

FUNKCIONÁLIS VÁLTOZÁSOK A PLAZMAMEMBRÁNBAN IONIZÁLÓ SUGÁRZÁS HATÁSÁRA

KUBÁSZOVA TAMARA és KÖTELES GYÖRGY

Országos „Frederic Joliot-Curie” Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet, Budapest

Bevezetés

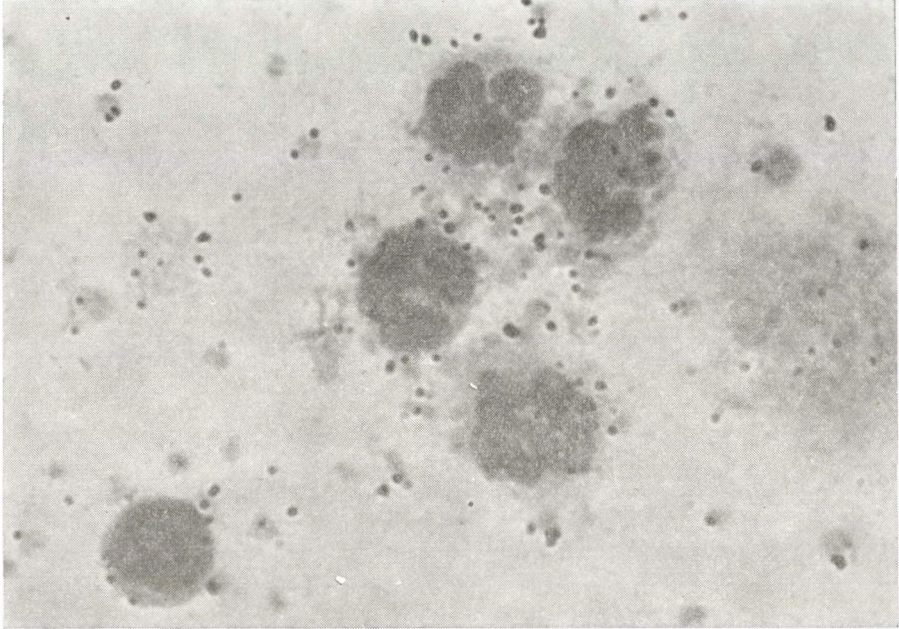
Előző előadásunkban rámutattunk arra, hogy ionizáló sugárzásoknak sejtpusztulást nem okozó viszonylag kis dózisai számos funkcionális zavart okozhatnak a sejt plazmamembránjában (8). Jelen előadásunkban saját vizsgálataink alapján néhány olyan kísérleti eredményt ismertetünk, melyek a plazmamembrán komplexebb egységeinek, a különböző receptoroknak sugárzás okozta perturbált állapotát jelzik. A vizsgálatok során alkalmazott módszereket és a kísérletek több eredményét az idézett közleményekben részleteztük.

Röntgen sugárzás hatása a plazmamembrán lektinkötő képességére

A sejtmembrán sugárzás okozta funkcionális változásait *in vitro* és *in vivo* kísérletekben különböző sejtfeleségeken vizsgáltuk. A vizsgálatok módszerül lektinkötődési technikát vezettünk be, s ez a sejtfelület változásainak nyomon követésére érzékeny, megbízható és reprodukálható eljárásnak bizonyult. Kísérleteinkben a *Canavalia ensiformis*-ből kivont lektin, a concanavalin A triciált ($^3\text{H-ConA}$) formáját alkalmaztuk, mely a sejtfelületen lévő cukorláncok mannóz és glukóz végcsoportjaihoz kötődik. A $^3\text{H-ConA}$ -t olyan koncentrációban adtuk a sejtekhez, mely lehetővé tette a sejtekhez kötött radioaktivitás mennyiség biztonságos meghatározását, ugyanakkor még nem eredményezett agglutinációt. A kis koncentrációjú lektinokkal végzett munka előnye az is, hogy ilyen körülmények között a nagyaffinitású kötőhelyek állapota, ill. annak változásai tanulmányozhatók. A plazmamembrán $^3\text{H-ConA}$ kötésének sugárhatasra bekövetkezett változásait autoradiográfiás módszerrel, ill. folyadék-szintillációs méréssel követtük. Legkorábbi megfigyeléseink emberi fibroblaszt sejtvonalhoz kapcsolódnak (9). Ezen a sejtkultúrán mutattuk ki ugyanis először, hogy ionizáló sugárzás korán megjelenő és átmeneti jellegű membrán elváltozásokat okoz, mely radioaktív izotóppal jelzett lektinnel jól kimutatható. A fibroblasztokon 0,9–9 Gy dózistartományban már a posztirradiációs periódus első három órájában fokozódott a $^3\text{H-ConA}$ kötődése. A jelenség az alkalmazott dózistól függött — a maximális értéket, a kötődés 60%-os emelke-

dését 2 Gy körüli dózis váltotta ki — és átmeneti jellegű volt, mivel a sugárzást követő néhány óra múlva a kötött radioaktivitás értékei nem különböztek a kontroll szinttől.

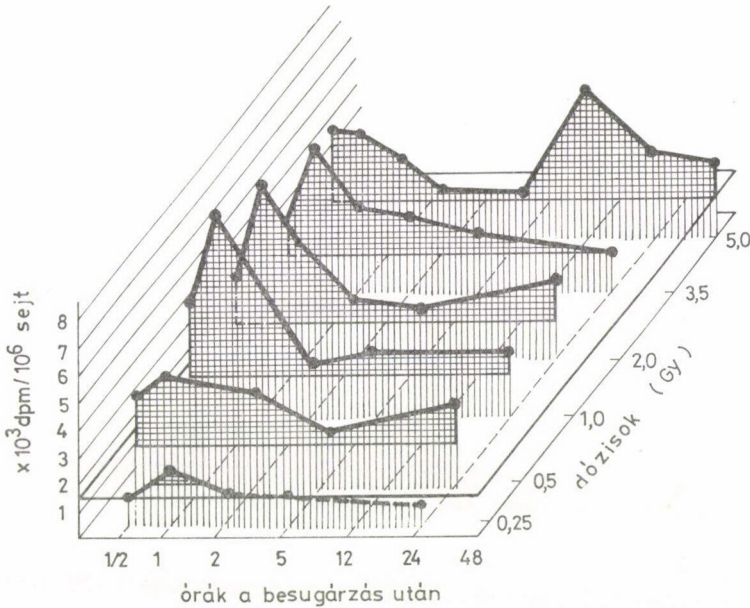
A továbbiakban könnyebben hozzáférhető objektumokon, állati és emberi vörsejteken is megvizsgáltuk a jelenséget (10, 12, 13.). Nem besugárzott, kontroll egerek autoradiográfias módszerrel vizsgált vörösvérsejtjeinek mintegy 30—40%-a volt jelzett. Ezzel szemben a különböző dózisu röntgenbesugárzás hatá-



1. ábra. $^3\text{H-ConA}$ -t kötött egér fehérvérsejtek és trombociták fénymikroszkópos autoradiogramja. Nagyítás: 1300—1500 \times

sára emelkedett a jelzett sejtek aránya, s 1 Gy dózis hatására mintegy 60%-kal meghaladta a kontroll értékét. Ezzel párhuzamosan növekedett az egy sejten kötött lektin mennyisége, az autoradiográfias szemcsék száma is. A limfocita plazmamembránján a sugárzás szintén fokozta a lektinkötést, a legnagyobb stimulációt 1 Gy dózis alkalmazása után regisztráltuk. Az autoradiogramok kiértékelésekor felfigyeltünk a kenetben előforduló trombociták intenzív jelzettségére (1. ábra), mely a dózistól függően szintén érzékenyen változott. Az autoradiográfias megfigyelést millipore filteren gyűjtött sejtek vizsgálatával is megerősítettük. 0,25—5 Gy dózisu röntgenbesugárzást követően a trombociták fokozott lektinkötéssel reagáltak a sugárkezelés utáni első két órában (2. ábra). A legnagyobb $^3\text{H-ConA}$ kötődést 1, ill. 2 Gy kezelés után mértük. Később az értékek megközelítették a kontroll szintet. A trombocita populáció-

ról azonban ismeretes, hogy az heterogén összetételű: a sejtek fiziko-kémiailag, morfológiailag és funkcionálisan is jelentősen különböznek egymástól (1, 2, 6), amit több szerző a sejtek korával hoz összefüggésbe (2, 5, 14). Így a trombociták általunk észlelt plazmamembrán zavara az egész populáció átlagértékét fejezte ki. Felvetődött ezért a kérdés, hogy vajon a „fiatal” és „idős” sejtek membránfunkciója besugárzásra eltérő módon változik-e. Ennek tisztázására centrifugálással bekoncentrált teljes trombocita populációból Ficoll-Uromiro

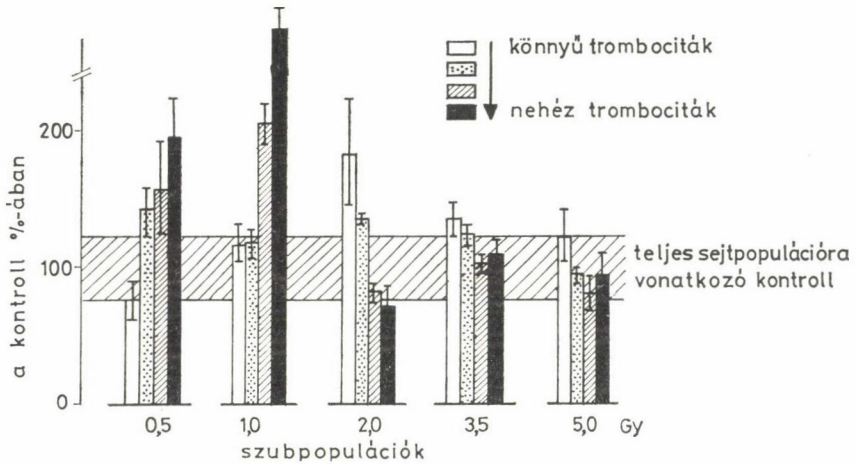


2. ábra. Röntgenbesugárzott egerek teljes trombocita populációjának ³H-ConA kötése (ordináta: dpm/10⁶ sejt) a besugárzási dózis (Z-tengely: 0,25–5 Gy) és a posztirradiációs idő (abszcissa: 1/2–48 óráig) függvényében

grádiensen ultracentrifugálással 4 szubfrakciót szeparáltunk (5, 13). A különböző fajsúlyú rétegek között irodalmi adatok szerint a gradiens felső sávjában főleg az idős sejtek helyezkednek el, a legnehezebb fázis határán pedig a többnyire fiatal trombocitákból álló szubpopuláció található (2, 5, 14). A közbeeső két sávot átmeneti korú sejtek képezik. Az egyes szubfrakciókat ³H-ConA-val jeleztük. Amint a 3. ábrán látható, azt találtuk, hogy röntgenbesugárzás hatására legérzékenyebben a fiatal vérlemezkék reagáltak: már 0,5 Gy és 1 Gy dózisosok a kontroll szinthez viszonyítva közel 2-, ill. 4-szeresen fokozták a lektinkötődést. Idősebb sejtek plazmamembránjában csak nagyobb dózisosok okoztak fokozott ³H-ConA kötést.

Állatkísérleti eredményeink alapján eddigi megállapításainkat a következőkben lehet összefoglalni (13): 1) röntgensugárzás hatására a plazmamemb-

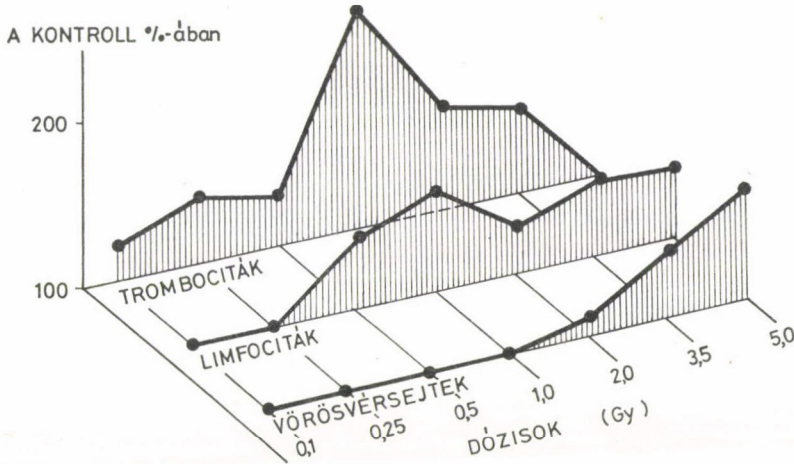
rán perturbálódik, mely jelenség akár autoradiográfiás, akár radioaktivitás mérési módszerrel jelzett lektinkötődési technikával jól kimutatható, 2) a sugárzás okozta perturbáció több fajta sejtben, *in vivo* és *in vitro* besugárzást követően is kimutatható volt, azaz általános érvényű jelenség, 3) a különböző sejtek reakcióképességében, sőt egyfajta sejtpopuláción belül is a sejtek korától, fiziológiai állapotától függően azonban jelentős eltérések vannak, 4) a plazmamembrán perturbációja a besugárzás utáni néhány órában mutatható ki, átmeneti jellegű, s mértéke a dózistól függően változik.



3. ábra. Fajsúly gradiensen elválasztott különböző trombocita szubpopulációk $^3\text{H-ConA}$ kötése 0,5—5 Gy dózistartományban történt röntgenbesugárzás után

Ezekután indokoltnak látszott hasonló összefüggések vizsgálata emberi vérsejtek plazmamembránjaiban. A jelenségek sugárbiológiai érdekességén kívül azok gyakorlati alkalmazhatóságát is meg kívántuk vizsgálni, nevezetesen azt, hogy a membránok sugárzás okozta változásai felhasználhatók-e a sugárh hatás korai biológiai indikátorául (12). Ezért a vérsejtek *in vitro* besugárzásával kezdtünk kísérleteket. Megállapítottuk, hogy a plazmamembrán perturbáltsága ilyen körülmények között is igen korán — a besugárzás után az első 3 órán belül — megjelent dózisfüggő mértékben és átmeneti jelleggel. Az egyes sejtfeleségek membránjaihoz kötött radioaktivitás mennyisége nem besugárzott sejtekben is különbözött, besugárzás hatására pedig egymástól szintén eltérő mértékben reagáltak. Így arra következtettünk, hogy kizárólag egyes sejt típusok alapján nem becsülhető meg egyértelműen a szervezetben abszorbeált dózis. Ezért BÖYUM módszerét (3, 4) némileg módosítva egy vérmintából, egyszeri centrifugálással egyidejűleg izoláltuk a trombocitákat, limfocitákat és vörösvérsejteket, s azonos feltételek mellett állítottuk be a lektinkötési próbát. Az így kapott

eredmények összehasonlítása alapján a 4. ábrán könnyen felismerhető 3 dózistartomány: a 0,1–0,5 Gy közötti, amikor már a legérzékenyebben reagáló trombociták kötik fokozott mértékben a $^3\text{H-ConA}$ -t, 0,5–2 Gy között a trombocitákkal párhuzamosan a limfociták plazmamembránjaiban is kimutatható a sugárzás okozta funkcionális zavar, továbbá 2 Gy és nagyobb dózisoknál a vörösvérsejtek lektinkötése is emelkedett. Ez a modell tehát megközelíti a célt, egy membrán sugárbiológiai jelenségre alapozott, elvileg újszerű indikátor kidolgozását. További feladat azonban annak vizsgálata, hogy az *in vitro* besugárzással kiváltott membrán válaszokhoz minőségben és mennyiségben hasonlóak lennének-e meg *in vivo* körülmények között is.

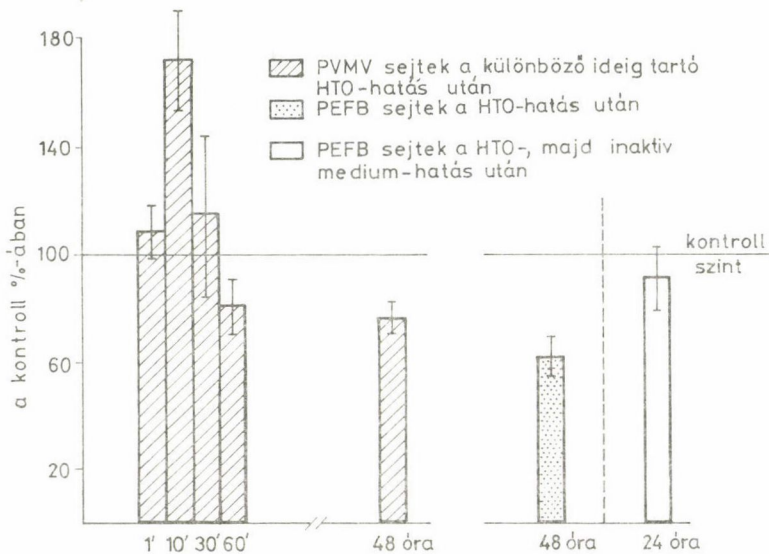


4. ábra. *In vitro* röntgenbesugárzott emberi vérből szeparált trombociták, limfociták és vörösvérsejtek $^3\text{H-ConA}$ kötése 0,1–5 Gy dózistartományban

Béta sugárzás hatása a plazmamembrán lektinkötő képességére

A plazmamembrán röntgensugárzással szembeni érzékeny reakciója felvetette azt a kérdést, hogy ez a jelenség mennyiben függ a sugárkvalitástól. Ez irányú munkánk azon első eredményeiről számolunk be, melyeket triciált vízzel kezelt sejt kultúrákon kaptunk. A kísérleteket különféle sejttenyészeteken végeztük (PVMV, PEFB), különböző ideig (1 perctől 48 óráig) tartó, kis koncentrációjú, $37 \text{ kBq} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($1 \mu\text{Ci} \cdot \text{ml}^{-1}$) triciált víz (HTO) expozíció után, s azonos tendenciát mutató eredményeket kaptunk. Kimutattuk, hogy a HTO egyéb ismert sejtbiológiai hatások mellett jelentős mértékben befolyásolja a sejtek lektinkötő képességét (5. ábra). A membrán perturbáltságára utal, hogy a legkorábbi időpontokban észlelt fokozott $^3\text{H-ConA}$ kötődést később, az 1. órától kezdve a kötött radioaktivitás mennyiségének csökkenése követte. A HTO tartalmú tápfolyadék eltávolításával az eredeti membránviszonyok 24 órán belül helyreálltak. Megállapítottuk tehát, hogy a lágy béta sugárzó

trícium hatására is létrejött a sejtmembránok átmeneti funkcionális zavara. A változások iránya azonban eltérő, ugyanis ellentétben a röntgensugárzás hatásával, a béta részecskékkel való tartós expozíciónál a kötött lektin mennyiségében nem fokozódás, hanem csökkenés volt mérhető. Mindenesetre mind a röntgen, mind a béta sugárzás indukálta változások arra utalnak, hogy a plazmamembránban olyan átrendeződés történik, amelynek következtében megváltozik a hozzáférhető lektinkötő helyek száma.



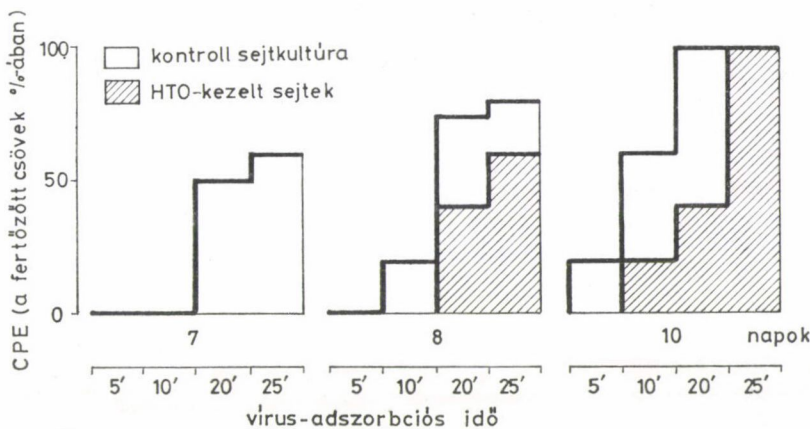
5. ábra. Triciált víz ($37 \text{ kBq} \cdot \text{ml}^{-1}$) különböző ideig tartó (1 perctől 48 óráig) hatása primer vervet majomvese (PVMV), primer emberi fibroblaszt (PEFB) sejtek $^3\text{H-ConA}$ kötésére

Béta sugárzás hatása a sejt vírusreceptorainak funkciójára

A ConA kötődése a sejt felületén a nagy számban található és diszperz eloszlású mannóz, ill. glükóz csoportokhoz — bizonyos biológiai hatások ellenére (agglutináció, mitózis indukció) — aspecifikusnak tekinthető. A membrán perturbáció súlyosságának és következményeinek jellemzéséhez azonban vizsgálatokat kezdtünk annak tanulmányozására, hogy összetettebb, specifikus receptorok (7, 15) funkciója perturbálható-e. Ezért primer vervet majomvese (PVMV) sejteket 48 órán át $37 \text{ kBq} \cdot \text{ml}^{-1}$ HTO-t tartalmazó tápfolyadékban tartottunk, majd 2. típusú élő poliovakinával fertőztük.* Azt találtuk, hogy 100 TCID₅₀ vírusrészeg alkalmazása esetén a HTO-kezelt sejteknél a citopatogén hatás (CPE) kifejlődése jelentősen, 1 nappal később kezdődött és

* A víruskísérleteket az OKI Vírus Oltóanyag Ellenőrző Osztályával, dr. Horváth Lidia kandidátussal együttműködésben folytattuk.

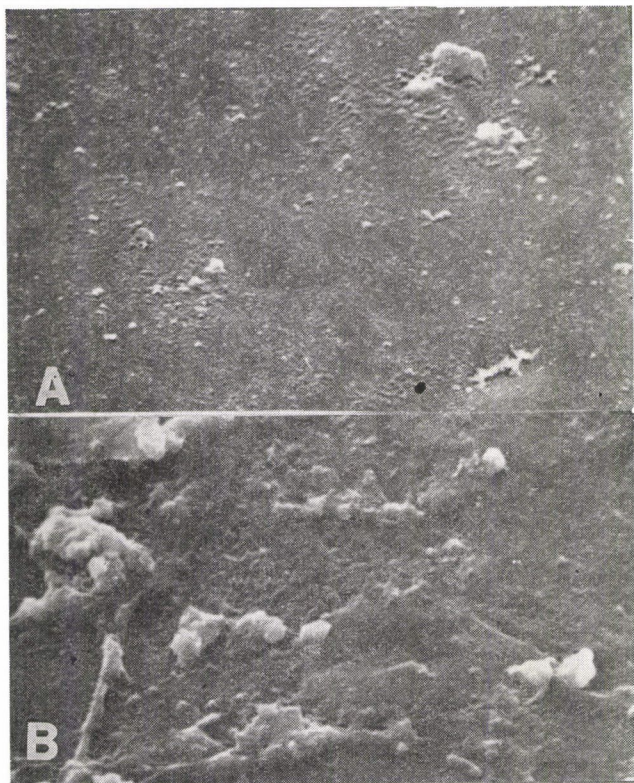
mértéke a folyamat során elmaradt a kontroll szintjétől, még akkor is, amikor a kontroll sejtekben a CPE már teljesen kialakult. Még feltűnőbb volt a különbség a HTO-kezelt és kezeletlen sejt kultúrák között, amikor megfelelő vírus-specifikus immunsavó hozzáadásával szabályoztuk a vírus adszorpciós idejét a sejtmembránon (6. ábra). A sejtdestrukciós folyamat a HTO-kezelt kultúrákban ez esetben is lassúbb ütemben zajlott le, s a HTO-hatás utáni 5 perces vírus—sejt kontaktus egyáltalán nem vezetett fertőzéshez, ill. sejtpusztuláshoz (11). Triciált víz tehát olyan kis koncentrációban, mely nem vezetett a sejtek pusztulásához, vagy azok olyan mértékű károsításához, mely a vírusszintézist megakadályozta volna, úgy változtatta meg a sejt felületet, hogy a vírus partikulák nem, vagy csak késleltetve tudtak a sejtbe penetrálni.



6. ábra. Citopatogén hatás megjelenése primer veret majomvese sejtekben 2. típusú attenuált élő polio vakcinával való fertőzés után a vírus adszorpciós időtartam függvényében

Sugárzás okozta mikromorfológiai változások a sejt felületén

A továbbiakban azt elemeztük, hogy a membrán perturbáltságától eredő finom funkcionális zavarok háttérében kimutatható-e a sejt felület változása mikromorfológiailag is. Vizsgálatainkat humán embrió fibroblasztokon, s azzal a röntgensugárdózissal — 2,5 Gy — végeztük, mellyel korábbi munkánk során a lektinkötésben a legnagyobb választ kaptuk. Scanning elektronmikroszkópiával megállapítottuk (16), hogy már a besugárzást követő 1 órán belül a szövettényészet sejtjein jelentős alakbeli és felszíni változások észlelhetők (7. ábra). A sejt—sejt közötti kapcsolatok, a sejtek aljzathoz tapadása meglazult, a sejtek megnyúltak, elvékonyodtak, jelentős területű pseudopodiumok és hosszan elnyúló filopodiumok alakultak ki. A folyamat reverzibilitását mutatja, hogy mintegy 1 órával a besugárzás után vékony plazmahidak segítségével már megkezdődött az aljzatról felszakadt sejt szélek visszatapadása, mely folyamat, a kontroll kultúrához hasonló konfluens monolayer visszaalakulása a 24. órára teljessé vált.



7. ábra. Primer emberi fibroblasztok sejtfelületének scanning elektronmikroszkópos megjelenése kontroll sejtekben (A: 1500× nagyítás, B: 3800× nagyítás) és 2,5 Gy röntgenbesugárzás után 1 órával (C: 1900× nagyítás)

Összefoglalás

Kimutattuk, hogy röntgenbesugárzott egerek véresejtjein, ill. *in vitro* sugárkezelt emberi trombocitákon, limfocitákon és vörösvérsejteken a sejt-felület perturbálódik, melynek mértéke lektinkötés alapján mérhető. A plazmamembrán sugárzás okozta perturbációja korán megjelenő, a sugárdózistól függő és átmeneti jelenség. A különböző típusú, funkciójú és korú emlőssejtek plazmamembránja ionizáló sugárzásokkal szemben egymástól eltérő mértékben reagál. Röntgensugárzáson kívül triciált víz jelenléte is membrán átrendeződést okoz. Utóbbival a lektinkötésen kívül vírus adszorpciós kísérletekben is bizonyítottuk a membránreceptorok funkciójának zavarát. A súlyos sejtkárosítást nem okozó, viszonylag kis dózisu sugárzás kiváltotta funkcionális eltérésekkel párhuzamosan scanning elektronmikroszkópiával a sejt-felület mikromorfológiai változásai is megfigyelhetők.

IRODALOM

1. BOLIN, R. B. OKUMURA, T., JAMIESON, G. A.: *Nature (London)* **269**, 69 (1977).
2. BOOYSE, F. M., HOVEKE, T. P., RAFELSON, M. E. Jr.: *Biochim. Biophys. Acta* **157**, 660 (1968).
3. BÖYUM, A.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21**, suppl. 97 51 (1968a).
4. BÖYUM, A.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, suppl. 97, 77 (1968b).
5. CORASH, L., TAN, H., GRALNICK, H. R.: *Blood* **49**, 71 (1977).
6. JAMIESON, G. A.: in *Mammalian cell membranes*, szerk. Jamieson, G. A., Robinson, D. M., Butterworth Ltd. London **3**, 27 (1977).
7. KOHN, L.: *Adv. in Virus Res.* **24**, 223 (1979).
8. KÖTELES, Gy. J., KUBÁSZOVA, T.: *MTA Biol. Osz. Közl.* **25**, 41 (1982).
9. KÖTELES, G. J., KUBASOVA, T., VARGA, L.: *Nature (London)* **259**, 507 (1976).
10. KUBASOVA, T., CSAKY, L., KÖTELES, G. J., VARGA, L., SZTANYIK, L. B.: *Proc. IVth Intern. Congr. IRPA, Paris* 203. o. (1977).
11. KUBASOVA, T., HORVÁTH, L., KÖTELES, G. J.: *Int. J. Radiat. Biol.* (1982). megjelenés alatt.
12. KUBASOVA, T., KÖTELES, G. J., VARGA, L. P.: *Int. J. Radiat. Biol.* **40**, 187 (1981).
13. KUBASOVA, T., VARGA, L. P., KÖTELES, G. J.: *Int. J. Radiat. Biol.* **40**, 175 (1981).
14. LEONE, G., AGOSTINI, A., DECRESSENZO, A., BIZZI, B.: *Scand. J. Haematol.* **23**, 204 (1979).
15. LONBERG-HOLM, K. és PHILIPSON, L.: in *Monographs in virology*, szerk. Melnick, J. L., S. Karger Publ. 9. köt. (1974).
16. SOMOSY, Z., KUBASOVA, T., KÖTELES, G. J.: *J. Radiat. Res.* (1982) megjelenés alatt.