhard, D. W.: J. Microsc. 5, 697. (1966).  
 Pincus, T., Blacklow, N. R. és Grimley, P. M.: Lancet 2, 1058. (1970).  
 Reynolds, E. S.: J. Cell Biol. 17, 208. (1963).  
 Schaff, Zs., Barry, D. W. és Grimley, P. M.: Lab. Invest. 29, 577. (1973).  
 Schaff, Zs., Lapis, K. és Grimley, L. M.: Morph. és Ig. Orv. Szemle 15, 166. (1975).  
 Smüth, R. D., Deinhardt, F.: J. Cell Biol. 37, 819. (1968).  
 Tenin, H. M.: Cancer Res. 26, 212. (1966).  
 Thiery, J. P.: J. Microsc. 6, 987. (1967).  
 Uzman, B. G., Saito, H. és Kasac, M.: Lab. Invest. 24, 492. (1971).  
 Van Lennep, E. W. és Lanzing, W. J. R.: J. Ultrastruct. Res. 18, 333. (1967).  
 Wetzel, B. K.: J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 711. (1961).



## T-SEJT RECEPTOROK\*, \*\*

FRANK MACFARLANE BURNET

Közlésre érkezett: 1976. XI. 17.

Az elméleti és kísérleti immunológia érdeklődése az utóbbi években elsősorban arra irányult, hogy meghatározza a T-lymphocyták természetét és kapcsolataikat a ma már viszonylag jól ismert B lymphocytákkal. Különösen érdekes és nehéz az antigén determinánsokat felismerő és azokkal reagáló T-sejt receptorok természetének meghatározása. Jelen előadásban egy hypothesis keretében szeretném körvonalazni néhány gondolatomat a T-sejtek receptorai-val kapcsolatban, amelyeket véleményem szerint az eddig elvégzett kísérletek alapján nem lehet elvetni, s amelyek egy új kutatási irány kialakulását serkentetik.

A felesleges ismétlések elkerülésére Noel Warner összefoglaló cikkéből indulok ki. A következőképpen összegezi véleményét: „Felvetődött, hogy a felismerés specifitását elsősorban a membrán immunglobulin (M-Ig) ellenőrzi és az antigén sejtekhez kötődése végbemehet kizárólag az M-Ig receptor közreműködésével, a T-sejt aktiválásához azonban szükség van az antigén és egy másik — a H2-vel kapcsolt polymorph gén által kódolt — sejtfelszíni receptor kölcsönhatására is”. (Warner, 1974)

Az ismertetődhő hypothesis ettől lényegében csak abban tér el, hogy feltételezésem szerint ez a második sejtfelszíni receptor csak az allogen antigénekkal kapcsolatos. A receptorok tehát két csoportra oszthatók; (A és B) és ha ezt elfogadjuk, számos másodlagos következtetésre jutunk, amelyeket érdemes megvitatnunk.

A. A T-sejt membrán immunglobulin receptora újonnan aktivált B sejtek terméke és passzív úton kerül a membránra IgM monomer formájában. Szükségszerűen standard szerkezetű monomer IgM (IgM1), specifitását a VH és VL segmentumok határozzák meg.

B. A másik T-sejt receptor-komponens független a passzívan megszerzett M-Ig receptoroktól (bár semmiképpen sem zárható ki az a lehetőség, hogy V típusú gének kevésbé specializált terméke). Ezeket egyszerűen allogen receptoroknak (AR) nevezzük és komplementer viszonyban vannak a faj fő histocom-

\* A Magyar Immunológiai Társaság 1976. okt. 8-án tartott ülésén elhangzott előadás.

\*\* Ennek a munkának egy teljesebb változata irodalmi hivatkozásokkal a közeljövőben angol nyelven fog megjelenni.

patibilitási antigénjének egy-egy antigen determinánsával. Mivel az érdeklődés elsősorban az ember HLA A és B rendszerére irányul, ezt fogom modellként használni, és feltételezem, hogy minden egyedben 4 antigén determináns (AD) expresszálódik és összesen mintegy 40—200 specifikusan különböző AD található az adott, vizsgált speciesben.

\*

A. Elsősorban azért állítom, hogy az IgM1 receptor passzív eredetű, mivel egyre több bizonyíték igazolja, hogy a T-sejt specificitás — amint azt a B-sejtek antitest termelése során megvalósuló kooperációval és a késői túlérzékenységi reakcióval kapcsolatban megállapították — kiterjed az összes antitestképzést indukáló antigénre és szinte minden szempontból hasonló az antitest specificitásra. Biológiai elképzelhetetlen, hogy a kötőhelyek hasonló fokú változatosságának létrehozása egyazon fajban két teljesen különböző folyamat révén valósuljon meg. A T és B-sejtek tehát vagy azután differenciálódnak, hogy az antitest-„modell” változatossá válásának teljes folyamata befejeződik, vagy a T-sejt Ig receptorát a B-sejt biztosítja passzív úton. A passzív eredet egyéb bizonyítékai lehetnek:

a) A T-sejtek felszíni IgM molekuláinak mennyisége nő, ha a sejtet allo-antigén aktiválja.

b) A T-sejteken levő IgM molekulák többsége reverzibilisen kötődik, és ha anti-Ig segítségével „capping” révén eltávolítják, nem képződik újra az inkubáció során, szemben a B-sejtekkel.

c) Hormonális úton bursectomizált csirkék késői túlérzékenységi reakciói — melyeket T-sejteknek tulajdonítanak — nem fejlődnek ki extrinsic antigénekkel szemben.

Kevésbé közvetlen bizonyítékok, amelyek további tárgyalást igényelnek, az alábbiak:

d) Birkák foetalis thymectomiájának meglepően korlátozott hatása van a születés utáni T-sejt reaktivitásra, ami legegyszerűbben úgy interpretálható, hogy a thymus-hiány fő következményként azt vonja maga után, hogy a „neutrális” T-lymphocyták nagy része ugyancsak hiányozni fog, de a megmaradó „neutrális” T-sejtek passzívan kapott IgM receptorokkal felfegyverezve bármely célra mozgósíthatók.

e) A mononucleosis infectiosa és még inkább a systemás lupus erythematoses során termelt számos autoimmun és „irracionális” antitest értelmezése ezen hypothesis alapján 1975-ben került közlésre (Scand. J. Rheum. 5. Suppl. 12, p. 31 (1975)).

f) Egy előző hypothesisben felvettem, hogy a hízósejtek — legalábbis részben — a T-sejtek leszármazottai, valamint azt, hogy az IgE basophil sejtekhez kötődése és ott az allergén számára specifikus receptorként realizálódó funkciója az IgM T-sejtekhez való kapcsolódásának igazi analógiája.

Aki megkísérli nyomon követni a T-sejt receptorok irodalmát, annak nin-

csenek illúziói azzal kapcsolatban, milyen nehéz azok passzív átvitelének hypothesisét bizonyítani, vagy kizárni. Warner világosan körvonalazta összefoglalójában a fő nehézségeket.

1. Lehetetlen tiszta, homogén T-sejt populációt nyerni; jóformán minden tisztának mondott suspensió tartalmaz kis (2%-nyi) mennyiségben B-sejteket.

2. Bármely kísérleti populáció általában ismeretlen arányú, változó mennyiségű aktivált T-sejtet tartalmaz, amelyek felszíni membránjai sokkal reaktívabbak.

3. A reagensek, nevezetesen az antiserumok, amelyeket a komplex analitikai kísérletek során alkalmaznak, könnyen tartalmazhatnak nem gyanított gátló vagy serkentő komponenseket, s ezért nehéz lehet teljesen megfelelő kontrollok beállítása.

Két további probléma említendő még:

4. Technikai nehézségeket okoz, hogy a T-sejtek felszíni immunglobulinjának mennyisége igen kicsi (200—5000 Ig molekula sejtenként).

5. Fontos akadály a kísérletek tervezésében és értelmezésében, hogy egy konvencionális értelemben specifikusan szenzitizált T-sejt generálódásához az szükséges, hogy előzőleg az antigén által stimulált B-sejttel szoros kapcsolatba kerüljön, mivel — valószínűleg — ez teszi lehetővé, hogy a megfelelő mennyiségű IgM1-t receptorként átvehesse.

B. A második rendszert a T-sejtek intrinsic rendszerének kell tekintenünk, vagyis ezeknek a receptoroknak a szintézisét a T-sejt genomja ellenőrzi. Feltételezésem szerint ez a rendszer egy meglehetősen leegyszerűsített klon szelektációs rendszer alapvető szerkezetével rendelkezik, amely csak az allogen fő histocompatibilitási antigének (MHCA-k) ellen irányul, pontosabban a faj MHCA repertoárját alkotó összes antigén determináns ellen. Ha X ilyen AD van — talán 100-as nagyságrendben —, akkor az AR rendszer (pattern) hasonló változatosságát is fel kell tételeznünk, mivel így válik lehetővé, hogy valamenynyí antigén determináns egy vagy több affinis AR-ral reagálva signált hozzon létre, másrésztől, hogy bármely antigén determináns számára sok olyan AR is legyen, amelyekkel nem képes reagálni. Feltételezzük ez esetben is, hogy a klaszszikus antigén-antitest kölcsönhatások esetében megnyilvánuló redundancia vagy finom specificitás működik,\* és hogy a különböző receptorok száma jelentősen nagyobb lehet X-nél (vagyis az AD számánál). A tárgyalás egyszerűsége kedvéért mégis feltételezzük, hogy az arány 1 : 1 és hogy a kölcsönhatások teljesen specifikusak. Ha 100-nak vesszük a faj antigén determinánsait, amelyek a 4 egységből álló MHCA-kat alkotják, akkor az adott kísérleti állat T-sejtjeinek kb. 4%-a reagál ugyanazon faj egy másik egyedének sejtjeivel. A reaktív sejtek száma feltehetően kevesebb az elméletileg számított értéknél, 50% ésszerű értéknek látszik. Ford és mtsai (1975) 5—12%-nyi reaktív sejtet találtak bármely tetszőleges allogen sejt készlettel szemben, így nagy valószínűséggel feltételez-

\* csak korlátozott mértékben

hetjük, hogy a patkány antigén determináns repertoárja 20 és 100 között van. A receptorok — szemben az antitesttel — nem válnak le a felszínről solubilis terméként. Normálisan sejt felszínnek sejt felszínrel való kapcsolata serkenti, aktiválja őket, ezáltal cytotoxicus vagy egyéb aktivitásra tesznek szert a serkentő antigént hordozó sejtek ellen. Mint később részletezzük, az antigén révén történő aktiválás fontos, vagy kizárólagos tényező lehet abban a folyamatban, amely a T-sejtet fogékonyá teszi az IgM B-sejtekről történő átvételére.

Ez a mechanizmus szükségesnek látszik a kísérletileg megfigyelhető allojen jelenségek magyarázatához. E mini-klonszelekciós rendszer létezése ugyanakkor néhány genetikai és fejlődéstani problémát vet fel. Valahogyan meg kell magyaráznunk:

1. a MHCA-ket felépítő 20—200 antigén determináns evolúcióját és eloszlását, melyek mindegyike feltehetően rendelkezik egy stabil struktúrgénnel;

2. azt, hogy minden egyes individuumban jelen vannak receptorok, amelyek mindegyikét valószínűleg két strukturális gén kódolja és amelyek megfelelnek az egész faj legtöbb vagy összes antigén determinánsának. Nincs más mód arra, hogy az ABCD felépítésű MHCA-val rendelkező állat felismerje a P, Q, M, H stb. sztérikus elrendeződésű antigén determináns mintázatot, minthogy genetikai információja valamilyen módon raktározódik a genomban és ennek jelenléte evolúciós előnyt jelent. E nehézséget feloldhatjuk, ha Hood és mtsai (1975) multigén koncepcióját alkalmazzuk a fő histocompatibilitási antigénekre (némi újfajta módon) és az AR rendszerre egyaránt. A kifejtendő hypothesis különböző forrásokból származó elképzeléseken alapszik, és bizonyos, hogy ha lesz valamilyen kísérletekre ösztönző hatása, akkor egyes elemei bizonyos mértékig természetszerűleg meg fognak változni. Először is Warnert és másokat követve elfogadom, hogy az allojen receptor a V gén még nem tökéletesen meghatározott terméke. Feltételezem tehát azt, hogy az AR-ok immunológiai „területek” (domains), valószínűleg két V terület alkot egy kötőhelyet, nagyjából az antitesthez hasonlóan. Nincs adat nehézlánc jelenlétére vagy típusára vonatkozólag. Az allojen receptorokat a sejt szintetizálja megfelelő számú V gén ellenőrzésével. Ha a kötőhely két V géntermék kombinatorikus kapcsolódásával alakul ki, akkor elméletileg lehetséges, hogy csak 10—20 V géntípusról van szó, de biológiaiilag valószínű, hogy jelentősen nagyobb sorozat van jelen. Feltételezzük, hogy a T sejtek között a V-V típusok véletlenszerűen oszlanak el, és feltételezzük egy fenotipikus korlátozást: sejtenként egy pár manifesztálódik.

Az MHCA tetradok strukturális géneinek eloszlása bizonyára más módon. Mint más multigéneknél, itt is feltételezhető egy X számú génből álló készlet, amelyek mindegyikében mutációs változások halmozódtak fel, ami az AD géntermékek megfelelő változékonyságát biztosítja. Ezek a gének a faj minden tagjában közősek, de mindegyik (inbred) törzsből csak négy fejeződik ki a normális fenotípusban. Ez a tetrad határozza meg a törzs MHCA-ját és az összes lymphocytán, valamint változó mértékben a szervezet összes többi sejtjén expressált

stabil tulajdonságként van jelen. Ez egyezik a multigének általános koncepciójával. Egy további minőség is szükséges azonban, amellyel kapcsolatban Hood és mtsai (1975) összefoglalójában találunk néhány meglehetősen szoros analógiát. Feltételezzük, hogy somatikus mutációk (errors) következményeként bizonyos véletlenszerűen érintett sejtek, köztük lymphocyták is, antigén determináns eloszlása megváltozik. ABCD helyett pl. lehet ABQD vagy ABCX sőt PRZX; ami szükséges, az csak annyi, hogy a keringő sejtek felismerhetőek legyenek, mint allogen mintázatot hordozók, és hogy a csoport minden egyes génjének hasonló esélye legyen arra, hogy a keringő sejtek egy részében expressálódjon. Amint később említtem majd, a téves expressio néha a sejtek mutagen vagy viralis stimulációjának az eredménye. Ésszerű feltételezés, hogy egy sejt — mondjuk ABQD MHCA felépítéssel — néhányszor kontaktusba kerül a Q felismerésre képes T-lymphocytákkal és legtöbbjüket aktiválja, mielőtt cytotoxikus reakció áldozatává válik. A végeredmény az, hogy (a) minden egyes klon intermittáló serkentést kap és így fenntartja populációját, valamint (b) állandóan lesz néhány olyan aktivált T-sejt, amely IgM1 receptorokat akceptálhat, ha egy újabban stimulált, IgM-t szintetizáló B-sejt közelében van. Mivel a hypothesis szerint ilyen átvétel szükséges az effektív immun-működéshez, a megfelelő AD és AR készletek létezése a szervezetben, és a szabályozó multigének létezése a genomban szelektív túlélési értéket fog jelenteni.

Ebből következik, hogy ha egy új AD — mondjuk  $A^1$  — keletkezik mutáció révén egy egyedben, az öröklődik az utódokra, de ez csak akkor válik jelentőssé az evolúció szempontjából, ha talál az utódok között egy olyant, amely egy olyan mutáns, vagy előzőleg nem működő V gént hordoz, amely az  $A^1$  számára kötőhellyel rendelkezik. Ha ez megtörténik, akkor a pár terjedése a fajon belül a genetikai „sodrás” (drift) és a szelektív túlélés szokásos törvényeitől függ.

C. Amit „bonus hypothesis”-nek nevezhetünk, az az MHCA—AR rendszer elképzeléséből ered. Az elmélet felveti azt a gondolatot, hogy a „germ-line” V gének természete talán véletlenül, talán logikailag szinte tökéletesen megfelel Jerne (1971) elgondolásának, amely szerint ezek a gének histocompatibilitási antigének elleni antitesteket kódolnak. Feltételeztem, hogy az AR-ok két V domain-ből épülnek fel, mivel nyilvánvalóan így hasonlítanak legjobban egy már ismert receptorra (ti. az IgG receptorra. Ford.) Így aztán megfontolásra érdemes jelöltek akadtak a „germline” V gének számára — gének, amelyek termékei véletlenszerű párokba rendeződve fedni fogják a faj MHCA-it felépítő antigén determinánsok rendszerét. E nézet szerint az őssejtek, melyekből a T- és B-sejtek keletkeznek, ugyanazon V génekkel indulnak. A T-sejtekben a V gének hypervariabilisek, és nem bizonyított, hogy a C domain gének valaha is derepressálódnak. A B-sejtek vonatkozásában viszont fel kellett tételeznünk, hogy a somatikus diversificatio vagy a B-sejtté való differenciálódás folyamán, vagy pedig egy olyan ponton következik be, amikor az őssejt arra köteleződik

el, hogy utódai irreverzibilisen B-sejtté váljanak. A diversificatio létrejöttét leginkább a Baltimore (1975) által javasolt hypervariabilis régiók kifejlődésének elméletével lehet magyarázni. Ez sokkal nagyobb mértékű változékonyságot tesz lehetővé, mint a somatikus mutáció bármely szokásos típusa, de nem szükséges, hogy ezt döntő kérdéssé tegyük. Bármely megfelelően gyors diversificatio kielégítő.

Ez Jerne-étől teljesen eltérő megközelítés, és nem igényli az ő hypothesisének lényeges vonását, vagyis azt, hogy a mutánsok kivételével minden más szelektive eliminálódjon. Az én változatom szerint csak azok az AR-ok eliminálódnak, amelyek megfelelnek az egyed MHCA-ját reprezentáló tetradnak. A reprodukív sejtek az átadódott gének összességét megtartják, hogy azután a következő generatio számára meiosis révén standard módon szétválasztódjanak; a T-sejtekben az összes, a faj kizárólag más törzseiben megtalálható AD-kkel szemben reaktív AR expressált lesz, de klonálisan, vagyis sejtenként csak egy AR típussal.

D. Valószínűleg nem ideillő elméletem további előnyeit kutatni, de érdekes visszatérni egy korábbi elgondolásomhoz, amely a methylcholantrennel indukált egér fibrosarcomák TSTA-inak változékonyságát magyarázza. Ha fibroblastokon is lezajlik a mobilis sejtek esetében postulált folyamat, amelynek során időnként kieserélődik egy antigén determináns, akkor vonzó magyarázatot kapunk, ami alaposan kidolgozható. A lényeg az, hogy egyetlen fibroblast, amely egy szokatlan antigén determinánssal rendelkezik, nem von magára immunológiai figyelmet, hacsak egy jelentősebb klón nem keletkezik belőle. Mobilis sejtek, különösen a lymphocyták, életük folyamán igen nagy számú más lymphocytával kerülnek felszíni kapcsolatba. Számos alkalommal tárgyaltam, hogy milyen hatékony az immunrendszer önszabályozó működése a lymphoid sejtek incipiens malignus klónjainak eltávolításában. Érdekes bővítés lenne, ha a fibroblastok időnkénti MHCA constitutiot változtató képessége a test bizonyos részeiben kialakuló rosszindulatú daganatok kifejlődése elleni védekezés-ként jött volna létre. Egérben spontán igen ritkán jön létre (ha egyáltalán létrejön) az izmokban sarcoma, hacsak nem i. m. adják a methylcholantrent. Ha egy kezdeti tumor szinte mindig éles antigéneltérést mutat a szervezethez képest, akkor ez jelentősen meggyorsítja immunológiai elpusztítását.

Garrido és mtsai (1976) érdekes új megfigyelése igen lényeges lehet e hypothesis szempontjából. Ha Balb/C egérben methylecholanthrennel indukált fibrosarcoma sejteket in vivo 5—7 napig vaccinia vírus fertőzésnek tettek ki, akkor tíz további saját (private) és három olyan közös specificitás fejlődött ki, amely csak más H2 haplotípusú egerekben van jelen. A szerzők szerint az új antigén determinánsok legvalószínűbben derepressio eredményeként keletkeztek. Ha viszont a vaccinia vírussal összehozott tumorsejteket 14 nap után vizsgálták, nem találtak különbséget a fertőzetlen tumorsejtekhez képest; ez a különbség az immun-felügyelet működésével magyarázható.



E. Hasonlóan fontos Doherty és Zinkernagel (1975) munkája, amelyet az utóbbi két évben a histocompatibilitás típusának a vírusfertőzésre adott válaszra gyakorolt hatásával kapcsolatban végeztek. LCM és ectromelia vírusok által fertőzött egérs sejtek ellen cytotoxikus aktivitást csak a fertőzött egérs sejtekkel megegyező H2 típusú sejtek mutattak. Szerintük ez a használt egértörzsre jellemző MHCA-k specifikus virális módosításával függ össze.

Egy másik lehetséges magyarázat az, hogy a vírusfertőzés számos MHCA derepressióját teszi lehetővé, fogékonytá téve ezáltal a sejteket a syngen lymphocyták általi felismerésre. Meg kell jegyezni, hogy egy specifikus virális antigént is figyelembe kell vennünk itt az MHCA-ban beálló bármely változás mellett. Még felfedezésre vár, hogyan zajlik le ez a működés. Az alábbi lehetőségek jöhetnek szóba:

1. azonos H2-vel rendelkező vagy semi-syngen sejtek gyenge aktiválás hatására öntapadóvá (self-stickiness) alakulnak, vagy alakulhatnak, talán hasonló módon ahhoz, amit Edelman (1976) a neuroblastok kölcsönhatása esetében elképzelt. Hypothesis szerint azonban sokkal hatékonyabb contactus jön létre, ha az adhaesio specifikus azáltal, hogy a virális antigén expresszálódik a fertőzött sejt felszínén, majd reagál a cytotoxicus T-sejten levő IgM1 receptorral;

2. hasonlóképpen hatékony kapcsolat jön létre, ha a specifikus válasz a célsejten levő virális antigénhez kapcsolódó ellenanyag ellen irányul és nem közvetlenül a vírus antigén ellen.

3. Doherty és Zinkernagel (1975) szerint a vírus módosítja a H2 antigént, ami idegenként felismerhető specifikus új mintázatot eredményez. Ez azonban nem magyarázza meg világosan a syngen vagy semi-syngen sejtek szükségességét.

4. Saját kedvenc elképzelésem, amellyel kapcsolatban hasonló nehézségek vannak, Garrido és mtsai (1976) feltevésén alapszik. E szerint a vírus specifikus HC antigén(ek) derepressióját indukálja, amely maga után vonja a vírus természetének és a normálisan expresszált MHCA megváltozását. Ez történe tehát:

	VírusX	VírusY	Fertőzetlen
A egér	ADEG	ACEJ	ACEG
B egér	BEFH	BDFK	BDEH

Végeredmény: Idegen AD megjelenése, amely rendelkezik egy idegen antigén összes tulajdonságával; ezzel az idegen AD-vel az AR rendszer reagál, nem pedig az extrinsic antigénekkal reagáló IgM1 receptorok. Ebben az esetben is, akárcsak az összes többiben, egy potenciális öntapadást kell feltételeznünk.

Fordította: *Dr. Földes István és  
Dr. Minárovits János*

## IRODALOM

- Baltimore, D.*: Tumor viruses: 1974. (Ed: Cold Spring Harbor) Symp. Quant. Biol. 39, Pt. 2, 1187, (1975).
- Doherty, P. C. és Zinkernagel, R. M.*: Clin. Exp. Immunol. **19**, 355, (1975).
- Ford, W. L., Simmonds S. J. és Atkins, R. C.*: J. Exp. Med. **141**, 681, (1975).
- Garrido, F., Schirmacher, V., és Feststein, H.*: Nature, **259**, 228, (1976).
- Hood, L., Campbell, J. H., és Elgin, S. C.*: Ann. Rev. Genet. **9**, 305, (1975).
- Jerne, N. K.* Eur. J. Immunol. **1**, 1, (1971).
- Schrader, J. W. és Edelman, G. M.*: J. Exp. Med. **143**, 601, (1976).
- Warner, N. L.*: Advances in Immunol. **19**, 67, (1974).

## A SZOMATIKUS SEJTEK GENETIKUS HIBÁI ÉS KAPCSOLATAIK AZ IMMUNPATOLÓGIÁVAL ÉS ÖREGEDÉSSEL\*

FRANK MACFARLANE BURNET

Közlésre érkezett: 1976. XI. 17.

11 éve, hogy visszavonultam a „Walter and Eliza Hall Institute” igazgatói posztjáról és azóta az emberi élet szinte minden engem érdeklő oldalával foglalkoztam, örömmel keresve a „jó biológiai”, más szóval evolúciós magyarázatokat. Leginkább a patológia, a fertőző megbetegedések és az immunológia területével voltam kapcsolatban, de érdeklődtem az emberi viselkedés néhány vonatkozása iránt is és az utóbbi 5—6 évben egyre erősebben összpontosítottam figyelmemet az öregedésre és az öregkorral kapcsolatos megbetegedésekre. Magunk mögött tudva az 1950-es és az 1960-as éveket, a fentiek iránt érdeklődő orvos-biológus jól ismeri a kettős helix-et, a genetikai kódot és a proteinszintézis folyamatát, és összes kérdése végül is valamilyen vonatkozásban a DNS-hez kapcsolódik. Manapság mindegyikünknek a biokémiai genetika kifejezéseiben kell gondolkodnunk; én azonban tovább szeretnék menni és azt mondom, ha meg akarjuk érteni az életet és az evolúciót, akkor mindenekelőtt a *DNS-ben levő hibákkal* kell foglalkoznunk.

Talán a legfontosabb biológiai általánosítás az, hogy az újhoz vezető egyetlen út az evolúció során hibák sokféleségének megjelenése és ezen hibák következményeinek a túlélés vizsgájával való szembeesítése. Ez — nem dogmatikusan felfogva — a modern darwinizmus lényege. Ebben az előadásban a szomatikus sejtek genetikai hibáinak néhány orvosi vonatkozásáról szeretnék beszélni, különös tekintettel az emberi immunpatológiára és az öregedésre. Ezeket a kérdéseket közvetett módon szeretném megközelíteni, ezért először a genetikus hibák szomatikus sejtekben való nagymérvű halmozódásának leg súlyosabb és legérdekesebb emberi példáját, a recessív módon öröklődő xeroderma pigmentosumot fogom röviden tárgyalni.

### *Xeroderma pigmentosum*

Ritka állapot, egymillió születésre kb. négy eset jut, azaz 3—400 ilyen gyermek születik évente a világon. A tünetek korán jelentkeznek, a bőr nap-sütésre igen érzékeny, és az ilyen embereknek egész életük során szigorúan tá-

\* A Magyar Gerontológiai Társaság 1976. évi kongresszusán elhangzott előadás.

vol kell tartaniok magukat a napfénytől. Még ebben az esetben is a serdülőkor idejére a betegek bőre napnak kitett területeken szeplőkkel sűrűn borított, corneájuk és conjunctivájuk gyulladt, kifeléelyesedő; az ilyen egyéneken gyakran diagnosztizálnak és kezelnek bőrrákot. Néhány, a felnőttkort megérő beteg esetében több mint száz malignus bőrdaganatot is eltávolítanak. A xeroderma pigmentosumot előszeretettel kutatják az utóbbi években, és véleményem szerint ezen vizsgálatok legfontosabb eredményeinek összefoglalása lesz a legmegfelelőbb annak bemutatására, milyen jelentős lehet a DNS-ben bekövetkező hiba, mint emberi megbetegedés okozója. (Robbins és mtsai, 1974; Cleaver és Bootsma, 1975.)

1. A bőr-laesiók a fénynek kitett helyekre korlátozódnak, sűrűségük a különböző régiókban arányos lehet a kapott UV sugárzás mennyiségével. A pigmentált laesiókat különböző méretű, alakú és eltérő mértékben pigmentált szeplők, anyajegyek (moles) és malignus melanomák alkotják. A hámlésváltozások hyperkeratosis, vagy különböző malignus hámtumorerok formájában jelentkeznek. A bőrrákok típusai a gyakoriság sorrendjében: basalsejtes rák, elszarusodó laphámrák, acanthoma, malignus melanoma. Ez ugyanaz a sorrend, mint amit az európai származású normális embereknél találunk, akik szabad levegőn dolgoznak trópusi éghajlat alatt (pl. Queensland Ausztráliában). Erősen hozzávetőleges számítás alapján a xeroderma pigmentosumban szenvedők adott UV expositio esetén legalább tízezerszer hajlamosabbak bőrrák keletkezésére, mint a normális egyének. Végül, a bőr száraz és sorvad a különböző laesiók közötti területeken, mint az öregek bőre.

2. Részletesen vizsgálták xeroderma pigmentosumban szenvedő betegekből származó bőr-fibroblast tenyészetek UV besugárzásra adott válaszát. A legtöbb beteg sejtjeiben nem volt megfelelő a DNS-repair. Különböző anomáliákat mutattak ki, amelyek öt csoportba voltak sorolhatók, és leírtak néhány „variáns” típust, amelyeknél az excisiós repair normálisnak látszott, de az összes ismertetett esetben a DNS UV által okozott károsodását javító mechanizmus egy vagy több enzimje nem működött megfelelően.

3. A tipikus bőr-laesiót mutató xeroderma pigmentosumban szenvedők mintegy 40%-a a központi idegrendszer rendellenességeivel születik; microcephaliával, mentális retardációval, különböző neuromusculáris rendellenességekkel.

A xeroderma pigmentosum pathogenesisét még nem ismerjük teljesen, főként talán azért, mivel a DNS UV-károsodása (főként thymín dimerisatio) kijavításának mechanizmusa részletesen még *E. coli*-ban sem feltárt, még kevésbé emlős sejtek szövettenyészete esetében. Tágabb értelemben azonban a legvalószínűbb és jelenleg legcélravezetőbb megfogalmazás a következő lehet:

Egy sereg (a csírasejteket érintő, germ-line) mutáció, amely a DNS javításához szükséges DNS polymerase enzimkomplex számos komponensének valamelyikét módosítja, hibára hajlamosítja az egész komplexet. Ennek ered-

ményeként az UV sugárzásnak kitett területek sejtjei — mind a melanocyták, mind a háms sejtek — a nem megfelelő repair következményeit mutatják. Néhány sejtben a repair hiányzik, és a sejt elpusztul; ha ez elegendő sejtet érint, hámsorvadás figyelhető meg. Más sejtekben a fiziológiás DNS-javítás jól működik és a sejt életképes marad, de a nucleotid sorrend eltorzul, ami információs hibák megjelenését teszi lehetővé a genom különböző részeiben. A klinikailag felismerhető hibák fenotípusos manifesztációi adják a xeroderma pigmentosum jellegzetes képét.

Az a tény, hogy a hibás DNS-repair legalább két olyan csoportja ismeretes, amelyben a xeroderma pigmentosum tipikus bőrelváltozásai súlyos neurológiai károsodással kapcsolódnak (ide tartozik a de Sanctis-Caccione syndroma), külön magyarázatot igényel. A legnyilvánvalóbb lehetőség az, hogy egy vagy több hibára hajlamos DNS-javító enzim, amely a bőrsejtek UV károsodásával kapcsolatos, a fejlődő idegsejtekben is működik, és ezért a germ-line mutáció bőrelváltozások mellett központi idegrendszeri elváltozásokat is maga után von.

#### *Az öregedés hypothesis*

A xeroderma pigmentosummal kapcsolatos legtöbb munkát azután közzölték, hogy kidolgoztam elméletemet, mely szerint az öregedés a legtöbb — vagy összes — szomatikus sejtfeleségekből felgyülemelő mutáció következménye, és az öregedés mértéke a DNS javításában és replikációjában részt vevő DNS polymerase-k hibákra való hajlamát tükrözheti. Máshol fejtettem ki, hogyan keletkezett ez az elmélet (Burnet, 1974). Úgy vélem, a xeroderma pigmentosumról szerzett ismereteink fényében a fenti feltételezés még hihetőbbé válik. Ezért megpróbálom feltevésemet a jelenlegi formájában a lehető legvilágosabban előadni, ezt követően pedig előadásom fő részével folytatom, amely az öregedés immunológiai vonatkozásaival és azok jelentőségével foglalkozik. Azzal a feltételezéssel tárgyalom az említett témát, hogy az öregedés általános elmélete fő vonásaiban helyes és képes bizonyos mértékig fényt deríteni arra, hogyan ellenőrzi az immunrendszer saját működését.

Hypothesisem az öregedésre, ahogy az utóbbi 3—4 évben kidolgoztam, a következő:

1. A DNS-t javító enzimek hibára való hajlama genetikailag kódolt felépítésüktől függ, és ezért elvileg evolúciós ellenőrzés alatt áll.

2. A mutáció mértékét mind a csírasejtek, mind a szomatikus sejtek esetében az alábbi tényezők határozzák meg:

a) a sejteket érő fizikai vagy kémiai mutagén hatások,

b) a károsodott DNS javításával és a DNS replikációjával vagy transcripciójával foglalkozó enzimek hibára való hajlamának mértéke. Az ilyen hibára való hajlamnak legkírívóbb példája a xeroderma pigmentosumban szenvedő betegek esetén látható;

3. Az öregedés alapvető változásai az összes vagy a legtöbb szomatikus sejtben felgyülemelő genetikai hibák következményei, ezeknek két fontos klinikai megnyilvánulási formája:

- a) a szövetek és szervek működésének fokozódó elégtelensége és
- b) a korral kapcsolatos betegségek, különösen a rosszindulatú daganatok szaporodása.

A hypothesisból az következne, hogy az emlős fajok átlagos élettartama DNS-javító enzimeik hatékonyságával korrelációba állítható. Hart és Setlow kísérlete (1974) ezt szinte „gyanus” teljességgel erősíti meg. A második következmény az, hogy különböző fajokban a rák kor-specifikus incidenciájának az élettartammal és nem az évek számával kell korrelálnia. Ez is igazolást nyert. (Priester és Mantel, 1971; Gardner és mtsai, 1973).

Mielőtt rátérnék az immunrendszerre, meg kell még említenem az öregedés két másik aspektusát, nagy gyakorlati geriatrai jelentőségük miatt. Az első a test kötőszöveti vázára, a fibroblast sejtekre és az általuk termelt collagén és elasztikus rostokra vonatkozik. Az öregkorral járó hanyatlás jó-részt a collagén rostok megfogyatkozásával és minőségromlásával függ össze. A bőr jellegzetes sorvadása és ráncosodása, valamint a combnyak törékenysége öreg korban egyaránt ilyen változásokkal kapcsolatos. A collagénnek a kor előrehaladásával járó kémiai és fizikai változásaival kiterjedten foglalkoztak, általában kényelmesen vizsgálható inakat vagy szalagokat használva. Idős állatok in-elváltozásait általában a collagén fokozott „kristályosodásával” magyarázzák, ami a fibrillumokat alkotó lineáris makromolekulák közötti kereszt-kötések számának fokozódásával függne össze. Csökken az elaszticitás, fokozódik az összehúzódás mértéke melegítéskor, csökken az oldható collagén mennyisége is, és jelentősen csökken a collagén anyagcsere az állatban (Walford, 1969). Nem ismerek olyan ismertető jegyeket, amelyek alapján eldönthető lenne, hogy ezek a változások eredetileg normális rostokra gyakorolt kémiai hatások eredményeként jönnek-e létre, vagy pedig az őket termelő sejtek genetikai hibáit tükrözik. Magam az utóbbi magyarázat felé hajlok, de amennyire tudom, nem történt komoly kísérlet a kérdés eldöntésére.

A legtöbb kísérletben fibroblastok öregedését vizsgálták *in vitro* kultúrában — bár nem a collagén termeléssel kapcsolatban. Hayflick humán fibroblasttenyészetben végzett munkájának fő körvonalai jól ismertek: meghatározott tenyésztési feltételek mellett kb. 40 sejtgeneráció után a szaporodás csökkenni kezd, majd kb. az 50 generáció körül megszűnik (Hayflick, 1965). A Hayflick-féle határ létét széles körben megerősítették és figyelembe veszik, mint az öregedés lehetséges alapját. Semmiképpen sem világos, miért kell a növekedésnek megszűnnie akkor, amikor megszűnik, de legalább világosan tisztázták a serológiai elemzés és az enzimaktivitás összevetése alapján, hogy amint a kultúrák elérkeznek a végső stádiumba, a sejt enzimjei fokozott mértékben veszítenek hatékonyságukból. Linn és mtsai (1976) szintén kimutatták,

hogy a szaporodási határt megközelítő sejtekből vett mintákban a DNS polymerasek erősen hibára hajlamosnak mutatkoznak. Az eredmények jól egyeznek a „hibazuhatag katasztrófa” (cascading error catastrophe) képével, melyet néhány — a DNS vagy RNS replicációjában vagy repair-jében beálló jelentős hiba indít meg.

Kísérleti nehézségek gátolták meg azt, hogy a fibroblastok cellularis dinamikájával kapcsolatban bármiféle vizsgálatot végezzenek *in vivo*, és továbbra is kérdéses, hogy a Hayflick-határnak van-e bármi jelentősége a kötőszövetekben tapasztalható öregedési folyamatokban.

Az öregedés másik fontos klinikai vonatkozását az agy senilis elváltozásai képviselik. Különösen senilis dementia során, de jelentős mértékben egészséges öregkorban is, kimutatható a kéreg sorvadása, a neuronok számának csökkenésével, utóbbi mértéke arányos a dementia fokával. A neuronok post-mitotikus sejtek, az öregedéssel párhuzamosan fokozódó „kiesésüket” általában az ún. Orgel-féle katasztrófa létrejöttének tulajdonítják, ami a genomban felhalmozódó, egymással kölcsönhatásban levő hibák következménye. A senilis dementiát domináns, de változó penetranciájú genetikai állapotnak tartják, amely 90 éves korban az esetek 40%-ra jellemző. Ez beleillik abba az elképzelésbe, amely szerint a senilis dementia egyik megindítója a corticális neuronokban működő valamelyik DNS-javító enzim genetikai alapon kialakuló magas hiba gyakorisága. Orgel (1963) szerint a kezdeti hibák inkább az RNS-sel, mint a DNS-sel kapcsolatos enzimeket érintik, de a jelen tárgyalás szempontjából a két nézet közötti különbségnek nincs jelentősége.

### *Az immunrendszer alapjai*

Beszédem fő fejezetéhez érkezte, először azt kellene megvizsgáljunk, hogyan alkalmazható a felgyülemelő genetikai hiba hypothesis az immunrendszer öregedésére. Ehhez — logikusan — az szükséges, hogy először megvizsgáljuk az immunrendszer modern képét. Az immunrendszer működésével kapcsolatos magyarázatom (Burnet, 1976a, 1976b) sokat köszönhet annak, hogy az utóbbi években az immunológián belül elsősorban az autoimmun betegségek és az öregedéssel járó immunológiai változások iránt érdeklődtem. Ez szükségszerűen ahhoz vezetett, hogy némiképpen eltérően közelítsem meg a kérdést, mint egy olyan kísérletező, aki az egér immunválaszának genetikai szabályozásával kapcsolatos részletek felderítésével foglalkozik.

Az immunrendszer lényegében a szövetek kémiai integritásának fenntartásával foglalkozik. Fel kell ismernie bármely sejt, vagy komponens eltérő voltát attól, ami a szervezet genetikailag meghatározott sajátossága, és fel kell ismernie természetesen idegen baktériumok, vírusok vagy toxikus proteinek megjelenését az élő szöveteken belül. Az immunrendszer feladata az is, hogy olyan folyamatokat indítson meg, és néha szinte a befejezésig folytasson,

amelyek a betolakodó organizmusokat, sejteket vagy molekulákat eliminálni vagy ártalmatlanná tenni képesek. Ehhez finom megkülönböztető képesség és erősen szabályozott, egymást követő tevékenységek sora szükséges — de ez még nem minden. Az emlősökben olyan körülményeknek kell fennállniuk, hogy számos apai — az anya számára idegen — antigén, melyet az embrió és a foetus hordoz, ne váltson ki immunválaszt. Némiképp hasonlít ehhez az, ahogy az élelemből származó kis mennyiségű, de antigén tulajdonságú fehérjét minden zavar nélkül feldolgozunk, anélkül, hogy olyan tünetek jelentkezzenek, mint amilyeneket gluten-érzékeny enteropathiában (coeliacia) vagy gyermekkori tej- vagy tojás-allergiában észlelünk.

A természet csodája — melyet eddig csak részben értettünk meg —, hogy sikeresen megvalósul az a kényes feladat, amelynek lényege: a törvény és a rend fenntartása egy komplex és állandóan változó sejt-civilizációban, ahol az ellenőrző és ellenőrzött egységek minőségileg azonosak. Az immunrendszer a szervezetnek mint egésznek része és abba teljesen integrált. Az immunológiában ez az integráció mindig szem előtt tartandó, de most elsősorban a lymphocyta eredetű sejtek és termékeik által végrehajtott felismerő és ellenőrző tevékenység központi funkcióinak megértésével foglalkozunk. Az immunocyták egy felettébb változatos subpopulációkból álló készletet alkotnak, nem tökéletes kísérleti meghatározással B, T, plasma, precursor-T, helper-T, suppressor-T és K sejtekre oszthatók. Minden egyes csoporton belül genetikailag különböző klónok vannak, és inkább adaptív, mint genetikai változásokat mutató subpopulációk. Az egész együttes homeostaticus és önreguláló rendszerként fogható fel, ami lényegében sejtek egymásközi átmeneti kontaktusával, vagy keringésben levő solubilis anyagokkal történő információátadáson alapul. Az érintkező sejtek felszíni membránjaiba inkorporált, vagy más sejtekről felszabaduló effektor és receptor proteinek alkotják a kölcsönható ágenseket. A kapcsolatot és felismerést követően jelzések jönnek létre, amelyek — ha hiba nem történik — megfelelő celluláris reakciókat váltanak ki. Az immunocyták felszínén található receptorok és effektorok száma és változatossága óriási. Jerne (1971) szerint Ig sejt-receptorként vagy antitest kötőhelyként manifesztálódó immun-pattern repertoár az egyedben mintegy  $10^6$  nagyságrendű, a fajon belül pedig ennek a százszorosa. Az embernek kb. 40 fő histocompatibilitási antigén pattern-je van, és számos egyéb antigén komponens is található az immunocyta felszínén. Oudin és másokat követve Jerne (1974) hangsúlyozta, hogy egy B-sejt receptor antitest típusú-immun pattern-je potenciálisan egy új antigéndetermináns, egy idiotop, amely képes reagálni antiidiotypikus antitesttel.

Ez elegendő ahhoz, hogy megállapíthassam: az emlősök immunrendszerének helyes működése az összes érintett specifikus sejt és solubilis reagens megfelelő stericus mintájától (pattern) függ. A hatékony működéshez mindegyiknek genetikailag helyes formában kell jelen lennie, mivel mindegyik-



ről tudjuk, vagy feltételezzük, hogy struktúrgének által kódolt proteinek; mint minden struktúrgénben, ezekben is létrejöhet genetikai hiba — szomatikus mutáció. Az immunrendszer információs fehérjéinek genetikai hibái az alábbi sajátos tényezők miatt különösen fontosak:

1. Számos jelzés a klón extenzív szaporodását váltja ki; ha egy hiba nem megfelelő proliferációt eredményez, akkor egy hibás klón jöhet létre, amely már jelentős károsító képességgel rendelkezhet.

2. Az őssejtek érett immunocyttákká történő átalakulása során nagyfokú és bonyolult genetikai átrendeződéseknek kell végbemenniük, hogy a megfigyelhető diversitás kialakulhasson. E folyamat mindegyik lépésében hibák következhetnek be — szerintem specifikusan, hibára hajlamosító folyamatok lépnek működésbe az antitest diverzitás létrehozásának egyik fázisában — és viszonylag nagyobb számban jönnek létre hibás sejtek, mint a legtöbb más sejt típus esetében.

3. Az immunrendszer működéséhez szükséges, hogy egy adott immunocyta és a rendszer bármely más immunocyta közötti kapcsolat létesítésének valószínűsége maximális legyen. Egy genetikusan abnormális lymphocyta felismerése és immunológiai eliminálása ezért nagyobb valószínűséggel történik meg, mint bármely más típusú hibás sejté.

Az autoimmun állapotok létezése, jellegzetes regressióik és relapsusaik, a lymphoproliferatív neoplasmák különösen magas incidenciája immunodeficiens megbetegedésekben és gyógyszeres immunosuppressio alatt álló betegeken egyaránt könnyen érthetővé válik a fenti három sajátosság alapján.

### *Immunitás és öregedés*

Az öregedés általános elmélete szerint az élet során genetikai hibák jelennek meg és gyűlnek fel azokban a persistáló sejt vonalakban (csontvelő, őssejtek, talán mások is), amelyekből az immunocyta populációk megújulnak. A hibák jelentőssé válnak, ha 1. a sejt halálát okozzák, ez esetben utódok nincsenek, 2. a sejt kórosan érzékennyé válik proliferációs ingerekre, pl. a szervezetben állandóan jelenlevő antigénre, 3. a sejt malignus proliferációját idézik elő. Bármelyik esetben a megfigyelhető jelenség egy két vagy több hibából álló sorozat végeredményére adott választ tükrözi. Az öregedés legtöbb vonása, amely az immunrendszernek tulajdonítható, e háromféle változás valamelyikén alapulhat.

### *A fertőzés iránti fokozott fogékonyság öregkorban*

Valószínűleg helyes az a szokásos általánosítás, amely szerint egy kialakult immunitás fennmarad extrém idős korig, de az addig meg nem ismert antigénekre adott válaszképesség a korrallal gyengül. Az állítás első felét alá-

támasztó klasszikus példa a Faroe szigeteken 1846-ban lezajlott kanyaró-járvány, amely 60 évvel követte az előző járványt. (Panum, 1847) Csak azok a személyek nem betegedtek meg, akik már az 1786. évi fertőzést átélték.

Az öregek fertőzésekkel szembeni fokozott érzékenységet legjobban egy influenza A epidemia mortalitási adatai szemléltetik. A legtöbb esetet bronchopneumoniának, vagy néhány hosszán tartó állapot (emphysema, tüdőtuberculosis) következményének tartják. A heti mortalitási-csúcs elemzése azonban — amely az influenza A városon belüli terjedésének legjobb epidemiológiai mutatója — felfedi, hogy a mortalitás az öregek között kiugróan magas.

Mind a T, mind a B sejtpopulációk szerepet játszanak a fertőzés elleni védekezés különböző folyamataiban és ahogy várható, idős korban hiányok mutatkoznak jellegzetes működésükben. Az új antigének elleni antitest-termelés és a „természetes antitestek” szintje — mindkettő B-sejt funkció — csökken, és a T-sejt működés standard próbája, a bőrérzékenység vizsgálata szenzitizáló antigénekre, szintén csökkenő pozitivitást mutat az öregedéssel párhuzamosan.

Az öregkori halálozások nagy részét egy vagy több persistáló krónikus fertőzés, vagy acut terminális influenzafertőzéssel vagy más meg nem határozott légúti fertőzéssel kapcsolatos ellenállás hiány okozza. Azokban az időkben, amikor a tüdőtuberculosis még jelentős halálok volt, az egyik évben fellépő influenza A járvány a következő évben csökkent tuberculosis mortalitást vont maga után; az immunológiailag sérülékenyek az influenza-járvány következtében ugyanis már az előző évben elhaláloztak.

#### *Korral kapcsolatos betegségek, amelyeknek immunológiai komponensük is van*

Az emberi rosszindulatú daganatok többsége erősen kor-függő. Egy időben azt gondoltam, ez korrelációban állhat azzal, hogy az immun-felügyelet (surveillance) hatékonysága az öregedés során csökken. Jelenleg úgy vélem, hogy míg a lymphoid sejteket érintő malignus állapotok esetében meggyőzően bizonyított egy hatékony felügyelet létezése, az ember közönségesen előforduló rákjaival kapcsolatban ezen felügyelet jelentősége továbbra is kérdéses.

Jól ismert, hogy veseátültetés után prolongált immunsuppressio alatt álló (Starzl és mtsai, 1971) vagy krónikus immundeficiens betegségekben szenvedő (Good, 1970) egyének között jelentősen gyakoribbak a malignus betegségek. A gyakoriság fokozódásának 90%-áért lymphoproliferatív betegségek, különösen lymphoreticularis tumorok a felelősek. Ennek a jelenségnek egyetlen jelenlegi magyarázata az, hogy a legtöbb emberben gyakran megindulnak potenciális lymphoproliferatív folyamatok, de ezekkel a normális immunfelügyelet általában megbirkózik. Ez nem jogosít fel bennünket arra, hogy a krónikus lymphoid leukemia, myeloma multiplex és a solid lymphoid

tumороk korrал járó halmozódását teljesen az immunfelügyelet korrал párhuzamos gyengülésének tulajdonítsuk, de ennek is bizonyára van szerepe.

A fent leírt gondolatok automatikusan az autoimmun elváltozások témájához vezetnek. A legtöbb malignus állapothoz hasonlóan az autoimmun betegségek is általában monoklonális jellegűek, és gyakran „feltételes” malignus állapotnak tartják őket abban az értelemben, hogy az abnormális klón vagy klónok proliferációjához a sejtek megfelelő antigén-stimulációja szükséges. Az autoimmun betegségek incidenciája semmiképpen sem függ össze szabályosan a korrал; pl. a thyreotoxicosis, SLE, fiatal felnőttkori diabetes és rheumatoid arthritis inkább a fiatal felnőtt, vagy érett kor betegségei, mint az öregkoré. Mégis azok aránya, akiknél a szokásos klinikai-immunológiai vizsgálatokkal egy vagy több autoantitestet találnak, a kor előrehaladtával fokozódik. Továbbá, az öregkori átmeneti rheumás fájdalmak és egyéb zavarok kis autoimmun epizódok megnyilvánulásai lehetnek, s alternatív válasz híján nem árt lehetőségként figyelembe venni Burch elképzelését, amely szerint az időс kor minden degeneratív állapota autoimmun eredetűnek tartható.

Az öregkor másik jellemzője kis amyloid depozitumok megjelenése számos szövetben. Az amyloid fibrillumok részben immunoglobulin molekulák könnyű láncából, részben keringő  $\alpha 1$  globulinból (SAA) származnak; utóbbi szerepe ismeretlen, de öregkorban és különböző gyulladásos megbetegedésekben mennyisége nő (Rosenthal és mtsai, 1976). Károsodott plasmasejtek és lymphocyták gyakran észlelhetők az amyloid-felhalmozódások széli részein, és ez arra a gondolatra késztet, hogy focalis immunpatológiai folyamatok maradványainak tartssuk őket, melyekben celluláris autoantigének, cytotoxikus sejtek és autoantitestek játszottak szerepet.

### *Lymphoproliferatív betegségek és öregkor*

A krónikus lymphoid leukemia általában monoklonális B-sejt proliferáció, amelynek incidenciája jellegzetesen változik a korrал. Még közvetlenebbül kapcsolódik az öregkorhoz a myeloma multiplex és a nem-malignus gammopathiák, mely utóbbiakban monoklonális myeloma protein van jelen focalis csonttumороk nélkül. Kevesebbet tudunk a solid lymphoid tumороk különböző típusairól, de ezek mindegyik csoportjának jelentős része öregkorban keletkezik, beleértve a Hodgkin kórt is. A helyzetet erősen bonyolítja az Epstein-Barr virus és más, a lymphoid sejtekre specifikusan ható vírusok létezése, de — mint egyéb rosszindulatú megbetegedésekben — valószínű, hogy az összes lymphoproliferatív betegség is szomatikus genetikai hiba jelenlétén és a mutáns klón immunológiai és egyéb ellenőrzése alól történő kibúvásán alapszik.

Egy rövid előadásban elég felületesen kellett mozognom egy nagy területen, de remélem, sikerült felvázolnom az immunrendszer és az öregedés kap-

csolatának képét, ami elősegítheti az öregedés és az emlősök átlagos élettartamát megszabó tényezők természetének megértését. Mint minden, a való életben létrejövő, biológiai jelenség esetében, úgy itt is különösen bonyolultak a körülmények és számos véletlenszerű tényező befolyásolja őket, így csak stochastikus szabályok figyelhetők meg és vehetők figyelembe.

Összefoglalva, az emberi öregedésről alkotott képem a következő:

A) Az öregedés fiziológiai és patológiai változásai szerkezeti és működési rendellenességek és elégtelenségek felhalmozódásának következményei, amelyek fokozzák a potenciálisan halálos környezeti hatásokkal (pl. fertőzés, trauma) szemben megnyilvánuló sérülékenységet.

B) Ezek a szomatikus elváltozások szomatikus genetikai hibák következményei, amelyek egyrészt — leggyakrabban proliferatív betegséggel járó — szomatikus mutációt, másrészt szervelégtelenséggel és szövetsorvadással járó sejthalált vonnak maguk után.

Az immunrendszer, mivel működése erősen függ genetikailag megfelelően kódolt receptoroktól és mivel képes gyors klonális proliferációra, különösen ki van téve szomatikus genetikai hibák veszélyeinek, egyidejűleg homeosztatikus, valamint önellenőrző folyamatokat működtet a már kialakult hibák elhárítására. Az öregkori halálozások többségét feltehetőleg az immunrendszerben egyre inkább felhalmozódó genetikai hibák által okozott végső működésképtelenség okozza.

C) A legtöbb korrrel kapcsolatos betegség is úgy magyarázható, mint szomatikus genetikai hiba eredménye, amely gyakran a csírvonal genetikai anomáliája talaján fejlődött ki. Ez különösen vonatkozik a daganatok többségére.

D) Az élő sejtekben szomatikus mutációhoz vezető szomatikus genetikai hiba vagy a DNS replicatio és transcriptio normális folyamatában bekövetkező tévedés; vagy pedig a környezetből, ill. a szervezet szöveteiből és sejteiből származó fizikai, kémiai vagy virális mutagének által károsított DNS javításában beálló hiba eredménye lehet. A replicatio és a repair egyaránt igen bonyolult működések, amelyekben sok enzim játszik szerepet, és ezen enzimek többsége valószínűleg mindkét folyamatban részt vesz.

E) Mivel az enzimek genetikailag kódolt proteinek, aminosavsorrendjük mutáció következtében módosulhat. A legtöbb változás csökkenti hatékonyságukat és csak igen ritkán fokozza. A szomatikus mutációk arányát (köztük a sejtpusztuláshoz vezetőket is) módosíthatja tehát egy olyan csírvonal mutáció, amely a DNS replicatioval és javítással foglalkozó enzimek hiba-hajlamát befolyásolja.

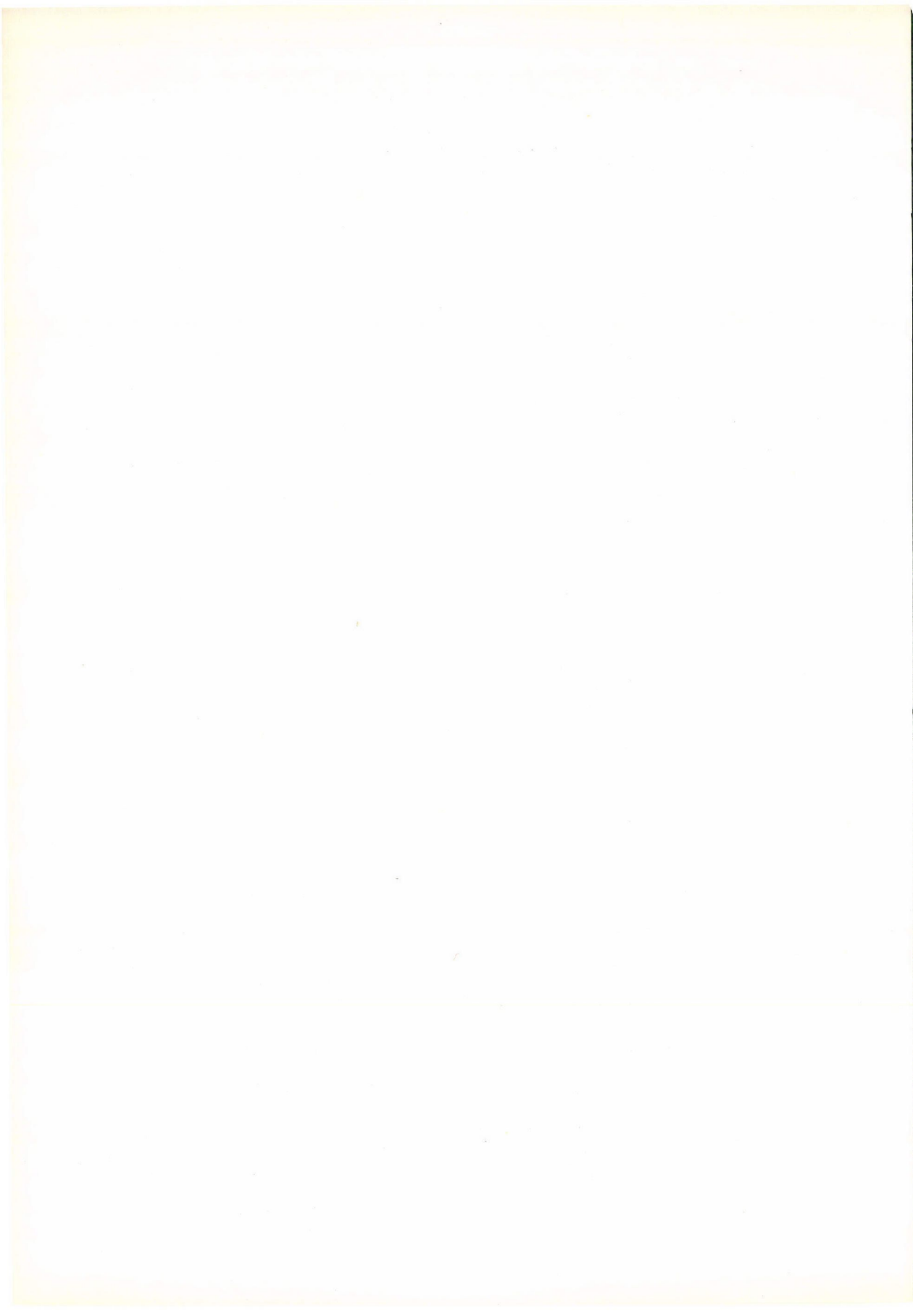
Ennek az általános megközelítésnek talán csak egy érénye van, nevezetesen, hogy a molekuláris biológia jelenlegi szintjén az alapvető hypothesis állításai lényegében kísérletileg ellenőrizhetők. A DNS-polimeráze hiba-

hajlama közvetlenül mérhető, és tíz éven belül a hypothesisist vagy megdöntik, vagy javított formában hasznos szerepet játszik majd a gerontológiai kutatásokban.

Fordította: *Dr. Földes István és  
Dr. Minárovits János*

#### IRODALOM

- Burnet, F. M.*: Intrinsic mutagenesis. Medical and Technical Publishing Co. Ltd., Lancaster, England (1974).
- Burnet, F. M.*: Immunology. (Readings from Scientific American) W. H. Freeman and Co. San Francisco, (1976a).
- Burnet F. M.*: Immunology, Aging and Cancer. W. H. Freeman and Co. San Francisco, (1976b).
- Cleaver, J. E. és Bootsma, D.*: Ann. Rev. Genetics, 9, 19. (1975).
- Gardner, M. B., Henderson, B. E., Estes, J. D., Menck, H., Parker, J. C. és Huebner, R. J.*: J. Nat. Cancer Inst. **50**, 1571, (1973).
- Good, R. A.*: In immune surveillance (Eds: Smith, R. T. és Landy, M.) Academic Press, New York and London, pp. 442–444. (1970).
- Hart, R. W. és Setlow, R. B.*: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **71**, 2169, (1974).
- Hayflick, L.*: Exp. Cell Res. **37**, 614, (1965).
- Jerne, N. K.*: Europ. J. Immunol. **1**, 1, (1971).
- Jerne, N. K.*: Ann. Immunol. (Institut Pasteur) **125C**, 373, (1974).
- Linn, S., Kairis, M. és Holliday, R.*: Decreased fidelity of DNA polymerase in aging human fibroblasts. (Personal Communication) (1976).
- Orgel, L. E.*: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **49**, 517, (1963).
- Panum, P. L.*: Arch. path. Anat. Physiol. **1**, 492, (1847).
- Priester, W. A., és Mantel, N.*: J. Nat. Cancer Inst. **47**, 1333, (1971).
- Robbins, J. H., Kreamer, K. H., Lutzner, M. A., Festoff, B. W. és Coon, H. G.*: Ann. int. Med. **80**, 221, (1974).
- Rosenthal, C. J., Franklin, C. E., és Frangione, B.*: J. Immunol. **116**, 1415, (1976).
- Starzl, T. E., Penn, I., Putnam, C. W., Groth, C. G. és Halgrimson, C. G.*: Transplant. Rev. **7**, 112, (1971).
- Walford, R. I.*: The immunologic theory of aging. Munksgaard, Copenhagen, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 118–122, (1969).



## A 3-ÉTER-6-AZIDOMORFINOK FARMAKOLÓGIÁJA. KZ AZIDOETILMORFIN, EGY ÚJ KÖHÖGÉSCSILLAPÍTÓ SZELEKTÁLÁSA

KNOLL JÓZSEF, az MTA levelező tagja, HÁRSING LÁSZLÓ GÁBOR és FRIEDMANN  
TAMÁS

Közlésre érkezett: 1976. XII. 30.

Bognár és Makleit által szintetizált azidomorfin vegyületek (Bognár és mt. 1968) előnyös farmakológiai spektrumát korábbi közleményeinkben ismertettük. Kimutattuk az azidomorfin és a 14-OH-azidomorfin erős fájdalomcsillapító hatását és szokatlanul kismértékű tolerancia és dependencia kapacitását (Knoll 1973, 1976; Knoll és mt. 1971, 1973/a, b, 1975/a, c). Az azidomorfin emberen fájdalomcsillapítóként 40-szer hatékonyabbnak bizonyult, mint a morfin, és igazolást nyert, hogy a teljes fájdalommentességet biztosító adagok tartós bevitele sem vezet dependencia kialakulásához (Rétsági és Schwarzmann 1973, 1976; Rétsági és mt. 1974). Az azidomorfin és a 14-OH-azidomorfin igen erősen deprimálják a kísérletesen kiváltott köhögést is (Knoll és mt. 1974/a, 1975/d; Friedmann és mt. 1976). A két félszintetikus izomorfin alkaloida a morfinnál és a fentanilnál kedvezőbb hatásszélességet mutat. Az azidomorfin és a 14-OH-azidomorfin bélmotilitást gátló hatása gyengébb, mint a megfelelő referens vegyületek esetén (Knoll és mt. 1974/b, 1975/e). Alábbiakban ismertetjük a 3-éter-6-azidomorfinok farmakológiai vizsgálatát, különös tekintettel a köhögéscsillapítóként terápiás szempontból is ígéretes azidoetilmorfinra. Az 1. ábra mutatja a 3-éter-6-azidomorfinok kémiai szerkezetét néhány ismert alkaloidával összehasonlítva.

### *Módszerek*

#### *1. Köhögéscsillapító hatás vizsgálata macskán*

Kísérleteinket 2—4 kg súlyú vegyes nemű macskákon végeztük, pentobarbitál narkózisban (30 mg/kg i. p.). A köhögést Domenjoz (1952) módszerével vizsgáltuk; kipreparáltuk a nervus laryngeus superiort és elektromosan ingereltük. Az ingerlés paraméterei; frekvencia 10 Hz, feszültség 5—10 V, impulzusszélesség 1 msec., az ingerlés időtartama 10 sec. A légsőbe T kanült helyeztünk és a köhögés amplitudóját Marey dobbal, forgó kimográfion regisztráltuk. A vizsgált vegyületeket a vena femoralison át, növekvő dózisban adagoltuk. Meghatároztuk a vizsgált vegyületek azon kumulatív dózisát,

3-éter-6-hidroximorfin		3-éter-6-oxomorfin		3-éter-6-azidomorfin		
	R		R		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Kodein	OCH <sub>3</sub>	Hidrokodeon	H	Azidoetilmorfin	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H
Etilmorfin	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Oxikodon	OH	Azidokodein	OCH <sub>3</sub>	H
Folkodin	O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -N			14-OH-azidokodein	OCH <sub>3</sub>	OH
				Azidofolkodin	O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -N	H

1. ábra: A vizsgált vegyületek kémiai szerkezete

amelynél a nervus laryngeus superior elektromos ingerlésére köhögési választ nem kaptunk. Ezt tekintettük a köhögéscsillapítás effektív dózisének és AtD<sub>100</sub>-zal jelöltük.

## 2. Köhögéscsillapító hatás vizsgálata patkányon

Kísérleteinket 160—180 g súlyú, mindkét nemű Wistar patkányokon végeztük. Az állatokat egyenként 23 × 22 × 11 cm méretű plexikamrába helyeztük. A kamrán 0,1 ml/perc sebességgel 10%-os citromsav aerosolt áramoltattunk át (Gösswald, 1958). Mértük a köhögés latencia idejét a vizsgált vegyület beadása előtt és után. Az állatok kontroll latencia ideje 29,41 ± 9,61 sec. (S. E., n = 40) volt, amelyet 18 órával a vizsgált vegyületek beadása előtt határoztunk meg. 100%-os hatásnak vettük, ha a vegyület beadása után a latencia idő meghaladta a 90 sec.-ot. Ennek alapján dózis—hatás görbéket vettünk fel és Litchfield-Wilcoxon (1949) módszerével meghatároztuk a köhögéscsillapító AtD<sub>50</sub> és a 95%-os konfidencia limit értékeit. Egy dózist 10 állaton vizsgáltunk. A vegyületeket 0,5 ml/100 g 0,9%-os NaCl-ban és desztillált vízben oldva vittük be s. c. és per os. A köhögés latencia idejét a vizsgált vegyület beadását követően 30—60 perc elteltével mértük.

## 3. A köhögéscsillapító hatás kinetikai vizsgálata

10 tagú patkány csoportokon Gösswald módszerével mértük a vegyületek orális köhögéscsillapító hatását. A vizsgált vegyületek 3 dóziséra idő—hatás görbéket vettünk fel és meghatároztuk az egyes dózisok hatásfelezési idejét



(tl/2). A köhögéscsillapító  $AtD_{50}$  értékeket dózis-hatás görbékről számítottuk. Az  $AtD_{50}$ -hez tartozó tl/2 értékeket dózis-tl/2 görbék alapján határoztuk meg.

#### 4. Fájdalomcsillapító hatás vizsgálata

A vegyületek fájdalomcsillapító hatását Woolfe és McDonald (1944) módszerével, Porszász és Herr (1950) módosításában mértük. Wistar patkányokat  $56^{\circ}\text{C}$ -os lemezre helyeztük és meghatároztuk a fájdalomreakció latencia idejét vegyület adás előtt és után.

Fájdalomcsillapításnak azt tekintettük, ha az anyag beadása után a latencia idő a kontroll érték két és félszeresére nyúlt. A fájdalomcsillapító  $ED_{50}$  értéket dózis-hatás görbékből számítottuk. A vegyületeket i. v., s. c. és orálisan adagoltuk. A fájdalomcsillapító hatást 30 és 60 perccel a beadás után mértük.

#### 5. Akut toxicitás

Mindkét nemű 120–150 g súlyú Wistar patkányokon határoztuk meg a vizsgált vegyületek akut toxicitását. A vegyületeket i. v., s. c. és orálisan adagoltuk. A vegyületek  $LD_{50}$  értékeit a 48 órás elhullásból, Litchfield-Wilcoxon szerint számítottuk.

#### 6. Légzésvizsgálat altatott macskán

2–4 kg súlyú, vegyes nemű macskákat i. p. 30 mg/kg pentobarbitállal altattunk. A légesövet kanüláltuk, amelyet Ambu-E ventil szeleppel kötöttünk össze. A szelep kilégző ágához Krogh készüléket csatlakoztattunk és a kilégzési volument forgó kimográfion regisztráltuk. A regisztrátumból számítottuk a légzésszámot és a légzési perctérfogatot kontrollban és a vegyületek beadása után. A légzésdepressziót a következő módon számítottuk;

$$\text{Légzésdepresszió} = \frac{\text{légzésszám ill. légzési perctérfogat } AtD_{100} \text{ dózisonál}}{\text{kontroll légzésszám ill. légzési perctérfogat}}$$

A légzésdepresszió szignifikanciáját a Student féle egy mintás  $t$  próbával határoztuk meg. A vizsgált vegyületek i. v.  $AtD_{100}$  dózist kumulatív és egy injekcióban adagoltuk.

#### 7. A légzésdepresszív hatás kinetikai vizsgálata

A légzésdepresszió felezési idejét macskán pentobarbitál (30 mg/kg i. p.) narkózisban határoztuk meg. A légsőbe kanült vezetünk és a légzésszámot nyomástransducerrel Radelkis Potentiometric Recorderen (type OH 814/1)

folyamatosan regisztráltuk. A vizsgált vegyület  $AtD_{100}$  dózisát vittük be egyetlen i. v. injekció formájában és a légzésdepresszió felezési idejét ( $tl/2$ ) időlégzésszám gátlás görbékből számítottuk.

### 8. Sav—bázis vizsgálatok

A vizsgált vegyületek a sav—bázis egyensúlyra kifejtett hatását az Astrup féle ekvibrációs módszerrel, Radelkis Biological Microanalyser (type OP 210/1) készüléken mértük. Macskákat 30 mg/kg pentobarbitál i. p. adásával elaltattunk és a vegyületeket i. v. adagoltuk. A légsövet kanüláltuk, és a légzésszámot folyamatosan, nyomás transducerrel, Radelkis Potentiometric Recorderen regisztráltuk. Az artériás vérmintákat az arteria femoralisba kötött kanülön át vettük le és meghatároztuk az aktuális pH,  $pCO_2$ ,  $pO_2$ , standard bikarbonát, pufferbázis és bázistöbblet értékeiket.

### 9. Légzésvizsgálat éber patkányon

130—180 g súlyú vegyes nemű Wistar patkányok mellkasára felfújható ballont helyeztünk fel. A ballon légzést követő térfogatváltozását transducer közbeiktatásával, Radelkis Potentiometric Recorderen regisztráltuk. A vizsgált vegyületek orális  $AtD_{50}$  dózisát 0,5 ml/100 g testsúly volumen desztillált vízben oldva adtuk be 60 perccel a mérés előtt. A vegyületek légzésszám csökkentő hatását a fenti képlettel számítottuk; a hányadosok szignifikanciáját a Student féle egymintás  $t$  próbával határoztuk meg. Meghatároztuk a vizsgált vegyületek azon orális dózisát is, amely a légzésszámot 25%-kal csökkentette ( $SD_{15}$ ). Különböző dózisoknál mértük a légzésszámot és az  $SD_{75}$  értéket dózis-hatás görbékből határoztuk meg.

### 10. A vérnyomásra kifejtett hatás vizsgálata

Intraperitoneálisan adott 30 mg/kg pentobarbitállal altatott macskákon mértük a vegyületek vérnyomásra kifejtett hatását. A vizsgált vegyületek i. v. köhögéscsillapító dózisát ( $AtD_{100}$ ) egy injekcióban a vena femoralisba adtuk be. A vérnyomás változást az arteria femoralisba kötött higanyos manométerrel mértük és kimográfion regisztráltuk.

### 11. A bélműködésre kifejtett hatás vizsgálata

A bélmozgásokra kifejtett hatás vizsgálatára Macht és Barba-Gose (1931) módszerét használtuk. Mindkét nemű, 18—22 g súlyú egereknek 0,5 ml 10%-os szénszuszpenziót adtunk orálisan. A szénszuszpenzió beadása után 60 perccel az állatokat étergőzben megöltük és meghatároztuk a szén előrehala-

dását a bélben. A kontroll állatokban a beadott szén 1 óra alatt  $33 \pm 3,12$  (S. E.,  $n = 40$ ) cm-rel távolodott el a pylorustól. A vizsgált vegyületeket s. c. adagoltuk 0,1 ml/100 g testsúly volumenben, a szénsuszpenzió beadásával egyidőben. A bélmotilitás gátlást a következő képlettel számítottuk;

$$\text{Bélmotilitás gátlás (\%)} = 100 - \frac{\text{kontroll passzás} - \text{passzás anyag adás után}}{\text{kontroll passzás}} \times 100$$

Az 50%-os gátló dózist ( $ID_{50}$ ) dózis-hatás görbékből Litchfield—Wilcoxon szerint határoztuk meg.

### 12. Tolerancia és fizikális dependencia vizsgálat

Fiatál patkányokból alkotott 20-as csoportokat kezeltünk orálisan 20—24 héten keresztül. Az állatok a vizsgált vegyületek orális  $AtD_{100}$  dózisát kapták naponta egy alkalommal. Az  $AtD_{50}$  értéket a kezelés előtt és a kezelés minden 4. hetében meghatároztuk és a tolerancia fokát a

$$\text{Dózis hányados (DR)} = \frac{AtD_{50} \text{ krónikusan kezelt állatokon}}{AtD_{50} \text{ kezelés előtt}}$$

hányadossal jellemeztük. A krónikus kezelés 18., 20. és 22. hetében vizsgáltuk a fizikális dependencia kialakulását morfin antagonisták i. p. adásával (10 mg/kg nalorfin, 2,5 mg/kg naloxon, 2,5 mg/kg 14-OH-N-allil-norazidomorfin). Az antagonisták beadása után az elvonási tünetek megjelenését 2 órán át figyeltük. A dependencia mértékét az 1. táblázat szerint határoztuk meg és Buckett egységeiben (1964) fejeztük ki. Az egyes állatok által elért pontszámok összegét átlagoltuk. Az antagonisták beadása között 2 hét telt el, amely alatt a kezelést folytattuk.

1. táblázat

Elvonási tünet	Értékelés (pontszám)
vonaglás	3
sikító hang	2
diarrhoea	2
fogcsikorgatás	1
ptosis	1
„wet dog response”	1
Maximálisan elérhető pontszám	10

### 13. Krónikus toxicitás

A vizsgált vegyületek krónikus toxicitását a túlélő állatok számával és a súlygyarapodásra kifejtett hatásukkal jellemeztük. Az orális  $AtD_{100}$ -akat naponta egyszer, gyomorszondán keresztül vittük be.

#### *Alkalmazott vegyületek*

Morfin HCl, kodein HCl, etilmorfin HCl, folkodin bázis, hidrokodon bázis, azidokodein bitartarát, 14-OH-azidokodein bitartarát, 6-OH-6-metilazidokodein bázis, 6,14-OH-6-metilazidokodein bázis, azidoetilmorfin bitartarát, azidofolkodin bázis, 14-OH-N-allil-norazidomorfin bázis, N-ciklopropil-norazidomorfin bázis, oximetebanol bázis, narkotin (Noscapin<sup>R</sup>), Alkaloida, Tiszavasvári. Nalorfin HBr, petidin bázis (Dolargan<sup>R</sup>), Libexin<sup>R</sup> (HK 256), Chinoin. Klofedanol (Baltix<sup>R</sup>), benzonatát (Exangit<sup>R</sup>), E. Gy. T. Metadon bázis (Depridol<sup>R</sup>), fentanil bázis, Richter Gedeon RT. Naloxon HCl, Endo.

A vizsgált vegyületek dózisait bázisra számítva adtuk meg. A bázisokat 5%-os foszforsavban oldottuk és az oldat pH-ját 0,1 N NaOH-val 6—7-re állítottuk be.

#### *Eredmények*

##### *Köhögéscsillapító hatás*

A 2. és a 3. táblázat a vizsgált 3-éter-6-azidomorfinok (azidokodein, 14-OH-azidokodein, azidoetilmorfin, azidofolkodin) köhögéscsillapító hatását hasonlítja össze a megfelelő 3-éter-6-hidroximorfin (kodein, etilmorfin, folkodin) és 3-éter-6-oxomorfin (hidrokodon, oxikodon) származékokkal. Tartalmazzák továbbá referens vegyületekként néhány szintetikus kábító-fájdalomcsillapító (metadon, petidin, fentanil) valamint a nem morfin vázas köhögéscsillapítók (oximetebanol, Noscapin, Baltix, Exangit, Libexin) hatására vonatkozó adatokat. A vegyületek relatív köhögéscsillapító aktivitását kodeinre vonatkoztatva adtuk meg.

A vizsgált vegyületek köhögéscsillapító hatása dózisfüggőnek bizonyult (2. ábra). Macskán a köhögéscsillapító hatás dózisfüggése a vegyületek többségénél a köhögési amplitudó fokozatos csökkenésében jelentkezett (3. ábra). A morfinvázas vegyületek köhögéscsillapító hatása morfin antagonistákkal felfüggeszthetőnek bizonyult. Antagonistaként nalorfint (0,25 mg/kg), naloxon (0,05 mg/kg) és 14-OH-N-allil-norazidomorfint (0,05 mg/kg) használtunk.

Macskán i. v. adagoláskor a 3-éter-6-oxomorfinok hatásosabbnak bizonyultak mint a 3-éter-6-azidomorfinok. Ez utóbbi csoportból az azidokodein és az azidoetilmorfin 4—6-szor hatékonyabb, mint a kodein. A 6-OH-6-metilazidokodein és a 6,14-OH-6-metilazidokodein i. v. köhögéscsillapító hatását az azidokodein hatásánál gyengébbnek találtuk. Az általunk vizsgált nem morfin

2. táblázat

A vizsgált vegyületek köhögéscsillapító hatása. (Macska i. v. adagolás, patkány, s. c. adagolás.)

Vegyület	AtD <sub>100</sub> mg/kg (macska, i. v.)*	Kodeinre vonatkoztatott relatív haté- konyság	AtD <sub>50</sub> mg/kg (patkány, s. c.)**	Kodeinre vonatkoztatott relatív haté- konyság
Kodein	5,07 ± 1,87	1,00	19,0 (15 — 23,9)	1,00
Morfin	0,95 ± 0,23	5,33	3,0 (1,8—4,2)	6,33
Etilmorfin	8,32 ± 1,40	0,61	34,4 (27,3—43,3)	0,55
Folkodin	12,70 ± 1,41	0,40	30,0 (20,0—45,0)	0,63
Hidrokodeon	0,56 ± 0,07	9,05	0,90 (0,6—1,3)	21,11
Oxikodon	0,44 ± 0,07	11,52	1,40 (1,1—1,7)	13,57
Azidokodein	1,08 ± 0,04	4,69	1,57 (1,1—2,4)	12,10
14-OH-azidokodein	1,74 ± 0,07	2,91	0,82 (0,7—0,9)	23,17
Azidoetilmorfin	0,84 ± 0,29	6,03	3,50 (2,3—5,1)	5,42
Azidofolkodin	3,50 ± 0,48	1,45	4,50 (3,0—6,6)	4,22

\* Átlag S. E., N = 5

\*\* Zárójelben a 95%-os megbízhatósági határ

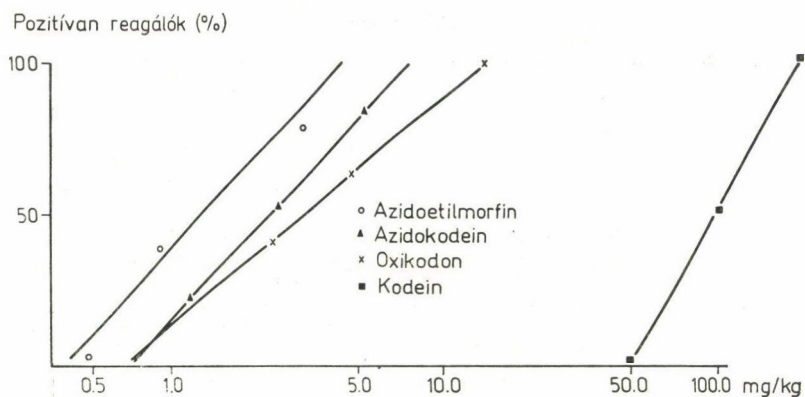
3. táblázat

A vizsgált vegyületek köhögéscsillapító hatása.  
(Patkány, per os adagolás.)

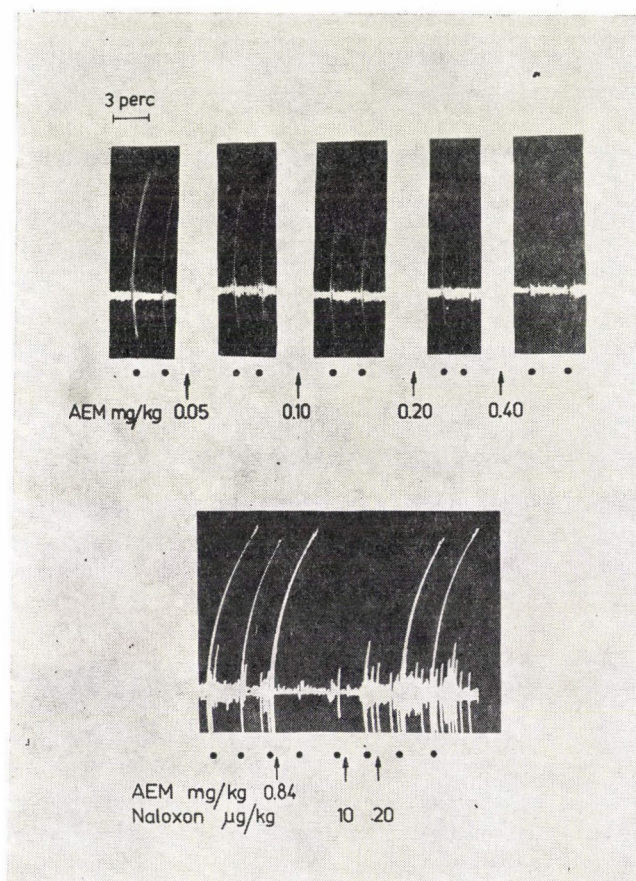
Vegyület	AtD <sub>50</sub> mg/kg (patkány per os)*	Kodeinre vonat- koztatott relatív hatékonyság
Kodein	100 (66,6—150,0)	1,00
Morfin	74 (51,0—107,3)	1,35
Etilmorfin	103,2 (92,1—152,2)	0,97
Hidrokodeon	12,0 (10,5—13,6)	6,25
Oxikodon	3,5 (2,0—5,8)	28,57
Azidokodein	2,5 (1,6—3,7)	40,00
14-OH-azidokodein	3,2 (2,0—5,1)	31,25
6-OH-6-metilazidokodein	8,4 (5,6—12,6)	11,90
6-14-OH-6-metilazidokodein	5,0 (3,7—6,9)	20,00
Azidoetilmorfin	1,67 (1,1—2,4)	59,88
Azidofolkodin	460 (396,6—533,6)	0,22
Oximetebanol	24 (17,8—32,4)	3,33
Libexin	450 (345—487)	0,24
Klofedanol (Baltix)	14,5 (7,6—27,5)	6,90
Benzonatát (Exangit)	220 (166—296)	0,45
Noscapin	300 (171—527)	0,33
Metadon	13,8 (8,8—21,5)	7,24
Fentanil	0,28 (0,1—0,5)	357,14
Petidin	15,8 (10,3—24)	6,32

\*Zárójelben a 95%-os megbízhatósági határ

vázás köhögéscsillapítók 1/5—1/2 kodein aktivitással rendelkeznek i. v. adagolás esetén. A gyakorlati szempontból fontos orális adagolás esetén a 3-éter-6-azidomorfinok csoportja mutatkozott a leghatékonyabbnak; az azidokodein 40-szer, az azidoetilmorfin 60-szor hatékonyabb köhögéscsillapító mint a kodein.



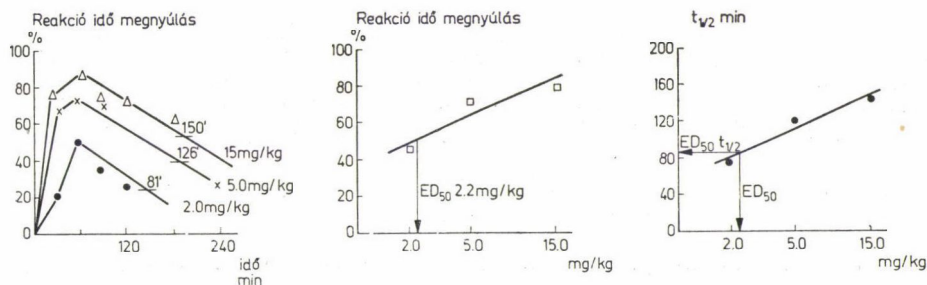
2. ábra: Az azidoetilmorfin és az azidokodein köhögéscsillapító hatása összehasonlítva a referens vegyületekkel. Patkány, orális adagolás, Gösswald módszer



3. ábra: Az azidoetilmorfin köhögéscsillapító hatása altatott macskán, kumulatív és egy injekcióban adagolva. A köhögési válasz kiváltása Domenjóz szerint

Hatékonyáguk messze meghaladja a referensként használt félszintetikus morfin csoport, valamint a nem morfin vázas köhögéscsillapítók aktivitását.

A 4. ábra a köhögéscsillapító hatás kinetikai paramétereinek (maximális hatás kialakulásának ideje,  $AtD_{50}$  t $_{1/2}$ ) számítását mutatja. A kinetikai paramétereiket a 4. táblázatban tüntettük fel. Látható, hogy az azidoetilmorfin



4. ábra: A köhögéscsillapító hatás felezési idejének ( $AtD_{50}$  t $_{1/2}$ ) mérése. Hidrokodon, orális adagolás, patkány, Gösswald módszer

4. táblázat

A köhögéscsillapító- és légzésszámcsökkentő hatás kinetikai paramétere

Vegyületek	Köhögéscsillapító hatás, patkány		Légzésszámcsökkentő hatás macska		
	$AtD_{50}$ per os	Maximális hatás kialakulásának ideje	$AtD_{50}$ t $_{1/2}$	Dózis i. v.	légzésszám csökkentő hatás felezési ideje
	mg/kg	perc	perc	mg/kg	perc (S. E.)
Morfin	—	—	—	0,95	29,8 ± 3,64
Kodein	56,0	30–60	104	5,07	7,8 ± 1,4
Hidrokodon	2,0	30–60	92	0,56	17,4 ± 3,5
Azidokodein	2,1	30–60	93	1,08	21,8 ± 6,9
Azidoetilmorfin	1,1	15–30	80	1,86	nem mérhető

hatása alakul ki leggyorsabban, ami jó orális felszívódását bizonyítja. Az azidoetilmorfin hatásfelezési ideje ugyanakkor alig marad el a referens vegyületekétől.

Fájdalomcsillapító hatás

A vizsgált vegyületek fájdalomcsillapító hatását az 5. táblázat mutatja per os, s. c. és i. v. adagolás mellett patkányon. A 3-éter-6-azidomorfinok jelentős fájdalomcsillapító hatással is rendelkeznek, az azidoetilmorfin 9-szer hatékonyabb fájdalomcsillapítónak bizonyult, mint a kodein per os adagolás esetén. Összehasonlítva azonban a vegyületek fájdalom- és köhögéscsillapító

## 5. táblázat

A 3-éter-6-azidomorfinok fájdalomcsillapító ED<sub>50</sub> értékei és a fájdalom- és köhögéscsillapítás aránya

(Patkány, fájdalomcsillapítás: hot plate teszt, köhögéscsillapítás: Gösswald módszer)

Vegyület	ED <sub>50</sub> (mg/kg)			ED <sub>50</sub> /AtD <sub>50</sub>	
	i. v.	sc	per os	sc	per os
Kodein	6,9 (5,1 – 9,2)	14,0 (6,7 – 29,4)	112,5 (53,5 – 236,3)	0,74	1,13
Azidokodein	0,32 (0,19 – 0,52)	0,36 (0,16 – 0,79)	13,5 (10,5 – 16,3)	0,23	5,40
14-OH-azido- kodein	0,19 (0,11 – 0,32)	1,20 (0,92 – 1,56)	22,0 (19,6 – 24,7)	1,46	6,88
Azidoetilmorfin	0,89 (0,6 – 1,3)	1,10 (0,8 – 1,5)	12,5 (11,1 – 14,1)	0,31	7,50

(Zárójelben a 95%-os megbízhatósági határ.)

hatékonyágát megállapítható, hogy az azidovegyületek köhögéscsillapító hatása kifejezettebb, mint analgetikus hatásuk. Így pl. az azidoetilmorfin fájdalomcsillapító ED<sub>50</sub> dózisének mintegy hetede bizonyult a köhögéscsillapító AtD<sub>50</sub> értéknek, patkányon orális adagolásnál.

## Akut toxicitás

A 6. táblázat tartalmazza a vizsgált azidovegyületek per os, s. c. és i. v. LD<sub>50</sub> értékeit. Feltüntetjük továbbá a referens morfin származékok valamint néhány nem morfin vázas köhögéscsillapító toxicitási adatait. Az azidovegyületek a morfinhoz hasonlóan központi idegrendszeri görcsöket, majd légzésbénulást váltanak ki. Az azido csoport bevitele az izomorfinváz 6-os pozíciójába a toxicitás fokozódását eredményezi, ugyanakkor a terápiás index (LD<sub>50</sub>/AtD<sub>50</sub>) – a toxicitásnál nagyobb mértékben növekvő köhögéscsillapító aktivitás miatt – igen kedvező emelkedést mutat. Az azidoetilmorfin és az azidokodein

## 6. táblázat

Vegyület	LD <sub>50</sub> (mg/kg)			LD <sub>50</sub> /AtD <sub>50</sub>	
	i. v.	s. c.	per os	s. c.	per os
Kodein	75,0 (70,7 – 79,5)	190,0 (143,9 – 250,8)	650 (560 – 754)	10,0	6,5
Azidokodein	52,0 (49,2 – 54,9)	125,0 (100 – 156,2)	130 (93 – 154)	79,62	52,0
14-OH-azido- kodein	24,0 (13,3 – 43,2)	78,0 (46,4 – 131,0)	80 (25,6 – 224)	95,12	25,0
Azidoetil- morfin	14,5 (9,8 – 21,3)	47,0 (32,8 – 67,2)	61 (30,5 – 122)	13,42	36,53
Libexin	—	—	3000	—	—
Klofedanol	—	—	514 (336 – 785)	—	35,44
Benzonatát	—	—	2700 (1985 – 3660)	—	12,27
Etilmorfin	—	—	810 (730 – 899)	—	7,84

(Zárójelben a 95%-os megbízhatósági határ.)



kodeinhez viszonyított relatív hatásszélessége magasabb értéket mutat mint a mai terápiában alkalmazott, nem opiát szerkezetű köhögéscsillapítók (Baltix, Exangit, Libexin) relatív hatásszélessége.

### A légzésre kifejtett hatás

A 7. táblázat mutatja az azidoszármazékok, valamint a referens vegyületek légzésre kifejtett hatását altatott macskán. A vizsgált vegyületek i. v. köhögéscsillapító dózisának ( $AtD_{100}$ ) adagolása kumulatív, egyes vegyületek esetén egy injekcióban is megtörtént. A referens vegyületek közül a kodein és a

7. táblázat

A légzésszám és a légzési perctérfogat változása a vizsgált vegyületek i. v. köhögéscsillapító dózisának kumulatív és egyszeri bevétele után altatott macskán

Vegyület	Dózis mg/kg	Légzésszám $AtD_{100}$		Légzési perctérfogat $AtD_{100}$	
		Légzésszám kontroll		Légzési perctérfogat kontroll	
		kumulatív adás	egy injekció	kumulatív adás	egy injekció
Morfin	0,95	$0,78 \pm 0,07^*$	$0,68 \pm 0,04^*$	$0,62 \pm 0,07^*$	$0,59 \pm 0,04^*$
Kodein	5,07	$0,82 \pm 0,03^*$	$0,91 \pm 0,05$	$0,07 \pm 0,04^*$	$0,77 \pm 0,07^*$
Etilmorfin	8,5	$0,85 \pm 0,02$	—	$0,65 \pm 0,14$	—
Folkodin	13,0	$1,17 \pm 0,07$	—	$1,05 \pm 0,04$	—
Hidrokodeon	0,56	$0,90 \pm 0,05$	$0,76 \pm 0,06^*$	$0,84 \pm 0,05^*$	$0,80 \pm 0,04^*$
Oxikodon	0,44	$0,84 \pm 0,05^*$	—	$0,78 \pm 0,07^*$	—
Azidokodein	1,08	$0,82 \pm 0,09$	$0,63 \pm 0,08^*$	$0,81 \pm 0,14$	$0,60 \pm 0,08^*$
14-OH- azidokodein	1,74	$0,88 \pm 0,05^*$	—	$0,67 \pm 0,07^*$	—
Azidoetilmorfin	0,84	$0,95 \pm 0,10$	$0,92 \pm 0,11$	$0,88 \pm 0,13$	$0,84 \pm 0,07$
Azidofolkodin	3,50	$1,15 \pm 0,13$	—	$1,02 \pm 0,16$	—

(Átlag  $\pm$  S. E., N = 5, \* p < 0,05)

hidrokodeon mindkét adagolási mód mellett szignifikánsan deprimálták a mért légzési paramétereket. Az azidokodein köhögéscsillapító dózisa légzésdepresszívnek bizonyult, ha beadása egy injekcióban történt, nem befolyásolta viszont a mért légzési paramétereket kumulatív adagolás esetén. Az azidoetilmorfin ekvipotens dózisának kumulatív és egy injekciós bevétele a légzésszámot és a légzési perctérfogatot szignifikánsan nem csökkentette.

A 4. táblázatban feltüntettük a különböző morfin származékok légzésdepresszív hatásának felezési idejét az  $AtD_{100}$  dózisok i. v. beadása után. A légzésdepresszív hatás felezési idejének ( $t_{1/2}$ ) meghatározását az 5. ábra mutatja altatott macskán. A légzésszám csökkentő hatás a referens vegyületek közül leggyorsabban a kodein esetén zajlik le, míg ez — a köhögéscsillapítás szempontjából negatív mellékhatásként értékelendő effektus — a morfin és a hidrokodeon esetében a legtartósabb. Az azidoetilmorfin légzésszám csökkentő hatásának felezési ideje az  $AtD_{100}$  dózis alkalmazása esetén nem volt mérhető,

8. táblázat

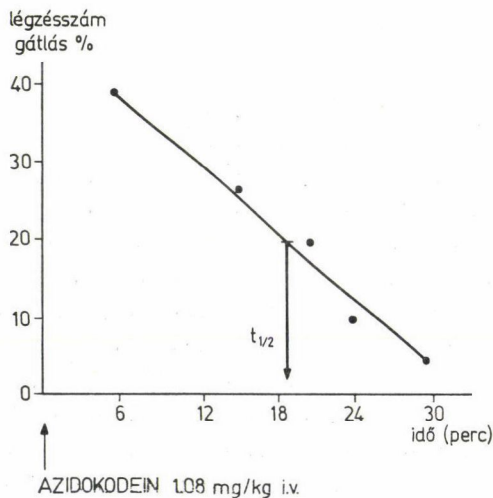
A vizsgált vegyületek i. v. köhögéscsillapító dózisának

Vegyület	Dózis mg/kg	Légzésszám 1/min	aktuális pH	pO <sub>2</sub> Hgmm
Kontroll		27,32 ± 2,33	7,41 ± 0,01	111,6 ± 2,93
Morfin *	0,95	17,07 ± 1,68*	7,30 ± 0,01*	99,5 ± 2,17*
Kontroll		19,6 ± 2,2	7,36 ± 0,03	106,6 ± 3,79
Azidokodein	1,08	10,4 ± 2,09*	7,22 ± 0,02*	76,0 ± 4,34*
CAM**	0,02	19,6 ± 0,68	7,29 ± 0,005	104,0 ± 3,10
Kontroll		22,8 ± 2,71	7,29 ± 0,15	102,6 ± 13,67
Azidoetilmorfin	0,84	22,4 ± 3,84	7,29 ± 0,02	106,6 ± 15,24

Átlag ± S. E., N = 3, \* p < 0,05, \*\* N-ciklopropil-norazidomorfin

mivel ez a vegyületmennyiség kísérleteinkben a légzésszámot nem befolyásolta.

A 8. táblázat mutatja a vegyületek sav-bázis egyensúlyra kifejtett hatását. A morfin és az azidokodein i. v. köhögéscsillapító dózisa a légzésszámot és az artériás vér oxigén tenzióját (pO<sub>2</sub>) szignifikánsan csökkentette. Az aktuális pH csökkenése és az artériás vér széndioxid tenziójának (pCO<sub>2</sub>) emelkedése respiratórikus acidózisra utal. A sav-bázis egyensúly metabolikus komponensei (standard bikarbonát, puffer bázis, bázistöbblet) változást nem mutattak. Morfin-antagonistával, N-ciklopropil-norazidomorfin (CAM), az azidokodein légzésszám csökkentő és respiratorikus acidózist okozó hatása felfüggeszthetőnek bizonyult. Az azidoetilmorfin ekvipotens dózisban a savbázis egyensúly paramétereit nem befolyásolta.



5. ábra: A légzésszámcsökkentő hatás felezési idejének mérése macskán. Az azidokodein köhögéscsillapító dózisa egy injekcióban i. v. adva

hatása a sav-bázis egyensúlyra altatott macskán

pCO <sub>2</sub> Hgmm	Standard bikarbonát mEq/l	Puffer bázis mEq/l	Bázistöbblet mEq/l
37,18 ± 2,26	23,09 ± 0,94	46,31 ± 2,0	-0,5 ± 0,93
51,29 ± 4,37*	22,2 ± 1,02	47,14 ± 1,61	-4,09 ± 0,92*
40,4 ± 1,81	21,9 ± 0,83	45,1 ± 2,56	-2,7 ± 1,2
57,9 ± 2,84*	20,7 ± 1,04	42,4 ± 1,84	-4,5 ± 1,3
39,6 ± 3,26	19,7 ± 0,86	44,7 ± 2,05	-6,3 ± 1,49
36,8 ± 1,69	24,4 ± 4,64	41,8 ± 2,67	-5,6 ± 0,72
38,16 ± 5,51	24,8 ± 6,08	42,06 ± 3,01	-5,1 ± 5,36

A morfin és az azidoetilmorfin különböző i. v. dózisainál mértük az artériás vér pCO<sub>2</sub> értékét altatott macskán. Az alkalmazott dózisok és az artériás vér pCO<sub>2</sub> értékeiből dózis-hatás görbéket vettünk fel, amelyekből meghatároztuk a morfin és az azidoetilmorfin azon dózisait, amelyek a kontroll pCO<sub>2</sub> értéket 50%-kal növelték. 2,05 mg/kg morfin és 8,1 mg/kg azidoetilmorfin i. v. dózisa hozott létre 50%-os pCO<sub>2</sub> növekedést. Ez annyit jelent, hogy az azidoetilmorfin a morfinnál 4-szer nagyobb dózisban fejt ki azonos mértékű légzésdepressziót.

### 9. táblázat

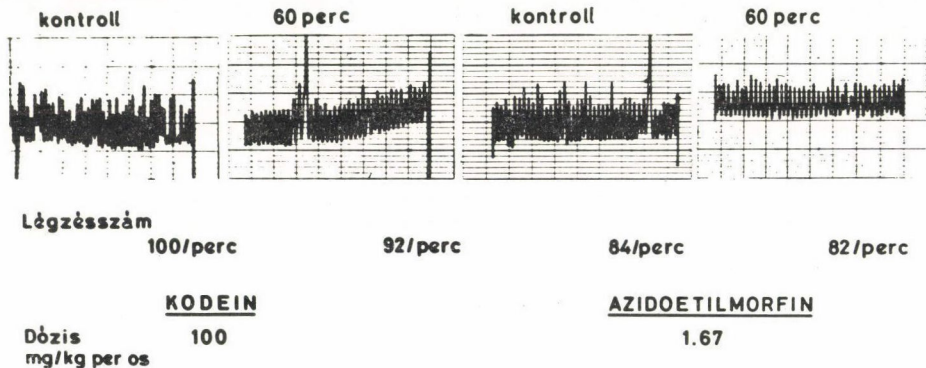
A vizsgált vegyületek hatása éber patkány légzésszámára

Vegyület	Alkalmazott dózis AtD <sub>50</sub> mg/kg per os	Légzésszám AtD <sub>50</sub>	A légzésszámot 25%-kal csökkentő dózis SD <sub>75</sub> mg/kg per os	SD <sub>75</sub> AtD <sub>50</sub>
		légzésszám kontroll		
Morfin	74	0,79 ± 0,03*	120	1,62
Kodein	100	0,85 ± 0,02*	135	1,35
Etilmorfin	103	0,92 ± 0,06	400	3,87
Hidrokodein	16	1,01 ± 0,09	54	3,37
Oxikodon	3,5	0,78 ± 0,07*	4,8	1,37
Azidokodein	2,5	0,95 ± 0,06	14	5,60
14-OH-azidokodein	3,2	0,85 ± 0,02*	6,6	2,06
Azidoetilmorfin	1,6	1,06 ± 0,05	18,5	11,93

Átlag S. E., N = 5, \* p < 0,05

A köhögéscsillapító és a légzésdepresszív hatás arányát tekintve az azidoetilmorfin éber patkányon is kiemelkedően előnyösebbnek bizonyult a többi vizsgált vegyületnél. A 9. táblázat bemutatja, hogy az orális köhögéscsillapító AtD<sub>50</sub> dózis hatására milyen mértékben csökken a légzésszám, másrészt tartalmazza a vegyületek azon dózisait, melyek 25%-os légzésszám csökkenést

okoznak ( $SD_{75}$ ). Látható, hogy az  $AtD_{50}$  dózisok csak a morfin, kodein, oxidon és a 14-OH-azidokodein esetében okoznak szignifikáns csökkenést a légzésszámban. Az azidoetilmorfin köhögéscsillapító dózisban ezen a teszten sem befolyásolta a légzésszámot. Ugyanakkor a légzésszám 25%-os csökkentéséhez a vizsgált vegyületek  $AtD_{50}$  dózisának 1,5—5-szörösére volt szükség, kivéve az azidoetilmorfint, melyből csak az  $AtD_{50}$  dózis 12-szerese váltott ki ilyen

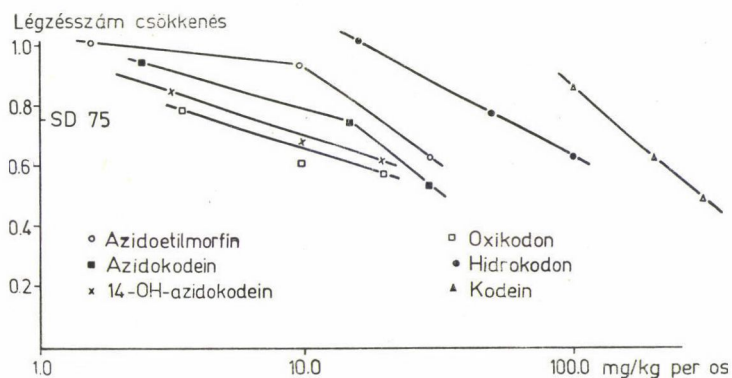


6. ábra: A kodein és az azidoetilmorfin orális köhögéscsillapító dózisának hatása a légzésszámra éber patkányon

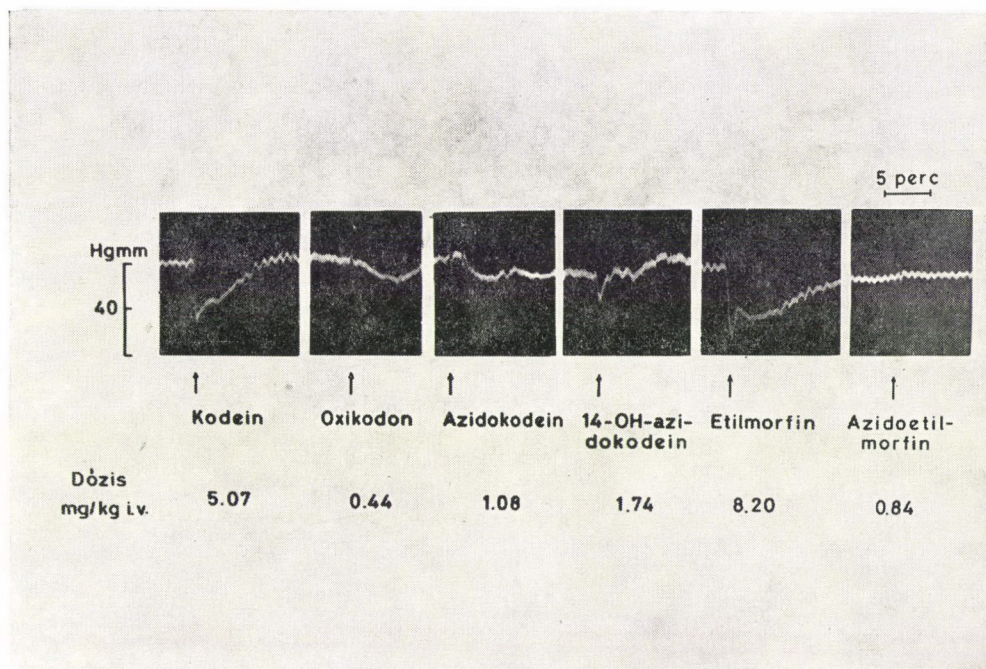
mértékű légzésszám csökkenést. A 6. ábra mutatja a kodein és az azidoetilmorfin orális köhögéscsillapító dózisának hatását a légzésszámra éber patkányon. A 7. ábra mutatja a légzésszámot 25%-kal csökkentő orális dózisok ( $SD_{75}$ ) meghatározását éber patkányon.

#### A vérnyomásra kifejtett hatás

A vizsgált vegyületek altatott macska vérnyomására gyakorolt hatását a 8. ábra mutatja. A referens vegyületek többsége jelentős, de gyorsan múló vérnyomás csökkenést okozott az i. v. köhögéscsillapító ( $AtD_{100}$ ) dózis beadása után. Az azidoetilmorfin köhögéscsillapító dózisa a vérnyomást nem befolyásolta.



7. ábra: A légzésszámot 25%-kal csökkentő dózis (SD<sub>75</sub>) meghatározása éber patkányon



8. ábra: A vizsgált vegyületek köhögéscsillapító dózisának hatása a vérnyomásra altatott macskán

### A bélmotilitásra gyakorolt hatás

A vegyületek bélmotilitást gátló hatását, összehasonlítva a köhögéscsillapító hatással, a 10. táblázat mutatja. Mivel a köhögéscsillapító hatást patkányon, a bélmotilitást gátló hatást pedig egéren határoztuk meg, a két hatékonyságból nem lehet indexet képezni, ezért mindkét esetben a kodeinhez

## 10. táblázat

A vizsgált vegyületek köhögéscsillapító (AtD<sub>50</sub>) és bélmobilitást gátló (ID<sub>50</sub>) dózisainak összehasonlítása

Vegyület	AtD <sub>50</sub> patkány mg/kg s. c.	Kodeinre vonatkoztatott relatív hatékonyság	ID <sub>50</sub> egér mg/kg s. c.	Kodeinre vonatkoztatott relatív hatékonyság
Kodein	19,0 (15,0–23,9)	1,00	17,5 (11,9–23,0)	1,00
Etilmorfin	34,4 (27,3–43,3)	0,55	33,0 (23,0–47,1)	0,53
Oxikodon	1,4 (1,1–1,7)	13,57	1,25 (0,6–2,2)	14,0
Azidokodein	1,5 (1,1–2,4)	12,10	2,8 (1,4–5,6)	6,25
14-OH-azidokodein	0,82 (0,7–0,9)	23,17	2,65 (1,4–4,7)	6,60
Azidoetilmorfin	3,5 (2,3–5,1)	5,42	4,0 (3,2–5,0)	4,40

(Zárójelben a 95%-os megbízhatósági határ.)

viszonyított relatív hatékonyságot jelöltük meg. Látható a 10. táblázatból, hogy az azidovegyületek bélmotilitást gátló hatása — a köhögéscsillapító hatáshoz viszonyítva — relatíve gyenge. Ebből a szempontból különösen nagy a disszociáció a 14-OH-azidokodein esetében, amely 23-szor erősebb köhögéscsillapító, mint a kodein, bélmotilitást gátló hatása pedig mindössze 6,6-szorosan haladja meg a kodein ilyen hatását. Ezen viszonyításban az azidoetilmorfin is szelektívebbnek bizonyult, mint a kodein, etilmorfin vagy az oxikodon.

### Tolerancia és fizikális dependencia vizsgálata

Az esetleges tolerancia kialakulását 24 hetes krónikus kezelés során vizsgáltuk. A vizsgált vegyületek tartós adagolásával létrehozott tolerancia mértékét a 11. táblázat mutatja. A közel féléves kezelés során a vizsgált vegyületek orális köhögéscsillapító dózisaihoz nem alakult ki tolerancia. A vizsgált vegyületek hatáserősségének a kísérlet során megfigyelt változásai pozitív és negatív irányban egyaránt jelentkező szórások, szignifikáns változásnak nem tekinthetők.

A fizikális dependencia mértékének meghatározása a krónikusan kezelt patkányokon a kezelés 18., 20. és 22. hetében 3 morfin antagonistával, nalorfin, naloxon és 14-OH-N-allil-norazidomorfin (ONAM) elvonási tüneteket próbáltunk kiváltani. A 12. táblázat Buckett egységekben kifejezve mutatja, hogy a kodeinnel szemben kifejezett és kísérletesen jól mérhető dependencia alakult ki. Ugyanakkor az azidoetilmorfin tartós adagolása után nalorfinnal semmilyen elvonási tünet nem váltható ki és a naloxonnal, illetve 14-OH-N-allil-norazidomorfinnal precipitálható elvonási tünetek mértéke is elenyésző a kodeinnel kezelt csoportban észlelt precipitációhoz képest.

II. táblázat

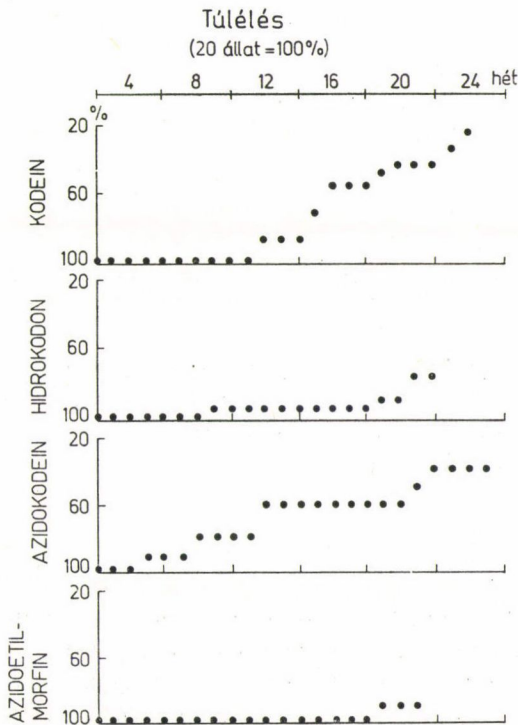
A vizsgált vegyületek tolerancia kapacitása. (Patkány, krónikus kezelés, orális bevitel, adagolt dózis =  $AtD_{100}$ ).

Vegyületek	kontroll	4	8	12	16	20	24. hét
		DR = aktualis $AtD_{50}$ / kontroll $AtD_{50}$					
Kodein	1,0	1,00	0,50	2,06	0,72	0,43	—
Hidrokodeon	1,0	1,27	1,0	1,00	0,91	0,41	1,38
Azidokodein	1,0	1,62	0,42	0,40	1,08	0,86	—
Azidoetilmorfin	1,0	0,74	1,78	1,16	1,30	1,29	—

Krónikus toxicitás

A 24 hetes krónikus kezelés alkalmat adott néhány krónikus toxicitási paraméter követésére is. A kezelés során az állatok túlélési arányát a 9. ábra mutatja.

A túlélés szempontjából az azidoetilmorfinnal kezelt csoport kiugróan jobb, mint a referens vegyületekkel kezelt patkánycsoport. Ezzel összhangban állnak a testsúlygörbe változás adatai is a krónikus kezelés során. Az

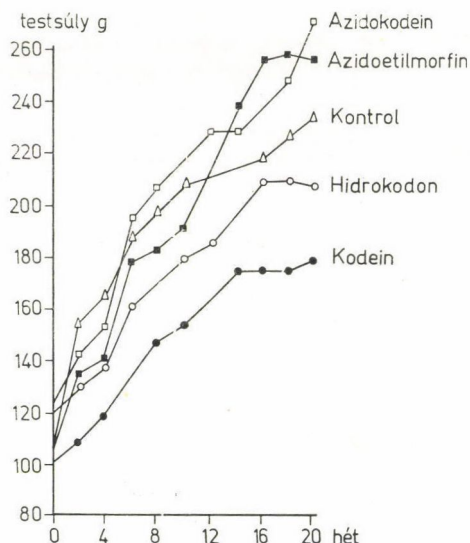


9. ábra: Túlélési arányok a vizsgált vegyületeknél. Patkány, krónikus kezelés, orális adagolás

## 12. táblázat

A vizsgált vegyületek dependencia kapacitása Buckett egységekben kifejezve. (Patkány, krónikus kezelés orális bevitel, adagolt dózis =  $AtD_{100}$ )

Vegyület	Nalorfin 10 mg/kg i. p.	Naloxon 2,5 mg/kg i. p.	14-OH-N-allil-nora- zidomorfin 2,5 mg/kg i. p.
Kodein	4,62	4,50	6,00
Hidrokodein	2,10	—	—
Azidokodein	1,87	2,14	1,40
Azidoetilmorfin	0,00	2,00	1,60



10. ábra: A vizsgált vegyületek hatása a súlygyarapodásra. Patkány, krónikus kezelés, orális adagolás

egyek patkánycsoportok súlygyarapodását a kontroll csoportéhoz viszonyítva a 10. ábra mutatja. A kodeinnel kezelt állatok súlygyarapodása a kontroll csoportéhoz képest elmaradt, míg az azidoetilmorfinnak ilyen károsító hatása kísérleteink során nem mutatkozott.

### Megbeszélés

Az izomorfin C6 pontjára bevitt azido csoport a 3-hidroxi-6-azidomorfin származékokhoz (azidomorfin, 14-OH-azidomorfin) hasonlóan a 3-éter-6-azidomorfin vegyületekben is jelentős hatásfokozódást hoz létre. A hatásfokozódás okaként feltételezzük, hogy az azido csoport nagy energiájú dipol-dipol kötéssel rögzül a receptorhoz, míg a C6 ponton hidroxil csoportot tartal-



mazó vegyületek (morfin, kodein) esetén a kötődés kisebb energiát reprezentáló hidrogén híddal valósulhat meg. A 3, 8 Å hosszú lineáris azido csoport további — CH<sub>2</sub> csoport bevitelével már az aktivitás csökkenését eredményezi (6-hidroxí-6-metilazidokodein, 6,14-dihidroxí-6-metilazidokodein). Az opiátok hatás-szerkezet összefüggéseiből ismert, hogy a C3 ponton levő fenolos hidroxil csoport éterifikálása az aktivitás csökkenéséhez vezet. Hasonló következtetést vonhatunk le a 6-azidomorfinok esetén is.

Macsán i. v. adagolásnál a kodeinre vonatkoztatott relatív köhögéscsillapító hatékonyság sorrendje; kodein: azidomorfin: 14-OH-azidomorfin: azidoetilmorfin: azidokodein: 14-OH-azidokodein; 1,0 : 281,6 : 253,5 : 6,04 : 4,6 : 2,91. Patkányon, orális adagolásnál ugyanebben a sorrendben a viszony; 1,0 : 11,1 : 10,0 : 59,8 : 40,0 : 31,25. Orális adagolásnál a hatékonysági sorrend megfordulása arra utal, hogy a 6-azidomorfin C3 pontjára metoxi illetve etoxi csoport bevitele a vegyületek felszívódását és szöveti penetrációját fokozza. Korábbi adataink is arra utalnak, hogy a C3 pozícióban történő éter képzés a lipoid oldékonyság növekedéséhez vezet (Knoll és mt. 1975/b). Petroleuméterben mért, morfinhoz viszonyított relatív oldékonysági sor; morfin 1,0 : azido-morfin 1,16; azidokodein 205 : azidoetilmorfin 618. Az azidoetilmorfin kiugróan gyors felszívódást mutat a gyomor—bél csatornából, penetrációja a véragy gáton keresztül a leggyorsabb a vizsgált vegyületek között (Knoll és mt. 1975/b). Ezzel összhangban a köhögéscsillapítás kinetikai vizsgálata szerint az azidoetilmorfin hatása alakul ki leggyorsabban orális bevitel során. Ugyanakkor az azidoetilmorfin köhögéscsillapító hatásának felezési ideje nem tér el lényegesen a referens vegyületekétől.

I. v. adás mellett az azidoetilmorfin és az azidokodein a morfinnal azonos hatáserősségű köhögéscsillapítónak bizonyult (i. v. AtD<sub>100</sub> morfin/ i. v. AtD<sub>100</sub> azidoetilmorfin = 1,13). Mivel a köhögéscsillapítók alkalmazásában elsősorban az orális adagolás jön szóba, rendkívül fontosnak tartjuk, hogy az azidoetilmorfin 60-szor, az azidokodein 40-szer hatásosabb a kodeinnél ezen adagolás mellett. Az azidoetilmorfin aktivitása meghaladja a 3-éter-6-oxomorfinok (hidrokodon, oxikodon) hatékonyságát, de meghaladja a szintetikus kábító fájdalomcsillapítók (metadon, petidin) orális köhögéscsillapító hatékonyságát is. Csupán a fentanil hatásosabb köhögéscsillapító, mint az azidoetilmorfin (orális AtD<sub>50</sub> azidoetilmorfin/ orális AtD<sub>50</sub> fentanil = 5,96), de mivel kábító-szernek minősül, ilyen felhasználása nem jön szóba. Kobayashi (1970) által kifejlesztett tebain származék, az oximetebanol i. v. adásnál mutat erős köhögéscsillapító aktivitást, előnytelen felszívódása miatt orális adagolásnál hatékonysága elmarad az azidoetilmorfinnal szemben. Az irodalmi adatok áttekintése alapján mondhatjuk, hogy az azidoetilmorfin a ma ismert leghatásosabb orális köhögéscsillapító. Az azidoetilmorfin és az azidokodein jelentős fájdalomcsillapító hatással is rendelkeznek. Orális bevitel esetén hatékonyságuk meghaladja a morfin fájdalomcsillapító hatását (ED<sub>50</sub> morfin/ ED<sub>50</sub> azidoetilmorfin =

6,72) patkányon, hot plate teszten mérve. Valamely vegyület köhögéscsillapító szelektivitását mutatja a fájdalomcsillapító  $ED_{50}$  /köhögéscsillapító  $AtD_{50}$  hányados. Orális bevételnél ez a viszonyszám az azidoetilmorfin esetén 7,5, azidokodein esetén 5,4.

Az azido csoport bevitele az izomorfin vázba a toxicitás fokozódását eredményezi. A 3-éter-6-azidomorfinok esetén azonban a köhögés és fájdalomcsillapító aktivitás nagyobb mértékben emelkedik, mint a toxicitás és így a vegyületek terápiás indexe növekszik. A kodeinre vonatkoztatott relatív terápiás index az azidokodein esetén 8, az azidoetilmorfin esetén 5,6 orális adagolásnál. Az azidoetilmorfin és az azidokodein terápiás indexe magasabb, mint a ma alkalmazott nem morfin vázas köhögéscsillapítóké.

Az azidoetilmorfin légzésre kifejtett hatása előnyösnek bizonyult. Az i. v. köhögéscsillapító dózis kumulatív és egy injekciós bevitele nem befolyásolta a légzésszámot és a légzési perctérfogatot altatott macskán. Patkányon az orális köhögéscsillapító dózis a légzésszámra ugyancsak hatástalannak bizonyult. Az azidoetilmorfin orális köhögéscsillapító dózisének 12-szerese okozott 25%-os légzésszám csökkenést, ellentétben a kodeinnel, amely 1,35-szörös és az oxikodonnal, amely 1,37-szeres köhögéscsillapító dózisban már 25%-os légzésdepressziót hozott létre. A morfin, kodein és a hidrokodon i. v. köhögéscsillapító dózisének kumulatív és egy injekciós bevitele egyaránt légzésdepresszívnek bizonyult macskán. A 14-OH-azidokodein köhögéscsillapító dózisban patkányon és macskán egyaránt légzésdeprimáló. Az azidokodein i. v. köhögéscsillapító dózisa egy injekcióban adva légzésdepresszívnek bizonyult, kumulatív adása esetén a légzési paramétereket nem befolyásolta. Ezzel megegyező megfigyelést tettünk az azidomorfin és a 14-OH-azidomorfin esetén is. A kumulatív és az egyszeri beadás hatása közötti különbség magyarázatára feltételezzük, hogy az opiátok légzésre kifejtett akut tolerancia kapacitása eltérő, legkifejezettebb a vizsgált vegyületek közül az azidomorfin, 14-OH-azidomorfin és az azidokodein esetén.

A morfin, hidrokodon és az azidokodein légzésdepresszív hatása jól mérhető felezési idővel zajlik le. Az ekvipotens azidoetilmorfin dózis légzésdepresszív felezési ideje nem mérhető, ami a köhögéscsillapító hatás szempontjából pozitívan értékelhető.

A morfin és az azidokodein i. v.  $AtD_{100}$  dózisének egy injekciós bevitele a légzésszám csökkenésével egyidejűleg hipoxiát (artériás  $pO_2$  csökkenés) és hiperkapniát (artériás  $pCO_2$  emelkedés) eredményez. Az aktuális pH csökkenés és a  $pCO_2$  emelkedés respiratorikus acidózisra utal, mivel a sav—bázis egyensúly metabolikus oldalát jellemző paraméterek (standard bikarbonát, puffer bázis) változatlanok maradtak. A morfin esetén a bázistöbblet szignifikáns csökkenését a plazmából az intersticium felé történő  $HCO_3^-$  vándorlással magyarázzuk. Az azidoetilmorfin ekvipotens dózisa a légzésszámot, az artériás  $pO_2$  és  $pCO_2$  értékeket, valamint a sav—bázis egyensúly többi paraméterét nem befolyásolta.

Az azidoetilmorfin i. v. köhögéscsillapító dózisa az artériás vérnyomást nem befolyásolta, a kodein, etilmorfin, oxikodon, azidokodein és a 14-OH-azidokodein ekvipotens dózisa átmeneti vérnyomás csökkenést hozott létre altatott macskán.

Korábban kimutattuk, hogy a 3-hidroxi-6-azidomorfinok (azidomorfin, 14-OH-azidomorfin) a bélmotilitást gátló hatása relatíve gyenge (Knoll és mt. 1974/b). Vizsgálatainkban hasonló következtetésre jutottunk a 3-éter-6-azidomorfinok esetén is. Patkányon, s. c. adagolásnál a kodeinre vonatkoztatott relatív köhögéscsillapító hatékonyság sorrendje; kodein : azidoetilmorfin : azidokodein : 14-OH-azidokodein; 1,0 : 5,42 : 12,10 : 23,17. Egéren, bélpaszszás teszten ugyanebben a sorrendben a viszony; 1,0 : 4,37 : 6,25 : 6,60, tehát az új félszintetikus izomorfin alkaloidok a bélmotilitást enyhén befolyásolják. Az etilmorfin és az oxikodon bélmotilitást gátló hatása a kodeinnel azonos mértékű.

Kimutattuk, hogy az azidomorfin és a 14-OH-azidomorfin analgetikus hatása és dependencia kapacitása között igen kifejezett disszociáció áll fenn. Hasonló disszociációt találtunk az azidoetilmorfin köhögéscsillapító aktivitása és dependencia kapacitása között is. Tartós kezelés során a kodeinnel ellentétben az azidoetilmorfinhoz nem alakult ki számottevő dependencia. A krónikus kezelés 20. hetében nalorfinnal kiváltott precipitáció a kodeinnel kezelt csoportban jelentős intenzitású elvonási tüneteket váltott ki (4,6 Buckett egység), míg az azidoetilmorfinnal kezelt állatokon az elvonási tünetek semmiféle jele nem mutatkozott. Az azidoetilmorfinnal kezelt állatokon naloxonnal illetve 14-OH-N-allil-norazidomorfinnal precipitálva is csak minimális mértékét észleltük a fizikális dependenciának. Az azidoetilmorfin és az azidokodein köhögéscsillapító hatásához tolerancia nem alakult ki a krónikus kezelés során.

A közel fél éves krónikus kezelés során az azidoetilmorfinnal kezelt állatok testsúly gyarapodása normális maradt, miközben a kodeinnel kezelt állatok testsúly görbéje jelentősen elmaradt a kontrollhoz képest. A kezelés 20. hetében az azidoetilmorfinnal krónikusan kezelt állatok mindegyike élt, amikor a kodein csoportban a túlélés 40%-os volt, a kezelés végén pedig az azidoetilmorfinos csoport 90%-a, a kodeinnel kezelt csoport tagjainak pedig 20%-a volt életben.

### Összefoglalás

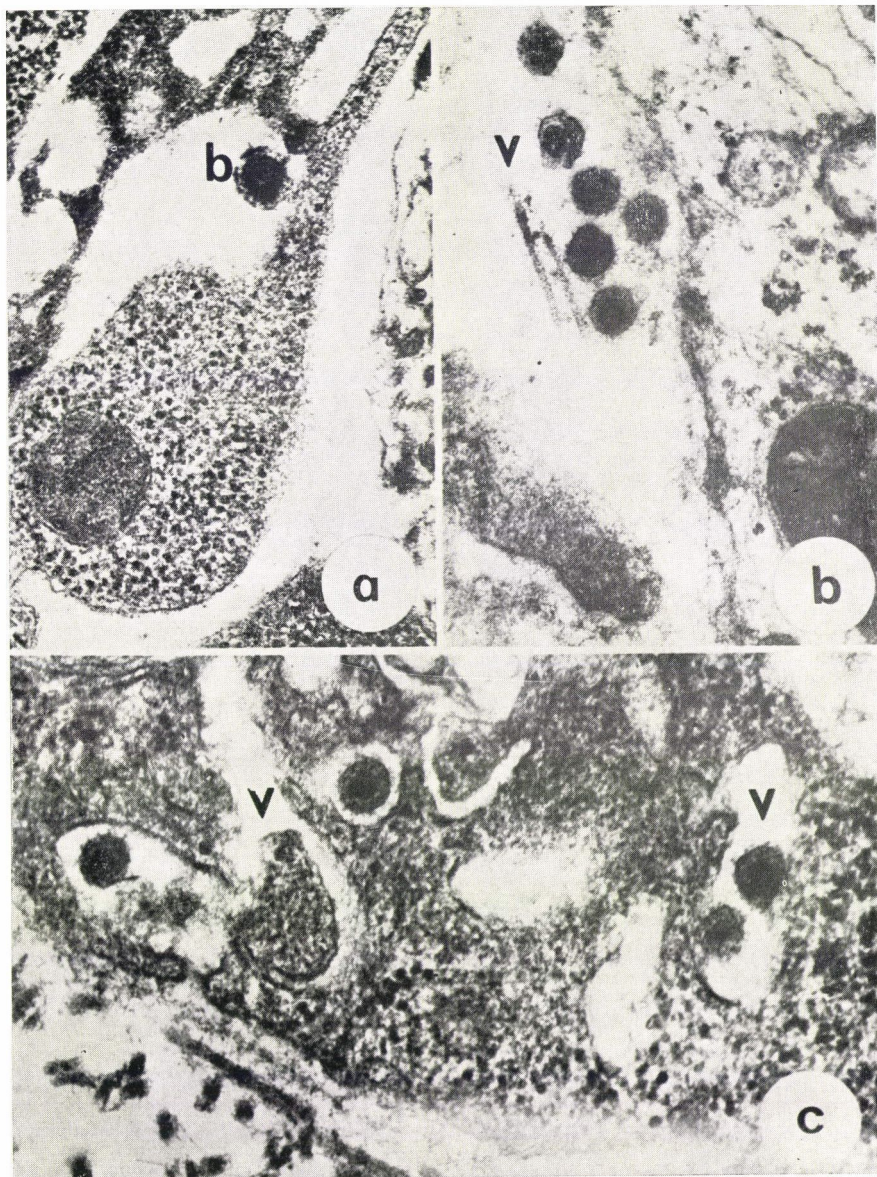
Kísérleteinkben vizsgáltuk a 3-éter-6-azidomorfinok (azidoetilmorfin, azidokodein, 14-OH-azidokodein) farmakológiai hatásait. A vegyületekből az azidoetilmorfin tűnt ki előnyös tulajdonságaival. Megállapítottuk, hogy

1. Az azidoetilmorfin i. v. adásnál a kodeinnél 6,03-szor, orális adagolásnál 60-szor hatékonyabb köhögéscsillapító.
2. Az azidoetilmorfin jelentős fájdalomcsillapító hatással is rendelkezik, i. v.

- adásnál a morfinnál 4,83-szor, orális adásnál 6,72-szer hatékonyabb fájdalomcsillapító.
3. Az azidoetilmorfin terápiás indexe orális adagolásnál a kodeinnél 5,6-szor nagyobb.
  4. Az azidoetilmorfin köhögéscsillapító dózisban nem befolyásolta a légzésszámot macskán és patkányon, a sav—bázis egyensúlyban eltérést nem hozott létre. Köhögéscsillapító dózisban nem befolyásolta az artériás vérnyomást.
  5. Az azidoetilmorfin obstipáló hatása a kodeinnél gyengébb.
  6. Az azidoetilmorfin köhögéscsillapító dózisának tartós adagolásakor tolerancia nem alakult ki, dependencia kapacitása szokatlanul alacsony.
  7. Krónikus adagolásnál a testsúlygyarapodást nem gátolja és az állatok elhullása igen alacsony volt.

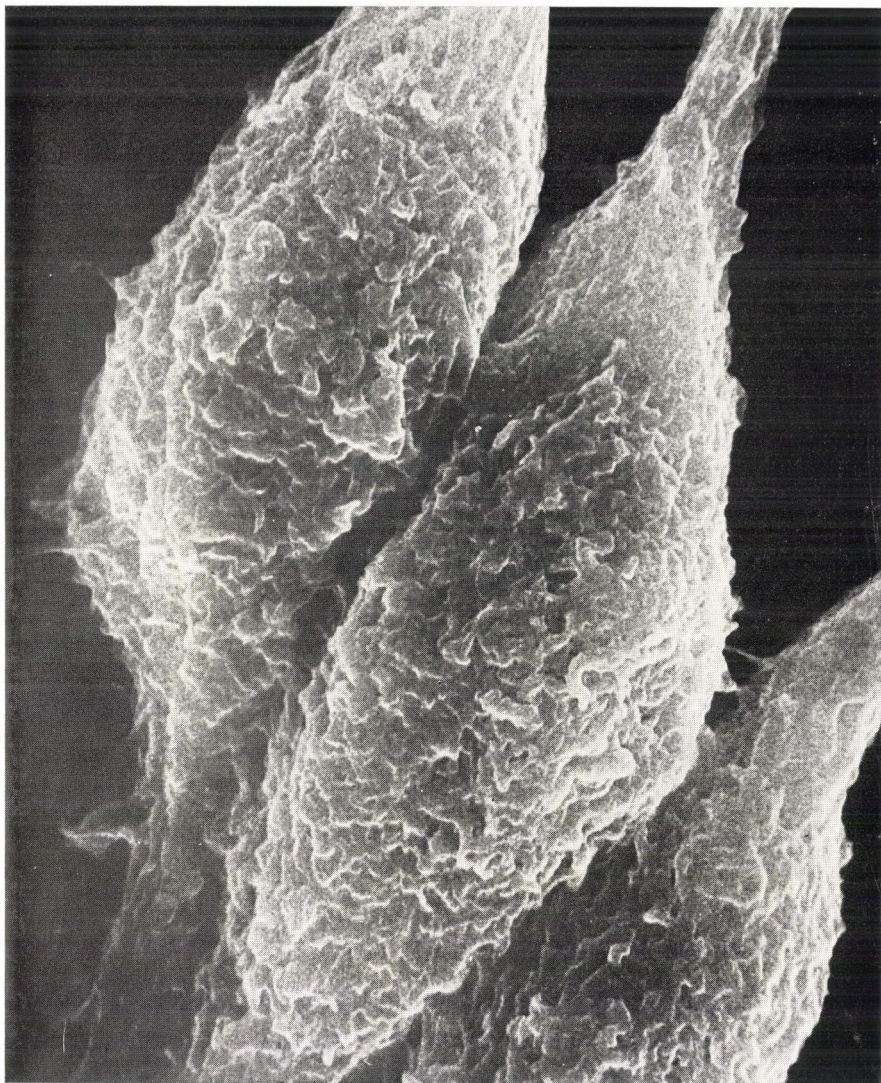
## IRODALOM

- Bognár, R. és Makleit, S.: Acta Chim. Acad. Sci. Hung. **58**, 203, (1968).  
 Buckett, W. R.: Psychopharmacologia **6**, 410, (1964).  
 Domenjoz, R.: Arch. Exp. Path. Pharmacol. **215**, 19, (1952).  
 Friedmann, T., Hársing, L. G., Jr és Knoll, J.: Second Congress of Hungarian Pharmacological Society. Symposium on analgesia 67 p. Akadémiai Kiadó (1976).  
 Gösswald, R.: Arzneim.-Forsch. **8**, 550, (1958).  
 Knoll, J.: Pharmac. Res. Commun. **5**, 175, (1973).  
 Knoll, J.: Second Congress of Hungarian Pharmacological Society. Symposium on analgesia 3 p. Akadémiai Kiadó (1976).  
 Knoll, J., Fürst, Zsuzsanna és Kelemen, K.: Orvostudomány **22**, 266, (1971).  
 Knoll, J., Fürst, Zsuzsanna és Kelemen, K.: J. Pharm. Pharmacol. **25**, 929, (1973a).  
 Knoll, J., Fürst, Zsuzsanna és Vízi, E. S.: Pharmacology **10**, 354, (1973b).  
 Knoll, J., Makleit, S., Friedmann, T., Hársing, L. G. és Hadházy, P.: Arch. Inter. Pharmacodyn. **210**, 241, (1974).  
 Knoll, J., Zséli, J., Rónai, A. és Vízi, E. S.: Pharmacology **12**, 283, (1974).  
 Knoll, J., Fürst, Zsuzsanna és Makleit, S.: J. Pharm. Pharmacol. **27**, 99, (1975).  
 Knoll, J., Magyar, K., Makleit, S., Zólyomi, G., és Zsilla, Gabriella: Orvostudomány, **26**, 111, (1975b).  
 Knoll, J., Fürst, Zsuzsanna és Makleit, S.: Orvostudomány **26**, 103, (1975c).  
 Knoll, J., Makleit, S., Friedmann, T. és Hársing, L. G., Jr: Orvostudomány **26**, 89, (1975d).  
 Knoll, J., Zséli, J., Rónai, A. és Vízi, E. S.: Orvostudomány **26**, 97, (1975).  
 Kobayashi, S., Hasegawa, K., Mori, M. és Takagi, H.: Arzneim.-Forsch. **20**, 43 (1970).  
 Litchfield, J. T. és Wilcoxon, F. J.: J. Pharmacol. Exp. Ther. **96**, 89, (1949).  
 Macht, D. L. és Barba-Gose, J.: J. Amer. Pharm. Ass. Sci. **20**, 558, (1931).  
 Pórszász, J. és Herr, F.: Kísérletes orvostudomány **2**, 295, (1950).  
 Rétsági, G. és Schwarzmán, Éva: Orvostudomány. **24**. 360, (1973).  
 Rétsági, G. és Schwarzmán, Éva: Second Congress of Hungarian Pharmacological Society. Symposium on analgesia 31 p. Akadémiai Kiadó (1976).  
 Rétsági, G., Schwarzmán, Éva, Bodrogi, J. és Eckhard, S.: Orvostudomány **25**, 83, (1974).

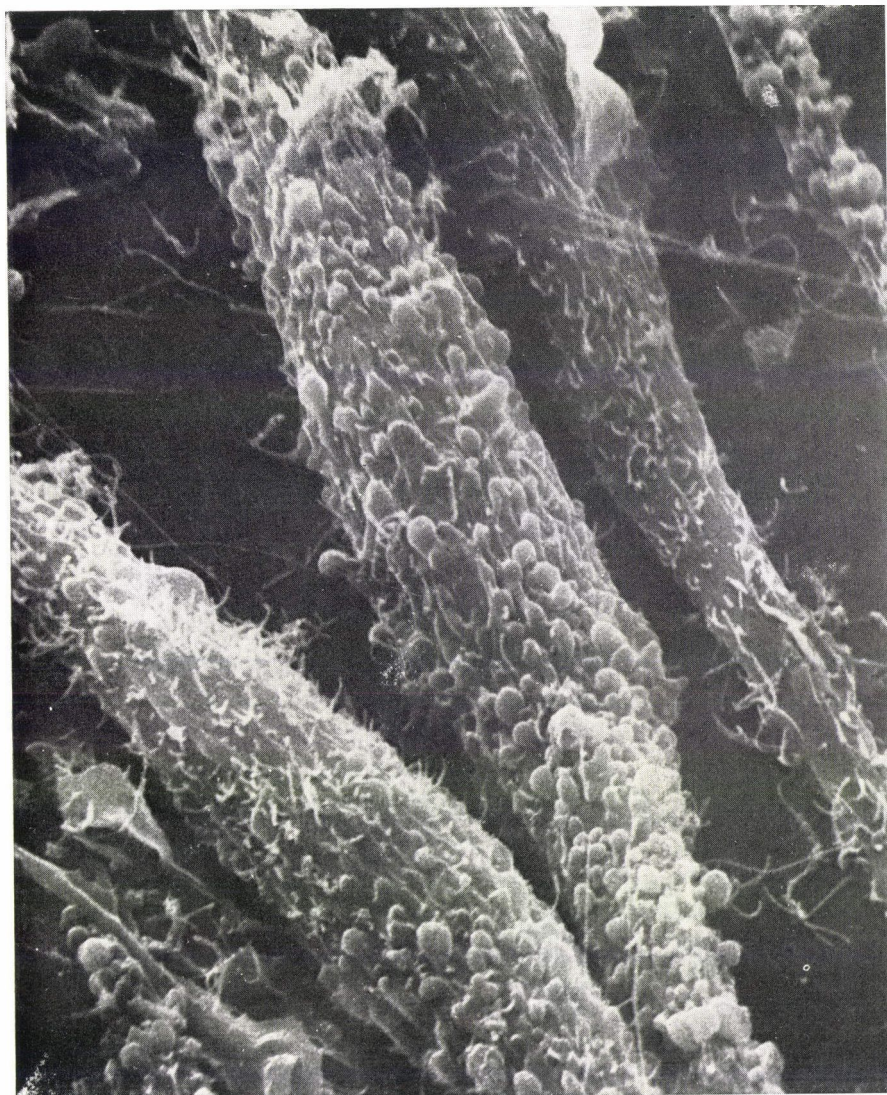


I. ábra. C-typusú vírusparticulumok MC-29 vírussal fertőzött CEC-kultúrában, transmissziós elektronmikroszkóppal:

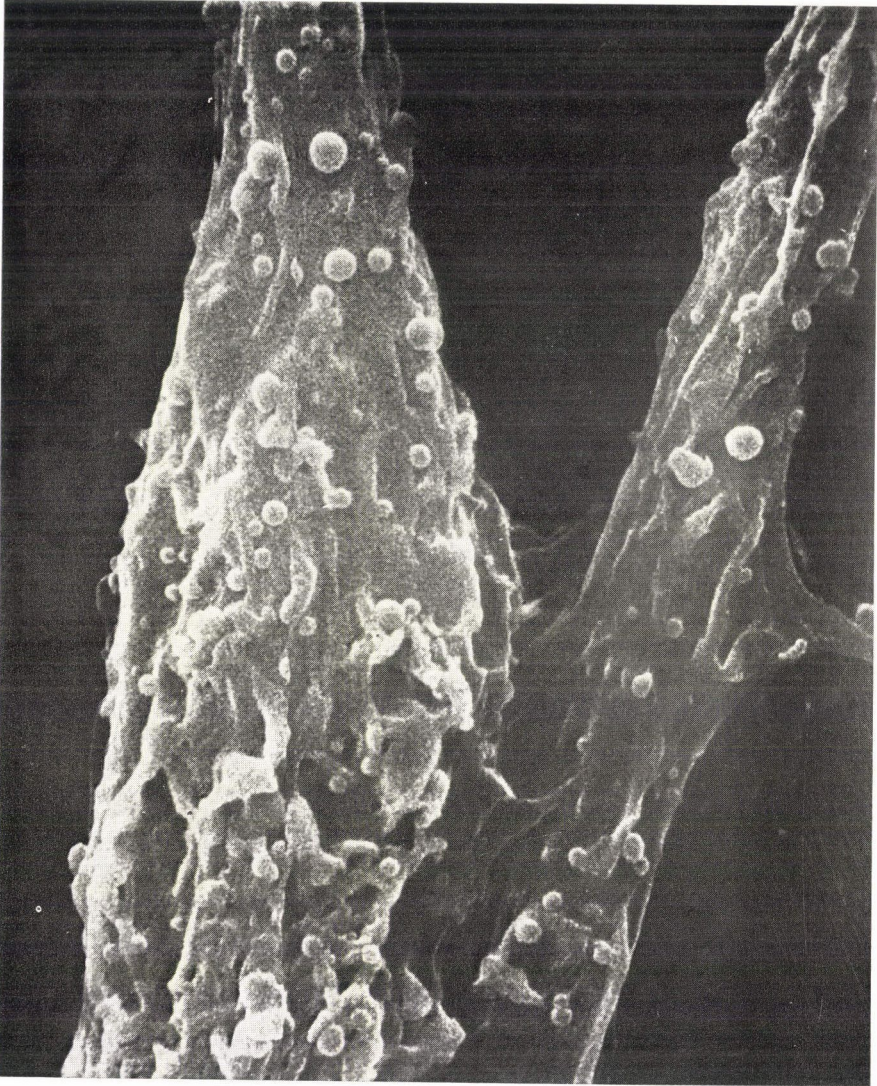
a) a budding jelenségét mutató vírusparticulum a sejt felszínén, b) vírustestek az intercellularis térben, c) a vírustestek intracytoplasmaticus vacuolumokban helyezkednek el. (Végnagyítás: 83.700 ×)



2. ábra. 72 órás confluáló monolayer kontroll CEC tenyészet scanning elektronmikroszkópos képe. A sejtfelszínen szabálytalan alakú és elrendeződésű, közepes mértékben kiemelkedő, általában éles szélű microbolyhok látszanak. (Végnagyítás: 18.000×)



3. ábra. MC-29 vírussal fertőzött 72 órás confluáló monolayer CEC-kultúra scanning elektronmikroszkópos képe 2 nappal a fertőzés után. A sejtek felszínéből számtalan, félgömb illetve gömb alakú képlet emelkedik ki. A microbolyhok száma megkevesbedett és a meglévő éles szélű bolyhok a szokottnál alacsonyabbak. (Végnagyítás: 10.800×).

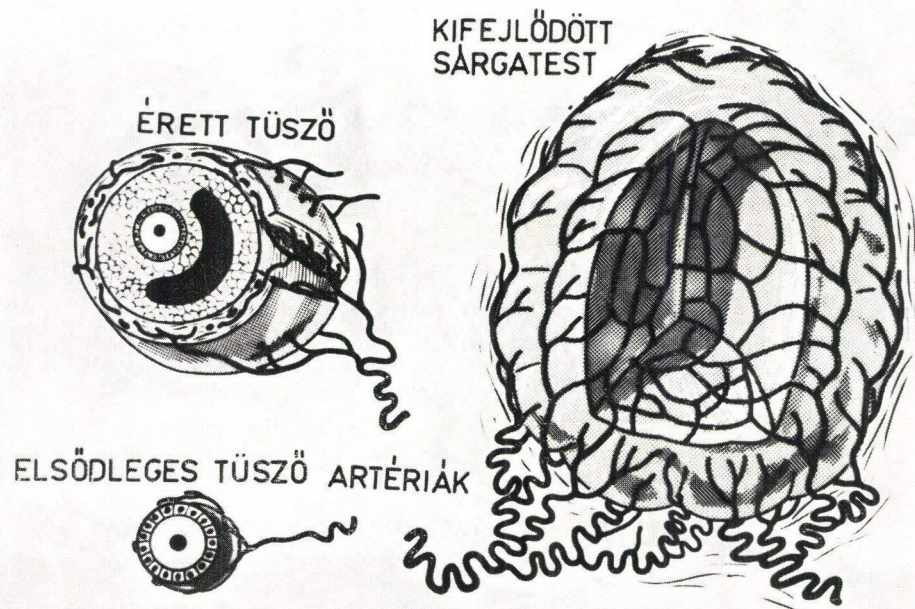


4. ábra. MC-29 vírussal fertőzött CEC-kultúra két sejtjének részlete scanning elektronmikroszkóp alatt. A megkevesbedett és lelapult microbolyhok között számtalan félgömb illetve gömb alakú „rügy” látszik. (Végnagyítás: 23 400×).

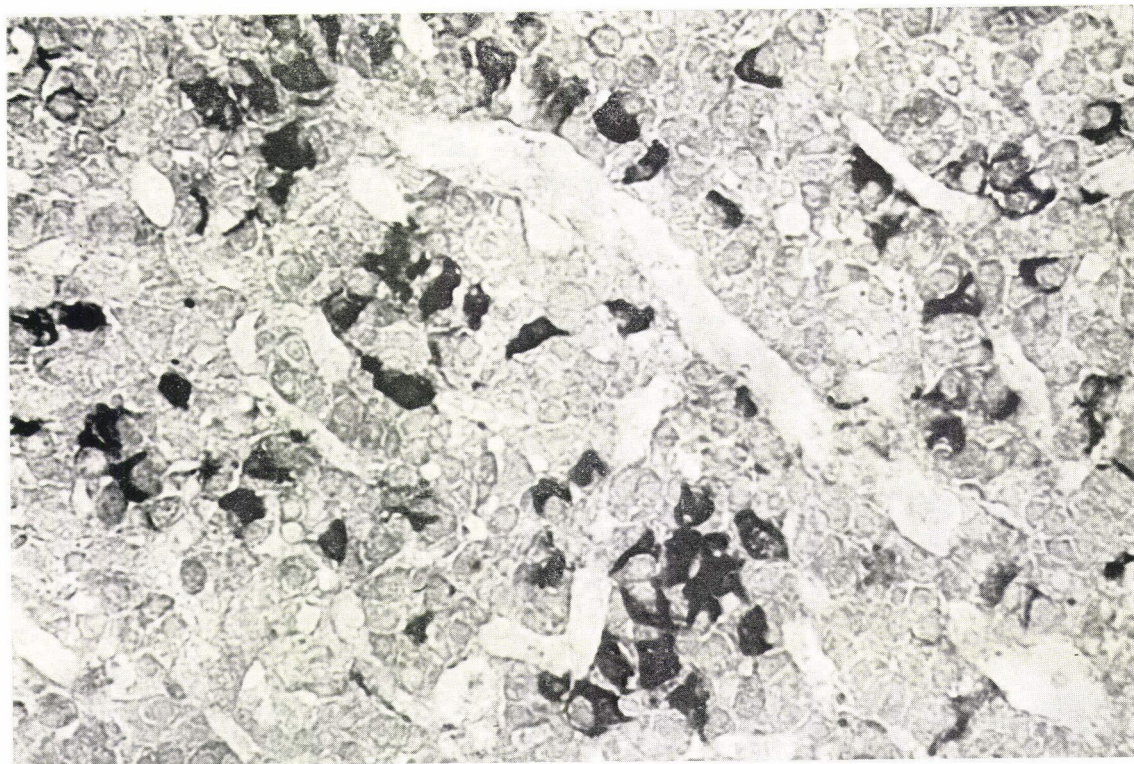




5. ábra: A petefészek érrendszerének kutyában. (a) A petefészek makroszkópos érrendszerének. Világos színűek az artériák, sötétek a vénák. A nyilak a - v. anasztomózisra mutatnak (Korróziós készítmény). (b) A petefészek kéreg részlete primer tüszővel. 13x. (c) A fejlődő tüszőt körül fogják a kapillárisok, 40x. (d) A sárgatestet körül fogó érnyak és a sárgatest állományába behatoló kapillárisok, 13x. (e) Az artériák oszlása a sárgatestben, 40x. (f) A sárgatest összekapcsolt kapilláris hálózatának részlete, 40x. (b - f = tus-gelatin feltöltés.)



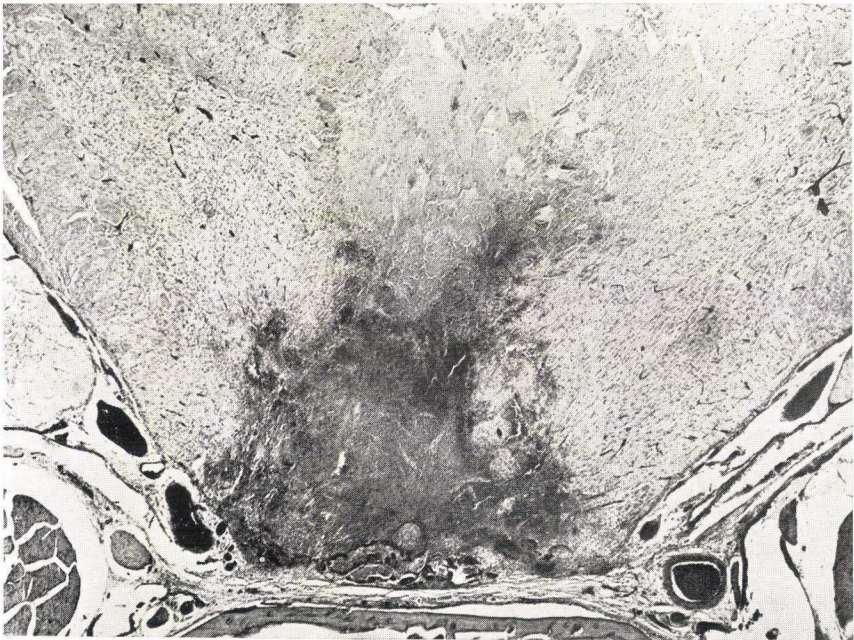
6. ábra: A tüsző és sárgatest artériás érhálózatának kialakulása. Sémás ábrázolás



*I. sz. kép* ACTH antiszérummal végzett immunhisztokémiai reakció patkány adenohypophysisben. Nagyítás: 1075 ×



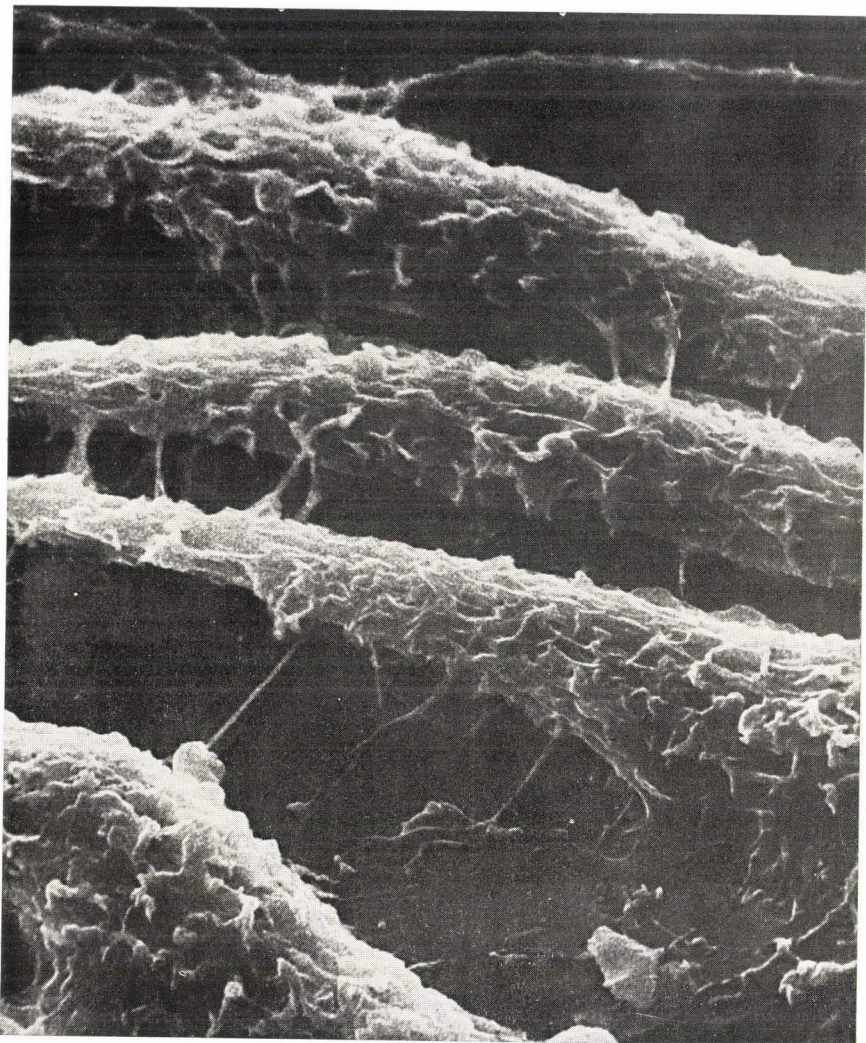
2. sz. kép Deafferentált medialis bazalis hypothalamus szagittális metszet Fast Blue-krezilbolya festés. 16 ×



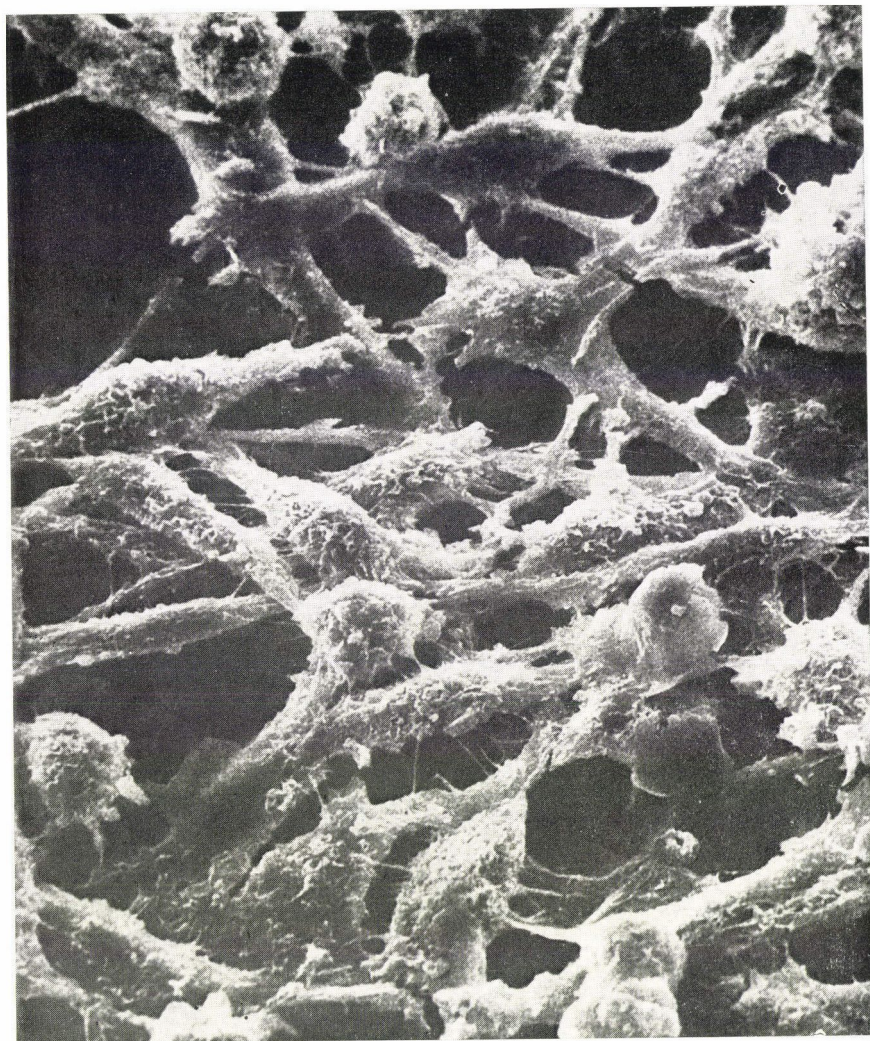
3. sz. kép A medialis hypothalamus eltávolítása utáni vérömleny tus injekció után. Frontális metszet Haematoxinilín-eosin festés. 20 ×



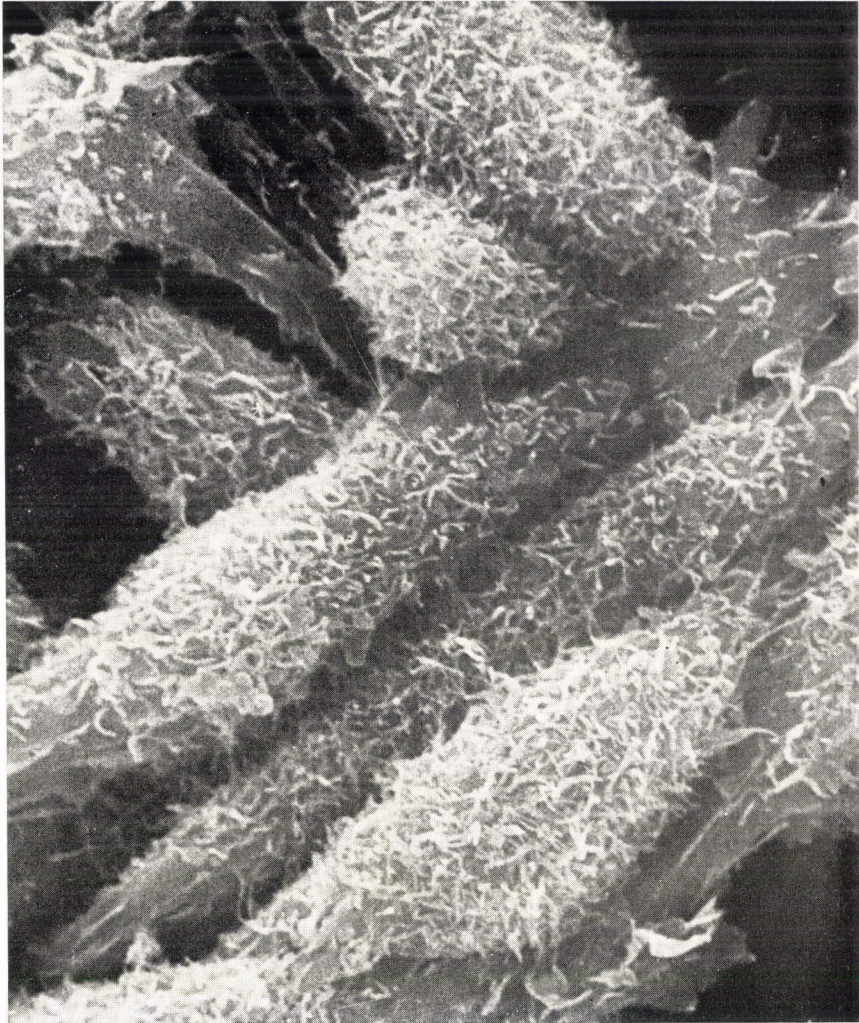
1. Kezeletlen egér fibroblast sejtek (K-kultúra), 17. passzázs, 3000-szeres nagyítás. A sejtek viszonylag párhuzamos elhelyezkedésűek.



2. Kezeletlen egér fibroblast sejtek (K-kultúra), 17. passzázs, 9000-szeres nagyítás. A sejt nyúlványok viszonylag párhuzamosak, rendezettek, számuk kevés.

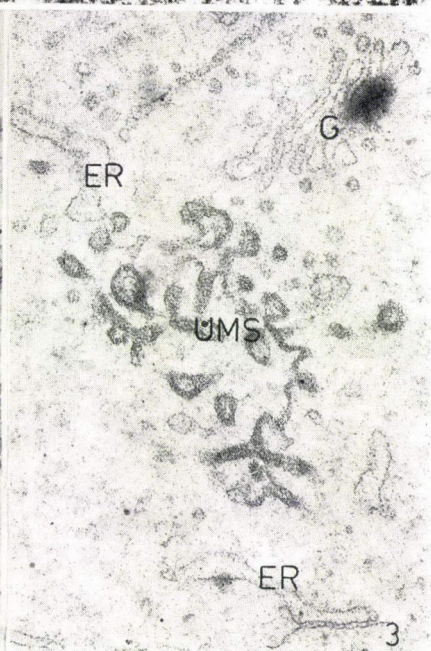
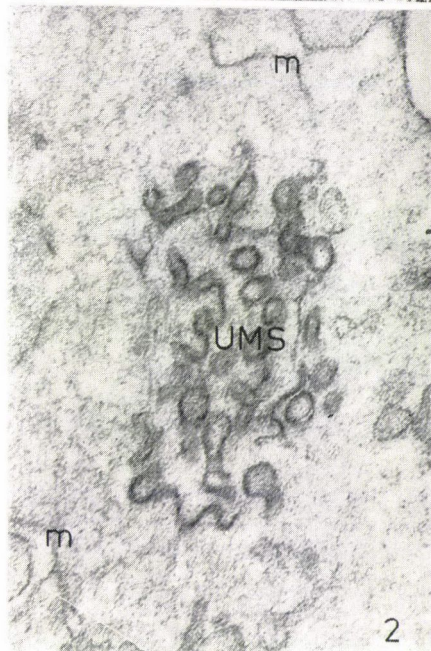
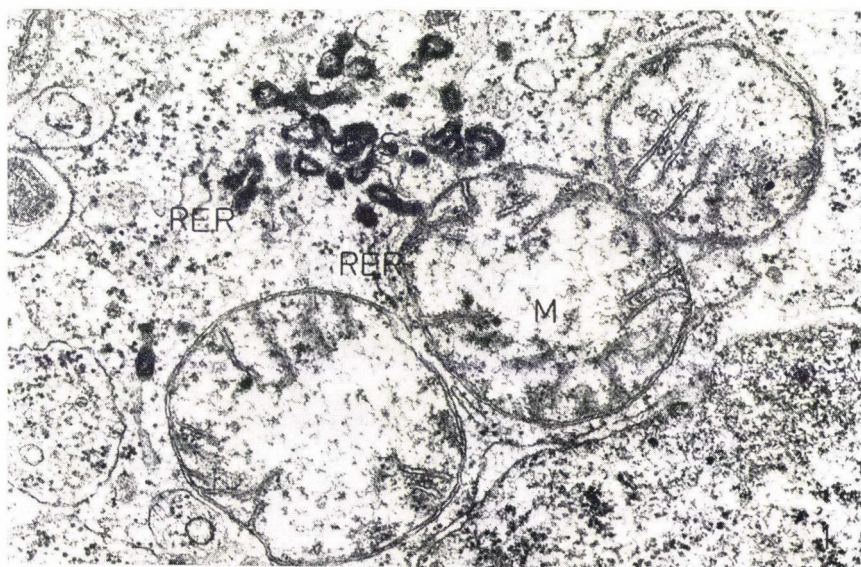


3. Methylcholanthrénnel kezelt egér fibroblast sejtek (MC-kultúra), 7. passzázs, 3000-szeres nagyítás. A sejtek többrétegű növekedést mutatnak.



6. Methylcholanthrénnel *in vitro* kezelt sejtekből *in vivo* kifejlődött tumorok sejtjei ismét szövettényészeti körülmények között (MCR-kultúra), 2. passzázs, 9000-szeres nagyítás. A sejt-nyúlványok aprók, sűrű és kusza elhelyezkedésűek.

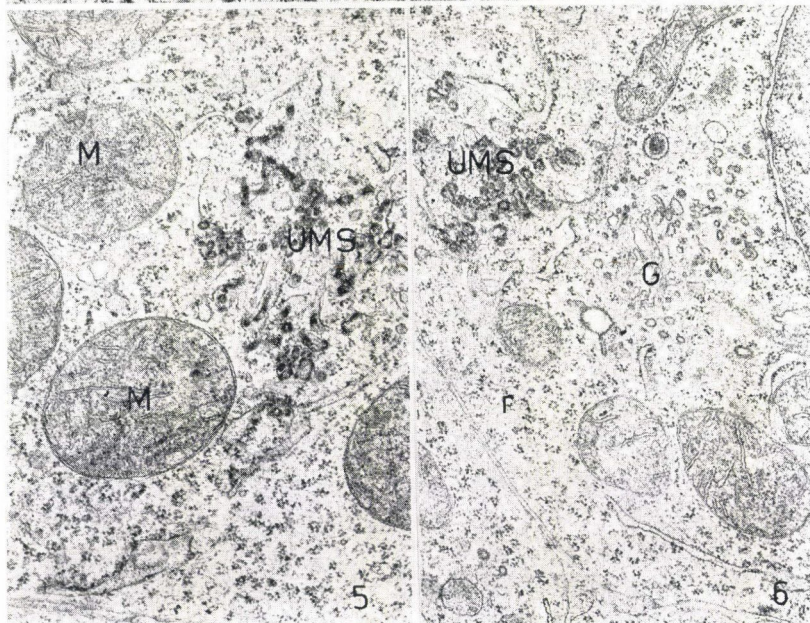
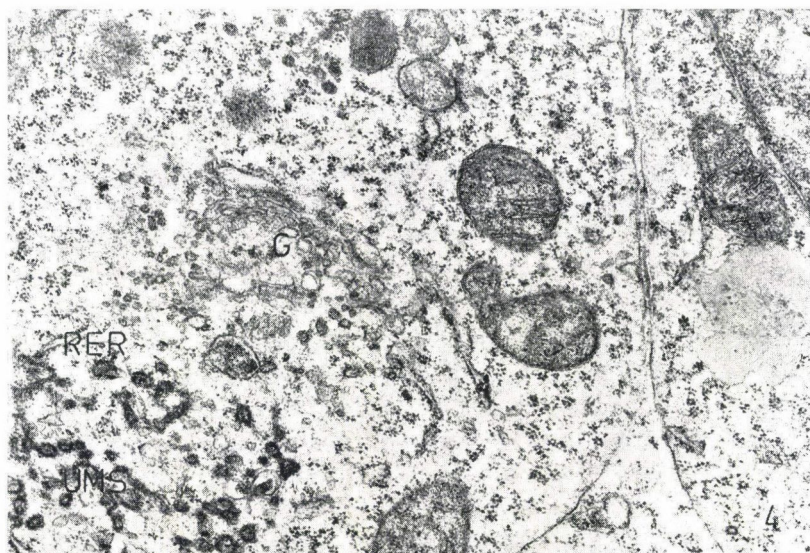




1. kép: MC 29 vírus-indukált transzplantálható csirke hepatóma tumorsejtjéről készült elektronmikroszkópos felvétel. Megfigyelhető a mitokondriumok (M) szomszédságában, az endoplazmatikus retikulum ciszternákkal (RER) kapcsolatos denz, gyűrűs-hullámos lefutású UMS. (Kontraszt: uranilacetát és ólomcitrát) 81 804. lemez 31 000 x

2. kép: Káliumpermanganát-rögzítéssel az UMS unduláló lefutása szembeűnő. A kép a felső és alsó sarkokban látható citomembrán-részletek (m) hasonló denzitásával demonstrálja az UMS citomembrán jellegét 84 452. lemez 42 900 x

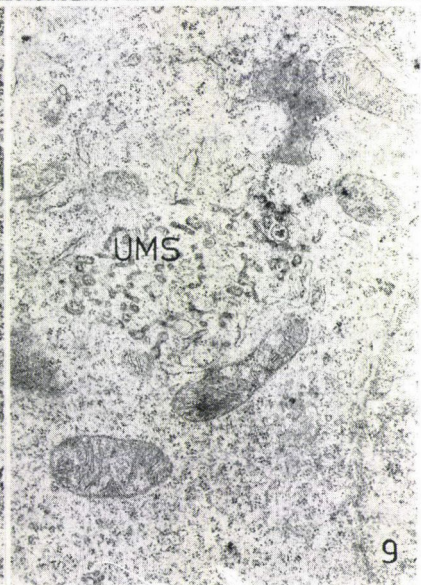
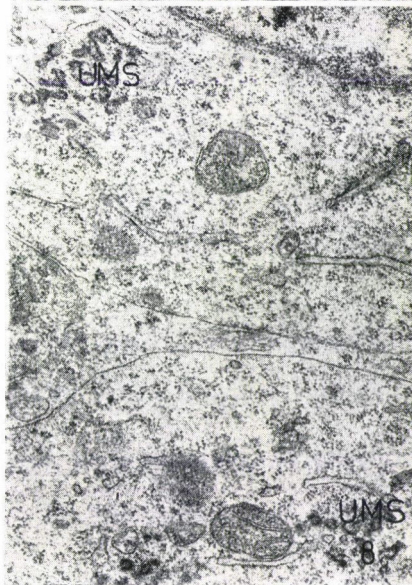
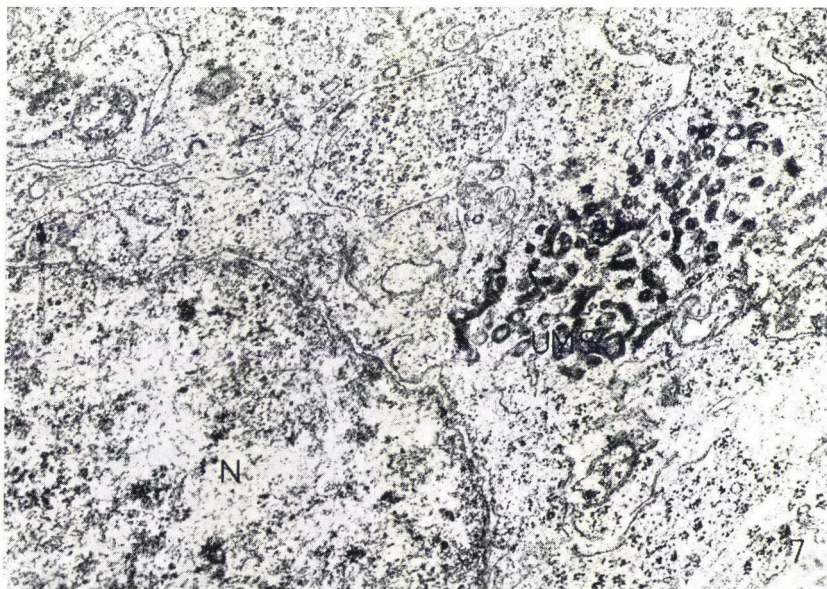
3. kép: A Thiery módszerrel az UMS és egyéb citomembránok (G, ER) hasonlatosságát tapasztalhatjuk. Kiemelendő a képen látható endoplazmatikus retikulum és az UMS feltűnő kapcsolata 94 224. lemez 42 900 x



4. kép: Kontroll a 0,5–2 órás időtartamú pepsin emésztéshez. Megfigyelhető a Golgi vezikulák és ciszternák (G) közelében a durva felszínű endoplazmatikus retikulummal (RER) kapcsolatos, igen kontrasztos UMS (Kontraszt: uranilacetát és ólomcitrát) 97 024. lemez 22 110 x

5. kép: Pepsin emésztés hatása UMS-re 0,5–1 órás időintervallumban. Szembetűnő az UMS kontraszt csökkenése. A kontroll állapotokhoz képest általános denzitás csökkenés tapasztalható, de a pepsin-emésztés UMS-specifitását bizonyítja a mitokondriumok (M) épsége (Kontraszt: uranilacetát és ólomcitrát) 97 285. lemez 25 000 x

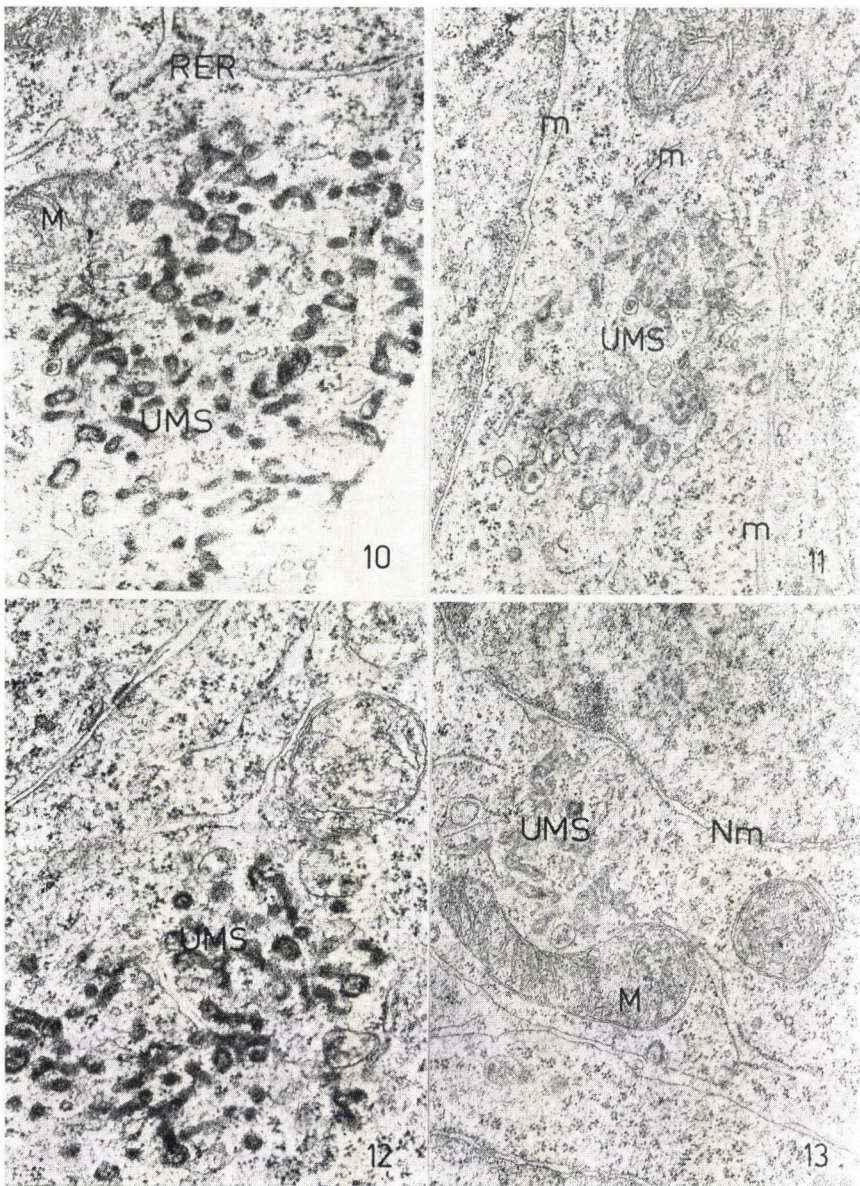
6. kép: Pepsin hatása UMS-re 1–2 órán belül. A 0,5–1 órás eredményekhez viszonyítva a struktúrák további kontraszt csökkenését észlelhetjük. Megfigyelhető a Golgi zsákok (G) és egyéb citomembránok, a citoplazmamátrix és a riboszómák (r) megtartottsága (Kontraszt: uranilacetát és ólomcitrát) 97 070. lemez 20 750 x



7. kép: Kontroll felvétel a pronase emésztéshez (0,5–2 óra). Itt is szembevetendő az UMS denz membrán-vonulata a mag közelében (N), hasonlóan a pepsin-emésztéses kontroll felvételhez. (Kontraszt: uranilacetát és ólomcitrát) 95 830. lemez 23 450 x

8. kép: Pronase hatása UMS-re 0,5–1 órán belül. A képen láthatóan a kontroll állapotokhoz képest az UMS jelentős kontraszt csökkenést mutat. Az enzim UMS-specifitását az egyéb sejt-komponensek épsége bizonyítja (Kontraszt: uranilacetát és ólomcitrát) 97 075. lemez 20 750 x

9. kép: Pronase emésztés hatása UMS-re az 1–2 óra időintervallumban. A kontrollhoz képest kevésbé denz celluláris háttérben további UMS denzitás csökkenés tapasztalható, a 0,5–1 órás viszonyokkal összevetve (Kontraszt: uranilacetát és ólomcitrát) 99 422. lemez 23 125 x



10. kép: Kontroll felvétel pepsin 2–6 órás hatásához. Megfigyelhető a denz UMS gyűrűk és hurkok közelében a durva felszínű endoplazmatikus retikulum (RER) membránja, valamint a mitokondrium (M) megtartottsága

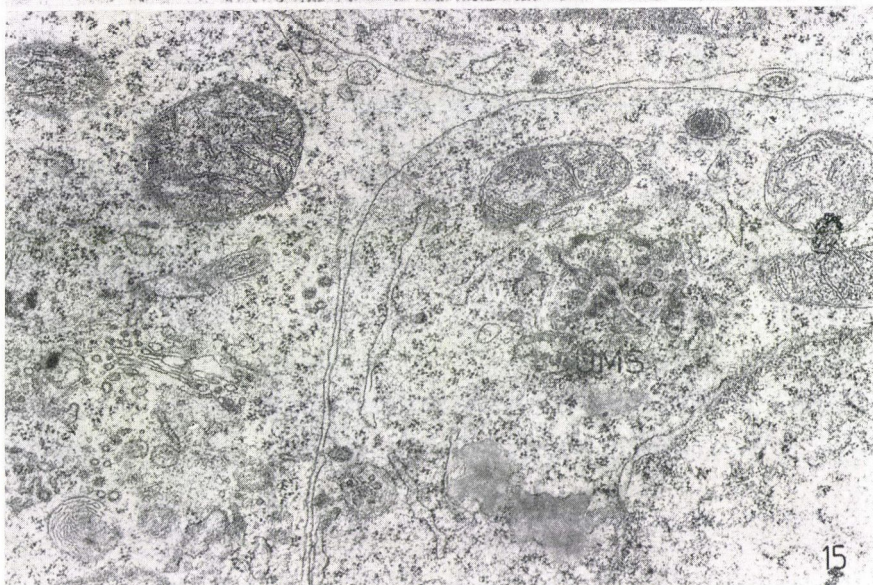
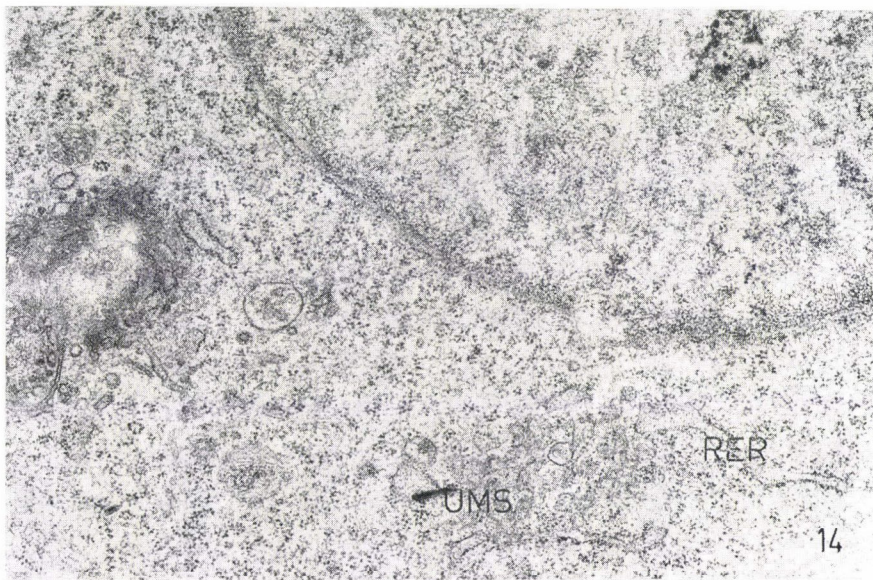
(Kontraszt: uranilacetát és ólomcitrát) 97 287. lemez 42 900 x

11. kép: Pepsin hatása 2–6 órán belül. Az UMS membránjai további denzitás csökkenést mutatnak a 0,5–2 órás eredményekhez képest. A kisebb kiterjedésű UMS hurkok mellett látható a citomembránok (m) megtartottsága is

(Kontraszt: uranilacetát és ólomcitrát) 97 283. lemez 27 000 x

12. kép: Pronase 2–6 órás hatásának kontroll felvétele. Az ugyanezen időintervallumnak megfelelő pepsin kontrollhoz hasonló UMS denzitás és sejtes megtartottság tapasztalható

(Kontraszt: uranilacetát és ólomcitrát) 96 567. lemez 66 000 x



13. kép: Pronase hatása a 2–6 órás intervallumban. A 11. képpel összevetve látható, hogy az enzim hatása nagyjából ugyanolyan UMS-denzitást eredményez, mint a pepsin. Szembetűnő a mitokondriumok (M), magmembrán (Nm) és az egyéb sejtkomponensek megtartottsága  
(Kontraszt: uranilacetát és ólomcitrát) 98 635. lemez 22 410 x

14. kép: Pepsin hatása UMS-re a 6–18 órás intervallumban. A korábbi kontroll felvételekkel összehasonlítva, jelentős háttér denzitás csökkenést tapasztalhatunk. Az UMS membrán-vonulatai már kevésbé felismerhetők a durva felszínű endoplazmatikus retikulum szomszédságában  
(RER)

(Kontraszt: uranilacetát és ólomcitrát) 98 357. lemez 23 450 x

15. kép: UMS érzékenysége pronase 6–18 órás hatásában. A 14. képhez hasonlítva feltűnő a sejtrészlet szerkezetének rajzolatossága. A pepsin ugyanekkor hatásátal megegyezően az UMS itt is nehezen azonosítható membrán-vonulatokat tartalmaz

(Kontraszt: uranilacetát és ólomcitrát) 99 273. lemez 23 450 x





## TARTALOMJEGYZÉK

<i>Rosivall László, Fazekas Árpád, Pösch Elek, Szabó György és Hársing László: A vesevér-áramlás és a véráramlás intrarenalis megoszlása kutyában normális körülmények között és uréter elzárás alatt. ....</i>	174
<i>Varga Bertalan, Ungváry György és Folly Gábor: Proszttaglandinok és a petefészek véráramlása kutyában ....</i>	185
<i>Gergely János: Az immunológiai specificitás problémái ....</i>	195
<i>Lapis Károly, Ferencz Géza, Szende Béla, Kovalszky Ilona és Jeney András: In vitro karcinogenezis vizsgálatok egér fibroblaszt sejteken ....</i>	205
<i>Nász István, Lengyel Anna, Ádám Éva és Medveczky Péter: Az adenovírusok penton anti-génjének vizsgálata ....</i>	219
<i>Bencsáth Márta, Schaff Zsuzsa és Lapis Károly: Unduláló membranózus szerkezetek citokémiai vizsgálata ....</i>	237
<i>Burnet Frank Macfarlane: T-sejt receptorok ....</i>	243
<i>Burnet Frank Macfarlane: A szomatikus sejtek genetikus hibái és kapcsolataik az immunpatológiával és öregedéssel ....</i>	251
<i>Knoll József, Hársing László Gábor és Friedmann Tamás: A 3-éter-6-azidomorfinok farmakológiája. Az azidoetilmorfin, egy új köhögéscsillapító szelektálása. ....</i>	263

Megjelent: 1977. VII. 15.

Index: 26.615