

A TÜDŐSZÖVET SEJTJEINEK IN VIVO DNS SZINTÉZISÉT SPECIFIKUSAN GÁTLÓ, FEHÉRJE TERMÉSZETŰ FAKTOR RÉSZLEGES TISZTÍTÁSA MARHATÜDŐBŐL

MENYHÁRT JÁNOS és MARCSEK ZOLTÁN

MTA-SOTE Egyesített Kutatási Szervezet Klinikai Biokémiai és Sejtbiológiai Részlege,
Budapest

A sejtproliferációt serkentő és gátló, természetes (endogén) anyagok létezéséről szövetek durva kivonataival és ezek, valamint a szérum különböző fokban tisztított frakcióival szerzett tapasztalatok tanúskodnak (BISMARCK és mtsai 1975, GOSPODAROWICZ és MORAN 1976, BALÁZS 1979, RUDLAND és DE ASUA 1979). Elméleti jelentőségük és gyakorlati felhasználásuk potenciális lehetőségei (RYTÖMAA és mtsai 1976, RYTÖMAA és mtsai 1977) különös fontosságot kölcsönöznek a sejtproliferáció endogén, gátló anyagainak és ezek szövet- illetve sejtvonal-specifikus hatásának tartott, sok vitát kavaró, ma is ellentmondásos változatainak, az ún. kalonoknak (BULLOUGH 1962, THORNLEY és LAURENCE 1975, BULLOUGH 1975, IVERSEN 1976). A kalon elmélet általános elfogadásának máig legnagyobb akadályja a hatóanyagok szövet- illetve sejtvonal-specifikus hatásainak bizonyítására használt, túlnyomó többségükben in vitro tesztrendszerek alkalmasságával szemben hangoztatott kételyekben, valamint a biológiai hatásokat közvetítő anyagok kémiai természetére és szerkezetére vonatkozó ismeretek elégtelenségében és bizonytalanságaiban keresendő (THORNLEY és LAURENCE 1975). Napjainkig mintegy 20-féle szövetkivonatban írtak le szövetspecifikus gátló hatásokat (BALÁZS 1979, BULLOUGH 1975, IVERSEN 1976). Azonban a hatás mechanizmusának és még inkább a hatásokat hordozó anyagok kémiai természetének részletesebb elemzésére csak a granuloid (RYTÖMAA 1976, RYTÖMAA és mtsai 1976, PAUKOVITS és mtsai 1977, RYTÖMAA és mtsai 1977, MAURER és mtsai 1978, PAUKOVITS és HINTERBERGER 1978, RYTÖMAA és TOIVONEN 1979) és részben az epidermális (HONDIUS—BOLDINGH és LAURENCE 1968, ELGJO 1973, MARKS 1974), illetve a limfoid (ATTALLAH és HOUCK 1976, HIESTAND és mtsai 1977, HOUCK 1979) eredetű inhibitorok eseteiben került sor. Tüdőszövetből készített durva vizes kivonatok in vitro gátló hatását SIMNETT és mtsai (1969) „short term” tüdő explantatumokon, a tüdőszövet vizes kivonata $3-5 \times 10^4$ molsúly tartományba eső anyagokat tartalmazó ultrafiltrátumának gátló hatását pedig HOUCK (1976) bronchialis carcinoma sejttenyészetekben mutatták ki.

Ebben a közleményben egy olyan, marha tüdőszövet vizes kivonatából nyert, fehérje természetű anyag részleges tisztításáról számolunk be, amely egér tüdőszövet sejtjeinek in vivo DNS szintézisét szövet- illetve sejtvonal-specifikus módon gátolja.

Anyag és módszer

A) Felhasznált anyagok és eszközök

A kísérletek során felhasznált valamennyi vegyszert a Reanal Vegyszergyárból szereztük be, a.l.t. minőségben. A kromatográfiás elválasztás céljára DEAE Sephadex A-50, CM Sephadex C-25, Sephadex G-75 géleket, illetve $2,6 \times 100$ cm és $5,0 \times 85$ cm méretű oszlopokat (Pharmacia Fine Chemical) használtunk. Utóbbiak egyenletes átáramoltatását az eluciók során Vario-perpex (LKB) pumpákkal biztosítottuk. A sejttenyészetekhez Parker TC 199 mediumot (OKI, Budapest) használtunk. A DNS szintézis mérése ^3H -TdR (Amersham, 25 Ci/mmol) segítségével történt.

Vizes kivonat készítése marha tüdőszövetből

A feldolgozásra került marhatüdőket a budapesti marhavágóhídról szereztük be. Az állatorvos által egészségesnek minősített állatok tüdejét, közvetlenül a mellkas megnyitását követően eltávolítottuk, majd jéggel előrehűtött edényekben a laboratóriumba szállítottuk és mélyhűtőbe helyeztük. A tüdők feldolgozása az állatok levágását követő 40 percen belül minden esetben elkezdődött. A feldolgozás valamennyi lépése hűtött körülmények között ($2-4^\circ\text{C}$) történt.

A kivonási műveletet, határfokának növelése érdekében, több lépésben végeztük. Az esetenként $4-6$ kg súlyú szövetet, durva felaprítás után jég-hideg fiziológiás sóoldatban mostuk, majd jégszekrényben működtetett elektromos húsdarálón, egymást követő két alkalommal átdaráltuk. A megdarált szövetet tízszeres mennyiségű, hűtött desztillált vízben szuszpendáltuk, majd 1500 ml-es térfogatokban, 2 percen át $2 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ fordulatszámmal működtetett Waring blendorral aprítottuk. Ezt követően a szuszpenziót 10×2 percen át hűtőszekrénybe helyeztett 70 W teljesítményű ultrahangdezintegrátorral kezeltük, majd éjszakán át, 2°C -on állni hagytuk.

Az így előkészített anyagot 4 réteg gézen át szűrtük, a szűrlethez $0,1$ M vég koncentrációban, Trisz—HCl puffert (pH 5,5) adtunk, majd egy J 21B (Beckman) centrifuga, $1,8$ l úrtartalmú zonális rotorjában, 2°C hőmérsékleten, 30 percen át, 4×10^4 g nehézségi erővel üleptítettük. Frakcionáláshoz az így nyert felülúszót használtuk föl.

A vizes kivonat frakcionálása:

a) *Ultraszűrés:* az előzőek szerint kapott felülúszót, recirkulációs rendszerben működtetett Amcon H1P100 kapilláris membránfiltrációs egységgel (nominális szűrési határ: 10^5 dalton) szűrtük, majd a filtrációs maradékot (retentátum) tízszeres térfogatú Trisz—HCl puffer ($0,1$ M, pH = 5,5) folyamatos utántöltésével szűrtük tovább.

A szűrletet, szakaszos rendszerben működtetett Amicon H1P10 kapilláris membránon (nominális szűrési határ: 10^4 dalton) történő szűréssel koncentráltuk és az ekkor nyert, 10^4 és 10^5 dalton molsúly határok közé eső anyagokat tartalmazó retentátum pH-ját, megfelelő összetételű Trisz—HCl pufferral (0,1 M) szemben történő dialízis segítségével pH 8,0-as értékre állítottuk be.

b.) *Oszlopkromatográfia*: a fentiek szerint előkészített szűrletet DEAE Sephadex A-50 géllal töltött, 5×85 cm oszlopon, szakaszos grádiens elucióval, 0,65 ml/perc átfolyási sebességgel kromatografáltuk. Az eluciót 0,1 M Trisz—HCl pufferral (pH = 5,5) kezdtük, majd az első csúcs megjelenésekor indított NaCl grádienssel folytattuk. Az egyes eluciók szakaszokat az alábbi térfogatú és összetételű eluciók folyadéksor jelentette: a) 1100 ml 0,1 M Trisz—HCl (pH = 8,0); b) 900 ml Trisz + 0,05 M NaCl (pH = 7,3); c) 1100 ml Trisz 0,1 M NaCl (pH = 7,0); d) 900 ml Trisz + 0,2 M NaCl (pH = 6,8); e) 1600 ml Trisz + 0,35 M NaCl (pH = 6,0).

A biológiai aktivitást (1. később) mutató összetevőket tartalmazó kromatográfiai frakciókat, a H1P10 kapilláris membránfiltrációs egység segítségével, 0,1 M Trisz—acetát pufferral (pH = 5,5) szemben végzett dialízis után, ugyan-ezen pufferral egyensúlyba hozott CM Sephadex G-25 géllal töltött $2,6 \times 100$ cm méretű oszlopon tisztítottuk tovább. Az oszlop szakaszos eluciója olyan pufferral alkalmazásával történt, amely az alább megadott koncentrációjú NaCl mellett, ecetsavval a kívánt pH értékre beállított, 0,1 M koncentrációjú Trisz-t tartalmazott. Az eluciók szakaszokat az alábbi térfogatú és összetételű pufferek képezték: a) 300 ml Trisz—acetát (pH = 5,5); b) 250 ml 0,025 M NaCl (pH = 5,7); c) 250 ml 0,05 M NaCl (pH = 6,00); d) 250 ml 0,075 M NaCl (pH = 6,115); e) 300 ml 0,1 M NaCl (pH = 6,5); f) 500 ml 0,3 M NaCl (pH = 7,5).

A biológiai aktivitást (1. később) tartalmazó kromatográfiai frakciókat, a H1P10 kapilláris membrán egység segítségével, PBS-sel szemben végzett dialízist követően, $2,6 \times 200$ cm méretű, Sephadex G-65-tel töltött oszlopon kromatografáltuk. Az eluciót 0,44 ml/perc sebességgel áramoltatott PBS-sel végeztük. Az oszlopokat előzetesen albumin V. frakcióval (ms: 65,000 D) és citokróm C-vel (ms: 12,000 D) kalibráltuk.

Az eluátumok optikai aktivitását, valamennyi kromatográfiai eljárás során 280 nm-en, Uvikord II. (LKB) fotométerrel, folyamatosan regisztráltuk.

Közelítő molsúlymeghatározások

A részlegesen tisztított, biológiailag aktív kromatográfiai frakciók anyagainak közelítő molsúlyát részben kalibrált Sephadex G-75 oszlopon (1. fentebb), részben az ülepedési sebesség módszerével, albumin standardra vonatkoztatva, ultracentrifugával határoztuk meg (BOWEN 1970).

Kémiai analízis: Az eluátumok fehérje tartalmát az adszorbencia 280 nm-en történő folyamatos mérésével, esetenként pedig LOWRY (LOWRY és mtsai 1951)

szerint határoztuk meg. A minták DNS tartalmának meghatározása a BURTON f. eljárással (BURTON 1956) történt.

A biológiai aktivitás (^3H —TdR beépülés DNS-be) mérése

Valamennyi, biológiai tesztelésre került kromatográfiás frakciót PBS-sel szemben kimerítően dializáltunk, az eluciós folyadékok nem kívánatos, kis mol-súlyú komponenseinek eltávolítása érdekében.

a) *In vivo* *teszt rendszerek*

1. *Szkrinelő teszt*: a csak kis fokban tisztítottnak tekintett DEAE Sephadex frakciók biológiai aktivitásának tesztelését ún. szkrinelő eljárással végeztük. Ennek során egerek azonos tüdőlebenye nedves súlyra vonatkoztatott egységnyi mennyiségében mérhető radioaktivitás értékeket hasonlítottuk össze. A szkrinelő teszt menete a következő volt. Minden frakció tesztelése 30 db 25 g súlyú, saját tenyésztésű, CLFP egérből álló csoporton történt. Az egereket a DEAE Sephadex frakciók 12,5 mg fehérje/kg dózisaival, i. p. injiciáltuk. Az adagolást 1,5 órás időközökben, 4 alkalommal megismételtük. A 6 órás idő intervallumban beadott anyag összes mennyisége tehát 50 mg fehérje/kg volt. Az első dózis beadásának időpontjától számított 5. órában, 0,5 mCi/kg, i. p. ^3H —TdR-t adagoltunk. Az izotóp beadását követő 1,5 órában az egereket dekapitáltuk, tüdejük azonos lebenyét eltávolítottuk, ezek súlyát 0,5 mg pontossággal lemértük, majd szcintillációs edénybe mért, 1 ml Soluene-100 (Packard) szolubilizáló oldatba helyeztük. A tüdőlebenyeket tartalmazó edényeket, éjszakán át, szobahőmérsékleten, 150 min^{-1} frekvenciával rázattuk, majd a szolubilizált tüdőt tartalmazó edényekbe 10 ml PP0—P0P0P tartalmú, toluolos szcintillációs folyadékot mértünk. 4 órás állás után a minták radioaktivitását folyadékszscintillációs spektrométerrel (Packard TriCarb 2110) meghatároztuk. A minták egyedi hatásfokának megítélése érdekében, a radioaktivitás mérése automatikus külső standardizálással történt. A számításokat a hatványgörbék lineáris transzformációjának regressziós analízisével, mikroszámítógépen végeztük.

2. *DNS-be épült ^3H —TdR specifikus aktivitásának mérése*: a nagyobb mértékben tisztított CM Sephadex frakciók *in vivo* biológiai aktivitásának és szövet-specificitásának tesztelését a különböző szövetekből (tüdő, lép, vese) izolált DNS súlyegységébe beépült jelzett timidin mennyiségének mérésével végeztük. Egy-egy frakció tesztelése 20—20 db egérből álló állatcsoportokon történt. A frakciók anyagainak adagolását az 1. pont alatt leírtak szerint végeztük, azzal a különbséggel, hogy ebben a kísérlet sorozatban, a másfél óránként ismételt egyszeri dózis 7,5 mg fehérje/kg, a 6 óra alatt beadott összes anyagmennyiség 30 mg fehérje/kg volt. Dekapitálást követően minden állat két, azonos tüdőlebenyét eltávolítottuk és a két lebenyt, párhuzamos mérések céljára külön-külön dolgoztuk fel, az alábbiak szerint. A lebenyeket 3 ml jéghideg,

7%-os TCA-val homogenizáltuk. A keletkezett csapadékot lecentrifugáltuk, majd kétszer 7% TCA-ban, ezt követően etanol-éter 3 : 1 arányú keverékében, végül éterben reszuszpendálva mostuk. Az éteres kivonás után visszamaradó csapadékot 1,5 M HClO₄-ban, forró vízfürdőn, 30 percig hidrolizáltuk, szűrtük és a szűrlet 0,5 ml-ében mérhető radioaktivitást 5,0 ml Instagel (Packard) szcintillációs folyadék hozzáadása után az 1. pontban leírtak szerint meghatároztuk. Ugyanazon szűrletből DNS meghatározásokat is végeztünk. A mérések eredményeit dpm/ μ g DNS egységekben fejeztük ki.

b) *In vitro*-teszt-rendszerek

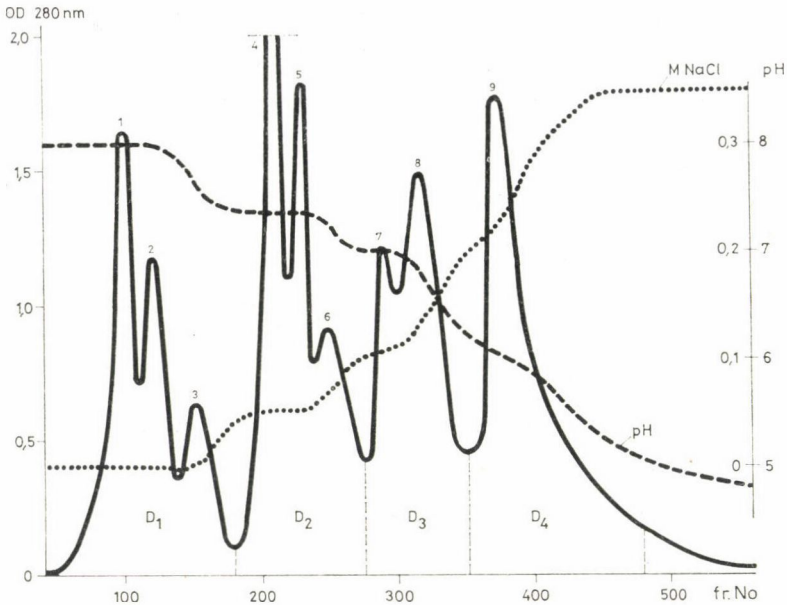
Az *in vivo* hatásosnak mutakozó frakciók biológiai aktivitását, a fent ismertetett *in vivo* rendszerek mellett, *in vitro* rendszerekben is megvizsgáltuk. *In vitro* teszt-rendszerként Parker TC 199 mediumban Belco csövekben 37 °C-on tenyésztett csontvelő (3×10^6 sejt/ml) és timocita (5×10^6 sejt/ml) kultúrák szolgáltak. A biológiai hatás mérése ³H—TdR DNS-be történő beépülési sebességének meghatározásával történt, az inkubáció 3—4. órájában.

Autoradiográfia: annak érdekében, hogy képet kapjunk az *in vivo* adagolt jelzett timidinnek a tüdőt felépítő sejtek DNS-ében történt megoszlásáról — a radioaktivitás szövetszéli lokalizáltságáról —, néhány esetben elvégeztük a tüdőlebenyek autoradiográfiás vizsgálatát is. Ennek során Ilford K6 emulziót, 3—5 hét expozíciós időt és metilzöld-pyronin festést alkalmaztunk.

Eredmények

4 kg marhatüdőből, a módszertani részben ismertetett kivonási és ultraszűrési eljárások segítségével összesen 23 g 10,000—100,000 D tartományba eső molsúllyal rendelkező fehérjét állítottunk elő, amely a tüdőszövet összfehérje tartalmának mintegy 2,9%-át képviselte. E fehérje frakció DEAE Sephadex A-50 kromatográfiával, só és pH gradiens alkalmazása mellett nyert és jól reprodukálhatónak bizonyuló kromatogramját az 1. ábrán mutatjuk be. A 280 nm-en regisztrált kromatogramon 9 eluciócsúcs volt megfigyelhető. A csúcsoknak megfelelő anyagok gyűjtése, az ábrán jelzett módon, D₁, D₂, D₃ és D₄ frakciókban történt. A frakciók *in vivo* biológiai aktivitásait a módszertani részben leírtak szerint teszteltük. A testsúly 25%-ának megfelelő e. c. teret és azt feltételezve, hogy az i. p. adagolt anyag teljes egészében felszívódik és az e. c. térben oszlik meg, a frakciók anyagainak *in vivo*, e. c. koncentrációja az egyszeri dózist követően 50 μ g/ml-re, az össz-dózis után 200 μ g/ml-re tehető. Megjegyezzük, hogy egyszeri adagolás — még ha az egyszeri dózis többszörösét is alkalmaztuk — hatástalan volt. A biológiai teszt eredményeit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

A D₁, D₂ és D₄ frakciók anyagai, a tüdőlebenyekben a szkrináló tesztek segítségével mérhető radioaktivitás értékeit a kontroll értékeihez viszonyítva



1. ábra. Marhatüdő vizes kivonatából, kapilláris membránszűrővel előzetesen különválasztott, 10 000–100 000 dalton molsúly tartományba eső anyagok DEAE Sephadex A-50 gél oszlopon kapott kromatogramja. A pontozott vonal a sógrádiens, a szaggatott vonal a pH grádiens tünteti fel. A baloldali függőleges tengelyen, a 280 nm-en mért optikai aktivitás, a jobboldali függőleges tengelyen belső oldalán a sókoncentráció, a külső oldalán a pH értékei láthatók. A vízszintes tengelyen a frakciók számát tüntettük fel. A szaggatott vonalakkal határolt D₁–D₄ jelzésekhez tartozó frakciók kerültek biológiai tesztlésre

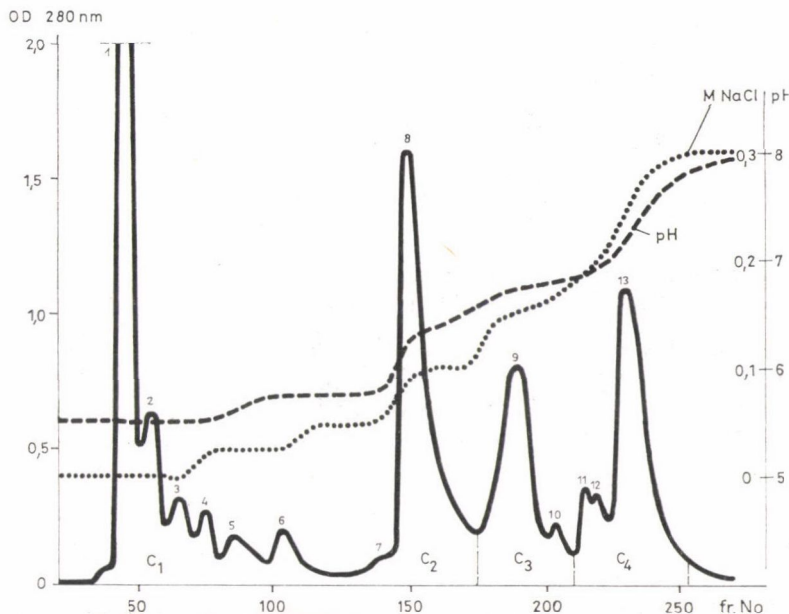
nem befolyásolták. Ezzel szemben, a kb. 0,1–0,2 M sógrádiens, illetve pH 6,5–7,0 pH grádiens alkalmazása mellett, 2 csúcsban eluálható, D₃ frakció anyagival a jelzett timidin beépülésének 35%-os gátlása volt elérhető.

1. táblázat

Tüdőszövet vizes kivonatából DEAE Sephadex A-50 gél kromatográfiával nyert D₁–D₄ frakciók hatása egér tüdőszöveti sejtek in vivo DNS szintézisére (szkrinelő teszt). Az egyes számértékek 20 egyedi mérés átlagát és az SD értékeket tüntetik fel

n = 20

Frakciók	dpm/mg nedves súly	eltérés a kontrolltól %	
Kontroll	114 ± 30,9	—	—
D ₁	96 ± 41,4	–16	p > 0,20
D ₂	93 ± 27,1	–18	p > 0,20
D ₃	75 ± 15,1	–34	p < 0,05
D ₄	92 ± 23,9	–19	p > 0,20



2. ábra. Az 1. ábrán látható, biológiai aktivitást mutató D₃ frakció CM Sephadex G-25 gél oszlopon kapott kromatogramja. A pontozott és a szaggatott vonal, valamint a függőleges és a vízszintes tengelyek jelzései azonosak az 1. ábránál leírtakkal. A szaggatott vonalakkal határolt C₁–C₄ jelzésekhez tartozó frakciók kerültek biológiai tesztlésre

A biológiai teszt eredményei alapján a D₃ frakció CM Sephadex C-25 oszlopon történő továbbtisztítására került sor. Az emelkedő só és pH grádienssel végzett elució során a D₃ frakció (l. 1. ábra) 280 nm-en elnyelést mutató, 13 szubfrakcióra volt bontható (2. ábra). A kromatográfiai csúcsoknak megfelelő anyagok gyűjtése, az ábrán jelzett módon, C₁, C₂, C₃ és C₄ frakciókban történt, melyek biológiai aktivitásának mérését a módszertani fejezetben

2. táblázat

DEAE Sephadex A-50 kromatográfiaival nyert, biológiailag aktív D₃-frakció, CM Sephadex G-25 géلكromatográfiaival kapott C₁–C₄ frakciónak hatása egér tudószöveti sejtek in vivo DNS szintézisére. Az egyes számértékek 12 egyedi mérés átlagát és az SD értékeket tüntetik fel

n = 12

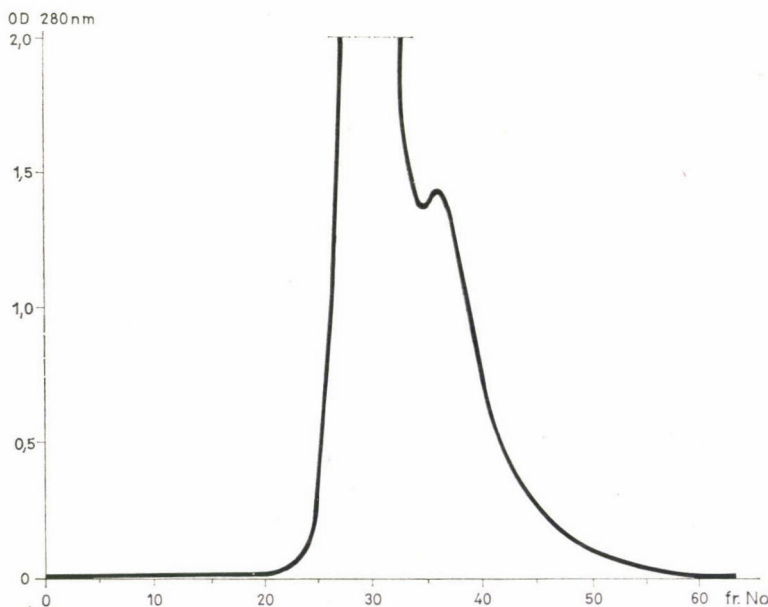
Frakciók	dpm/μg DNS	eltérés a kontrolltól %	
Kontroll	116 ± 62,3	—	—
C ₁	58 ± 33,6	-50	p < 0,05
C ₂	107 ± 51,9	-08	p > 0,50
C ₃	123 ± 71,1	+06	p > 0,50
C ₄	83 ± 62,5	-28	p > 0,05

leírtak szerint végeztük el. A DEAE Sephadex frakciókkal kapcsolatban említett feltételek teljesülése -setén a CM-Sephadex frakciók anyagainak e. c. koncentrációját, az egyedi dózisok alkalmazása után $30 \mu\text{g/ml}$ -re, az össz-dózis után pedig $120 \mu\text{g/ml}$ -re tehetjük. A biológiai tesztelés eredményeit a 2. táblázatban foglaltuk össze.

Az adatok egyértelműen mutatják a C_2 és C_3 frakciók hatástalanságát. A C_4 frakció hatásaként 28%-os gátlás volt mérhető. Mivel azonban ez a gátlás statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak, a C_4 frakció hatását egyelőre bizonytalannak tekintjük. A fentiekkel ellentétben a ^3H -TdR DNS-be történő beépülésének erőteljes (50%) és egyértelmű gátlása volt elérhető a CM Sephadex C-25 oszlopon láthatóan nem kötődő (gyakorlatilag a V_0 -val eluálódó), komponens is tartalmazó, C_1 frakció anyagaival.

A tüdőszövet autoradiográfiai vizsgálata azt mutatta, hogy a jelzett timidin, gyakorlatilag kizárólagosan, az alveolusok felszínét borító sejtek magjaiba épült be. Ezért feltételezhető, hogy a timidin beépülés, szcintillációs módszerrel mérhető gátlását kiváltó C_1 frakció anyagainak hatása is ezekre a sejtekre irányult.

A C_1 frakcióban foglalt anyagok azonos molsúlyaira utal az a tény, hogy a frakció komponensei Sephadex G-75 oszlopon gyakorlatilag nem voltak szétválaszthatók (3. ábra). A két elució csúcsnak megfelelő anyagok,



3. ábra. A CM Sephadex G-25 kromatográfiával nyert, biológiailag aktív C_1 frakció Sephadex G-75 géll oszlopon nyert kromatogramja. A függőleges tengelyen a 280 nm-en mért optikai aktivitás, a vízszintes tengelyen a frakciók száma látható

3. táblázat

A C₁-frakció hatása egerek lépének és veséjének in vivo DNS szintézisére. A számértékek 12 egyedi mérés átlagát és az SD értékeket tüntetik fel

n = 10

szerv	frakció	dpm/ μ g DNS	eltérés a kontrolltól %	
Lép	kontroll	137 \pm 44,2	—	—
	C ₁	124 \pm 42,7	-09	p > 0,20
Vese	kontroll	26 \pm 28,8	—	—
	C ₁	24 \pm 20,7	-08	p > 0,20

4. táblázat

A C₁ és C₄ frakció két—két dózisének hatása timocita és csontvelő tenyészetek DNS szintézisére. A számértékek 10 egyedi mérés átlagát és az SD értékeket tüntetik fel

n = 10

tenyészet	frakció	dózis μ g. fehérje/ml	dpm/ μ g DNS	\pm eltérés a kontrolltól %	p
Timocita	kontroll	—	3471 \pm 363	—	—
	C ₁	100	3799 \pm 159	+09	> 0,50
	C ₁	500	3518 \pm 254	+01	> 0,50
	C ₄	100	3603 \pm 342	+04	> 0,50
	C ₄	500	2992 \pm 186	-14	< 0,05
Csontvelő	kontroll	—	4947 \pm 580	—	—
	C ₁	100	5247 \pm 709	+06	> 0,50
	C ₁	500	4983 \pm 184	+01	> 0,50
	C ₄	100	5239 \pm 458	+06	> 0,50
	C ₄	500	4478 \pm 566	-09	> 0,50

kalibrált Sephadex G-75 oszlopon mért, megközelítő molsúlya 30 000—50 000 D tartományba esik.

Az in vitro körülmények között aktívnak bizonyult C₁ frakció anyagai hatásának szövet- illetve sejtvonal-specifikus természetét, a tüdőben mért hatásoknak az állatok lépére és veséjére gyakorolt in vivo hatásokkal összehasonlítva vizsgáltuk (3. táblázat).

E mérések eredményei szerint a tüdőben erőteljes gátlást kiváltó C₁ frakció anyagai a lép- és a veseszövetben — még a tüdőben hatásos adagot kb. 2-szeresen meghaladó dózis alkalmazása esetén is — hatástalanoknak bizonyultak.

A C₁ frakció anyagai szövet (sejtvonal) specificitását timocita és csontvelő tenyészetekben, in vitro körülmények között is ellenőriztük. Ebbe a tesztelésbe az in vivo bizonytalan hatást mutató C₄ frakciót is bevontuk (4. táblázat).

Mindkét frakciót 100 és 500 μg fehérje/ml medium koncentrációban alkalmaztuk. A C_1 frakció mindkét koncentrációban és mindkét tenyészetben egyaránt hatástalannak bizonyult. A C_4 frakció a kisebb koncentrációban mindkét tenyészetben, a magasabb koncentrációban pedig a csontvelő tenyészetben ugyancsak hatástalan volt. E frakció nagyobb dózisének timocitákban mért 14%-os gátló hatása azonban statisztikailag enyhén szignifikánsnak mutatkozott.

Megbeszélés

A tüdőszövet funkcionálisan és morfológiailag egymástól eltérő sejtekből épül föl. Az alveolusok falát nagyobb részben borító epitél réteg fő sejtípusának, a viszonylag nagyméretű, lapos, ún. 1. típusú alveoláris sejtek tekinthetők, melyek fénymikroszkóposan az alábbi, elektronmikroszkóppal is megerősített morfológiai jegyek alapján azonosíthatók (EVANS és mtsai 1973): a) az alveolusok falának felszínén helyezkednek el; b) sejtmagjuk benyomul az alveolusok ürterébe; c) magjuk méretéhez képest citoplazmájuk kevés; d) nem tartalmaznak vakuolumokat, ill. inklúziós testecskéket. E sejtek fő funkciójának a gázcsere-t tekintik (EVANS és mtsai 1973).

Az alveoláris falfelület kisebb hányadát, az 1. típusú alveoláris sejtek között szétszórtan elhelyezkedő és az alábbi morfológiai tulajdonságokat mutató, ún. 2. típusú alveoláris sejtek borítják (EVANS és mtsai 1973): a) kuboideális alakúak; b) az alveolusok felszínén helyezkednek el; c) az 1. típusú alveoláris sejtekhez képest citoplazmájuk mennyisége nagyobb; d) több vakuolumot és inklúziós testecskét tartalmaznak. Funkciójukat tekintve feltételezik, hogy a szurfaktáns termelésében (SCARPELLI 1968), epitéliás repair folyamatokban (KAPANCI és mtsai 1969) vesznek részt. Egyes adatok szerint az alveoláris makrofágok (BERTALANFFY 1964) és az 1. típusú alveoláris sejtek (EVANS és mtsai 1973) progenitor sejtjeinek tekinthetők. Az 1. és 2. típusú alveoláris sejtek közös alaphártyán helyezkednek el (KARRER 1956, O'HARE és SHERIDAN 1970).

Az alveoláris makrofágok, az alveoláris epitéliumot borító felületaktív anyag, az ún. szurfaktáns vékony, filmszerű rétegében és így tulajdonképpen az alveolusok ürterében elhelyezkedő (NOVELL és THYLER 1971, KUHN és FINKE 1972), nagyméretű, mononukleáris sejtek. Mint a tüdőszövet celluláris védekezésének első vonalát képviselő sejtfeleségek, melyek a terminális légutakba jutó idegen anyagok eltávolításában és méregtelenítésében (GREEN 1970, HARRIS és mtsai 1970, SOROKIN 1970, COHEN és CLINE 1971) vesznek részt, kulcsfontosságú szerepet töltenek be a tüdőszövet ökológiájában.

Az epitéliás sejtek, ill. ezek alaphártyája alatt találhatóak a kapillárisok, ill. az azokat felépítő sejtfeleségek, valamint az elszórtan elhelyezkedő intersticiális sejtek (RYAN és mtsai 1969, WEIBEL 1970), a fibrociták is.

A fent ismertetett sejttípusok megújulását biztosító mechanizmusokra vonatkozó ismereteink meglehetősen bizonytalanok. Egyes adatok szerint az 1. és 2. típusú alveoláris sejtek osztódásra képesek. Az 1. típusú alveoláris sejtek expandáló sejtpopulációt képeznek (BERTALANFFY 1964), amelyben a sejtek proliferációját a szövet növekedése kíséri. A 2. típusú alveoláris sejteket viszont összejt-típusú, megújuló sejtpopulációnak tekintik (EVANS és BILS 1969), melyben a sejtek száma az összejt kompartmentben az osztódás ellenére sem változik, mivel a keletkező két leánysejt egyike, képződésének helyét elhagyva, más sejtféleséggé (LEBLOND 1964), pl. 1. típusú alveoláris sejtté (EVANS és mtsai 1973) vagy makrofággá (BERTALANFFY 1964) alakul át. Minden jel arra mutat, hogy a 2. típusú alveoláris sejt proliferációs képessége jelentősen meghaladja az 1. típusú alveoláris sejt proliferációs képességét (EVANS és mtsai 1973).

Az alveoláris makrofágok folyamatosan újulnak meg (BRUNSTETTER és mtsai 1971). Eltávolításuk lehetséges útjaiként a vér (BRAIN 1970) és a nyirok-keringésbe (MENZEL 1971) történő migrációjuk, más makrofágok által történő fagocitózisuk (HEPPLESTON 1970) és a mukociliáris transzport (GREEN 1970 b) említhetők. Eredetükre nézve is eltérőek a vélemények. Egyesek szerint csontvelő eredetű összejtek, melyek migráció útján jutnak az intersticiumba, s innen az alveolusokba (BRUNSTETTER és mtsai 1971). Mások szerint az intersticiumban osztódó prekursor sejtekből származnak (EVANS és BILS 1969). Olyan adatok is ismeretesek, melyek szerint az érett alveoláris makrofágok osztódásra képesek és proliferációjuk révén történik a sejtpopuláció megújulása (EVANS és mtsai 1973, GOLDE és Byers 1974). Végül, mint már említettük, a 2. típusú alveoláris sejtek makrofágokká történő átalakulása is feltételezhető (BERTALANFFY 1963).

Ugyancsak korlátozottak és bizonytalanok ismereteink a tüdőszövetet fölépítő sejtek proliferációját molekuláris szinten szabályozó mediátorokról és modulátorokról. Az emlős szervezetek különféle szöveteit fölépítő expandáló és megújuló sejtpopulációk, egymástól akár nagyságrendekkel is különböző proliferációs rátája (BERTALANFFY 1969), vagy az indukált DNS szintézisnek és az azt követő proliferációnak az a sajátossága, hogy elektíven csak a szóban forgó sejtpopulációhoz tartozó sejtekre szorítkozik (SPIELHOF 1971), arra utalnak, hogy a szöveti proliferáció szabályozása — legalábbis részben — a szöveteket fölépítő sejtekre nézve szelektív, azaz sejtvonal-specifikus természetű. Ebből következik, hogy a szöveti proliferáció szabályozásában sejtvonal-specifikusan ható mediátor vagy modulátor molekuláknak, vagy legalábbis olyanoknak kell részt venniük, melyek sejtvonal-specifikus szabályozási folyamatokat indukálnak. E regulátor molekulák sejtvonal-specifikus hatását, köztük és az elektíven reagáló sejtféleségek között föllépő speciális kémiai struktúrák (receptorok) által meghatározott kölcsönhatások biztosíthatják (VORHEES és mtsai 1973, VERLY és mtsai 1974).

Egy adott sejtpopuláció proliferációját specifikusan (szelektíven) szabályozó anyagféleség, különböző sejtpopulációkat tartalmazó szövetekből történő izolálása technikailag nehéz feladat. Elvileg két út követése között választhatunk: a) a többféle sejtpopulációt tartalmazó szövetből fizikai (ultracentrifuga, cell-sorter) vagy biológiai (sejttenyésztés) módszerek segítségével állítjuk elő a kívánt sejtféleség tiszta, homogén populációját, s ezt használjuk föl a szóban forgó sejtek proliferációját specifikusan szabályozó endogén anyagok extrakciójára és izolálására; b) a heterogén sejtpopulációkból felépülő eredeti szövetet extraháljuk. A sejtes eredet szerint, valamint a kémiai is heterogén összetételű kivonathoz azután, az egyetlen sejtpopulációból származó és hatását kizárólag erre a sejtpopulációra kifejtő specifikus faktor izolálását kémiai úton végezzük el, miközben a biológiai hatást célzottan kiválasztott teszt-rendszereken ellenőrizzük.

Főnt ismertetett vizsgálatainkban az utóbb említett utat követtük. Miután a heterogén kivonat a 10^5 -nél nagyobb, ill. a 10^4 -nél kisebb molsúlyú anyagait ultraszűréssel eltávolítottuk, a biológiai aktivitás a DEAE Sephadex A-50 oszlopon pH 7—6 grádienssel és 0,1—0,2 M sógrádiensnél két csúcsban eluálódott D_3 frakcióban volt lokalizálható. A D_3 frakciót CM Sephadex C-25 oszlopon tovább bontottuk 13 komponensre, és ekkor a biológiai aktivitás hordozója több, köztük az oszlopon nem kötődő komponens is tartalmazó, C_1 frakció anyagai között helyezkedett el.

Hangsúlyozzuk, hogy ezekben a vizsgálatokban minden, eddig az irodalomban közlésre került tüdőszövetre vonatkozó kísérlettel szemben, a biológiai hatás mérése *in vivo* körülmények között történt. Az *in vivo* biológiai tesztelés kétségtelen hátrányai (viszonylag nagy anyagszükséglet, az értékek nagyobb szórása stb.) mellett az alábbi előnyökkel rendelkezik: a) módot ad az anyag *in vivo* hatékonyságának közvetlen megítélésére; b) az anyag ugyanazon állat több szövetére gyakorolt *in vivo* hatásának szimultán mérése által lehetővé válik a hatás szövetspecifitásának egyidejű megítélése; c) elkerülhető a mindig mesterséges környezetet jelentő *in vitro* rendszerek — a biológiai hatást esetleg meghamisító vagy semlegesítő — inherens bizonytalansági tényezőinek érvényesülése; d) megbízhatóbb lehetőséget biztosít a valódi inhibitor és a toxikus hatások — *in vitro* rendszerekben, olykor megoldhatatlan nehézségekbe ütköző — elkülönítésére.

Kísérleteinkben az aktív anyag hatásának sejtvonal-specifikus természetét több oldalról is valószínűsítettük. Autoradiográfiai méréseink szerint DNS szintézis — jelentéktelen kivételektől eltekintve — számottevő mértékben, csak az alveolusok felszínén elhelyezkedő sejtekben volt észlelhető. Mivel a különböző sejtek biztonságos megkülönböztetését lehetővé tevő hisztológiai eljárásokat kísérleteink során nem alkalmaztuk, az alveolusok felszínén DNS szintézist folytató sejtekként az 1. és 2. típusú alveoláris sejtek, valamint a makrofágok jöhetnek számításba. A makrofágokra irányuló hatást azzal zárhat-

jük ki, hogy a hatékony frakció makrofágokat ugyancsak bőségesen tartalmazó lépszövetben *in vivo*, csontvelő tenyészetben pedig *in vitro* körülmények között hatástalannak bizonyult. Ezek után az aktív anyag hatásának lehetséges célsejtjeiként csak az 1. és 2. típusú alveoláris sejtek maradnak. Irodalmi adatok szerint az 1. típusú alveoláris sejtek osztódási és ennek alapján DNS szintézisének rátája a 2. típusú alveoláris sejtektől jelentősen elmarad (EVANS és mtsai 1973). Ezért nagy valószínűséggel állítható, hogy az észlelt hatás elsősorban a DNS-t magasabb rátával szintetizáló 2. típusú alveoláris sejtekre irányul. Az anyag hatásának sejtvonal-specifikus természetét az ismertetett *in vitro* mérések is megerősítették. Mindezek alapján jogosnak tűnik az a feltételezés, hogy a tüdőszövet 10^4 — 10^5 molsúly tartományba eső anyagokat tartalmazó vizes kivonatóból részlegesen tisztított fehérje frakció egy (vagy több) olyan faktort tartalmaz, melynek *in vivo* DNS szintézist gátló hatása a tüdőre nézve szövetspecifikus, a 2. típusú alveoláris sejtekre nézve pedig sejtvonal-specifikus természetű. A gátlás aspecifikus, toxikus eredete, egyrészt az *in vivo* hatás szövetspecifitása, másrészt az anyag nagy dózisének *in vitro* körülmények között kimutatott hatástalansága alapján kizárható.

A C_1 frakció biológiailag hatékony komponensének fehérje természetét az alábbi megfigyelések támasztják alá: a) a frakció 3 — 5×10^4 D molsúlyú, tehát a fehérjék nagyságrendjébe tartozó komponenseket tartalmaz; b) a frakció túlnyomó részben Folin pozitív anyagokból épül fel; c) ha a frakciót 24 órán át szobahőmérsékleten tartjuk, a biológiai hatás megsemmisíthető.

Az ismertetett kísérleti eredmények és a részlegesen tisztított biológiailag aktív anyag tulajdonságaira vonatkozó megfigyelések alapján feltételezzük, hogy a C_1 frakció hatásos anyagát 3 — 5×10^4 tartományba eső molsúllyal rendelkező, fehérje természetű, fiziológias szabályozási funkciót ellátó, természetes (endogén) gátló faktor képezi. Az aktív anyag több jellemzője (molsúly-tartomány, szövetspecifikus hatás stb.) arra utal, hogy kísérleteinkben ugyanannak az anyagnak a részleges tisztítására került sor, amely HOUCK (1976) által tüdőszövetből preparált acetonszáraz por vizes kivonata ultraszűrletében is jelen volt, és amely bronchus carcinoma-sejtek *in vitro* tenyészetének DNS szintézisét és proliferációját sejtvonal-specifikus módon gátolta. A biológiailag aktív frakció anyagainak további tisztítására, anyagi természetének közelebbi jellemzésére, biológiai hatásának részletesebb elemzésére irányuló vizsgálatok laboratóriumunkban folyamatban vannak.

Köszönetnyilvánítás: Balázs professzornak a timocita és csontvelő sejttenyészeteken végzett tesztléseikért, Kopetty Diánának kifogástalan asszisztensi munkájáért hálás köszönetünket fejezzük ki.

IRODALOM

- ATTALLAH, A. M., HOUCK, J. C.: Lymphocyte chalones. *Chalones* (ed. by J. C. Houck) pp. 355 North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).
- BALÁZS, A.: Control of cell proliferation by endogenous inhibitors p. 179. Elsevier/North Holland Publishing Co., Amsterdam, New York, Oxford (1979).
- BERTALANFFY, F. D.: Respiratory tissue: structure, histophysiology, cytodynamics. II. New approach and interpretation. *Int. Rev. Cytol.* **17**, 213—297 (1964).
- BERTALANFFY, F. D.: Normal and malignant growth (ed. by R. J. Frey, M. L. Griem, W. M. Kirsten) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1969).
- BISMARCK, B., LOZZIO, C. B., BAMBERY, E. G., LAIR, S. V.: Regulators of cell division: Endogenous inhibitors of mammalian cells. *Rev. Cytol.* **42**, 1—47 (1975).
- BOWEN, T. J.: An introduction to ultracentrifugation. pp. 72—81 Wiley-Interscience Publishing Co., London (1970).
- BRAIN, J. D.: Free cells in the lungs. *Archs. intern. Med.* **126**, 477—487 (1970).
- BRUNSTETTER, M., HARDIE, J. A., SCHIFF, R., LEWIS, J. P., CROSS, C. E.: The origin of pulmonary alveolar macrophages. *Archs. intern. Med.* **127**, 1064—1068 (1971).
- BULLOUGH, W. S.: The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. *Biol. Rev.* **37**, 307—342 (1962).
- BULLOUGH, W. S.: Mitotic control in adult mammalian tissues. *Biol. Rev.* **50**, 99—130 (1975).
- BURTON, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* **62**, 315—323 (1956).
- COHEN, A. B., CLINE, M. J.: The human alveolar macrophage isolation, cultivation in vitro, and studies of morphologic and functional characteristics. *J. Clin. Invest.* **50**, 1390—1398 (1971).
- ELGJO, K.: Epidermal chalones. Cell cycle specificity of two epidermal growth inhibitors. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* **38**, 71—76 (1973).
- EVANS, M. J., BILS, R. F.: Identification of cells labeled with tritiated thymidine in the pulmonary alveolar walls of the mouse. *Am. Rev. Resp. Dis.* **100**, 372—378 (1969).
- EVANS, M. J., CABRAL, L. J., STEPHANS, R. J., FREEMAN, G.: Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂. *Amm. J. Pathol.* **70**, 175—198 (1973).
- GOLDE, D. W., BYERA, L. A.: Proliferative capacity of human alveolar macrophage. *Nature*, **247**, 373—375 (1974).
- GOSPODAROWICZ, D., MORAN, J. S.: Growth factors in mammalian cell culture. *Ann. Rev. Biochem.* **45**, 531—558 (1976).
- GREEN, G. M.: The J. Burus Amberson lecture — in defense of the lung. *Am. Rev. Resp. Dis.* **102**, 691—703 (1970a).
- GREEN, G. M.: Alveolar macrophage transport in the early postexposure period — a new pathway? *Clin. Res.* **18**, 484—492 (1970b).
- HARRIS, J. O., SWENSON, E. W., JOHNSON, J. E.: Human alveolar macrophages: comparison of phagocytic ability, glucose utilization and ultrastructure in smokers and nonsmokers. *J. Clin. Invest.* **49**, 2086—2096 (1970).
- HEPPLESTON, A. G.: The disposal of inhaled particulate matter: a unifying hypothesis. *Am. J. Path.* **42**, 119—135 (1970).
- HIESTAND, P. C., BOREL, J. F., BAUER, W., KIS, Z. L., MAGNÉE, C., STÄHELIN, H.: The effects of fractions (chalones) obtained from lymphoid organs on lymphocyte proliferation in vitro. *Agents and Actions* **7**, 327—335 (1977).
- HONDIUS-BOLDINGH, W., LAURENCE, E. B.: Extraction, purification and preliminary characterization of the epidermal chalones: a tissue specific mitotic inhibitor obtained from vertebrate skin. *Europ. J. Biochem.* **5**, 191—198 (1968).
- HOUCK, J. C.: Putative bronchial chalones. pp. 395. *Chalones* (ed. by J. C. Houck) North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).
- HOUCK, J. C.: Lymphocyte chalones. *J. Reticuloendothel. Soc.* **24**, 571—581 (1979).
- IVERSEN, O. H.: The history of chalones. *Chalones*, p. 37 (ed. by J. C. Houck) North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).
- KAPANCI, Y., WEIBEL, E. R., KAPLAN, H. P., ROBINSON, F. R.: Pathogenesis and reversibility of the pulmonary lesions of oxygen toxicity in monkeys. II. Ultrastructural and morphometric studies. *Lab. Invest.* **20**, 101—118 (1969).
- KARRER, H. E.: The ultrastructure of the mouse lung: general architecture of capillary and alveolar walls. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 241—252 (1956).
- KUHN, C., FINKE, E. H.: The topography of the pulmonary alveolus: Scanning electron microscopy using different fixations. *J. Ultrastruct. Res.* **58**, 161—173 (1972).
- LEBLOND, C. P.: Classification of cell population on the basis of their proliferative behavior.

- International symposium on the control of cell division and the induction of cancer. Natl. Cancer Inst. Monogr. **14**, 119—150 (1964).
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.: Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275 (1951).
- MARKS, F.: Attempts to purify and characterize a factor inhibiting epidermal DNA synthesis (G₁ chalone) Hoppe-Seylers. *Z. Physiol. Chem.* **355**, 1228—1233 (1974).
- MAURER, H. R., HENRY, R., MASCHLER, R.: Chalone inhibition of granulocyte colony growth in agar: kinetic quantitation by capillary tube scanning. *Cell Tissue Kinet.* **11**, 129—138 (1978).
- MENZEL, D. B.: Alveolar macrophage. *Archs. intern. Med.* **127**, 1044—1045 (1971).
- NOWELL, J. H., TYLER, W. S.: Scanning electron microscopy of the surface morphology of mammalian lungs. *Am. Rev. Resp. Dis.* **103**, 313—328 (1971).
- O'HARE, K. H., SHERIDAN, M. N.: Electron microscopic observation of the morphogenesis in the albino rat lung, with special reference to pulmonary epithelial cells. *Am. J. Anat.* **127**, 181—205 (1975).
- PAUKOVITS, W. R., HINTERBERGER, W.: Molecular weight and some chemical properties of granulocytic chalone. *Blut* **37**, 7—18 (1978).
- PAUKOVITS, W. R., HINTERBERGER, W., PAUKOVITS, J. B.: The granulocytic chalone — a specific inhibitor of granulopoiesis: molecular weight and chemical nature. *Oncology* **34**, 187—189 (1977).
- RUDLAND, P. S., DE ASUA, L. J.: Action of growth factors in the cell cycle. *Biochim. Biophys. Acta* **560**, 91—133 (1979).
- RYAN, S. F., CIANELLA, A., DUNAIS, C.: The structure of the interalveolar septum of the mammalian lung. *Anat. Rec.* **165**, 467—484 (1969).
- RYTÖMAA, T.: Biology of the granulocyte chalone. *Chalones* (ed. by J. C. Houck) pp. 289. North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).
- RYTÖMAA, T., TOIVONEN, H.: Chalones: concepts and results. *Mech. Ageing. Dev.* **9**, 471—480 (1979).
- RYTÖMAA, T., VILPO, J. A., LEVANTO, A., JONES, W. A.: Effect of granulocytic chalone on acute and chronic granulocytic leukaemia in man. Report of seven cases. *Scand. J. Haematol. Suppl. N° 27*, 5—28 (1976).
- RYTÖMAA, T., VILPO, J. A., LEVANTO, A., JONES, W. A.: Effect of granulocytic chalone on acute myeloid leukaemia in man. A follow-up study. *The Lancet* 771—774 (1977).
- SCARPELLI, E. M.: The surfactant system of the lung. Philadelphia, Lea and Febeger (1968).
- SIMNETT, J., FISHER, J., HEPPLESTON, A.: Tissue-specific inhibition of lung alveolar cell mitosis in organ culture. *Nature*, **223**, 944—946 (1969).
- SOROKIN, S. P.: Properties of alveolar cells and tissues that strengthen alveolar defenses. *Archs. intern. Med.* **126**, 450—463 (1970).
- SPIELHOF, R.: The specificity of the regulation of organ growth: the effect of tissue extracts on the incorporation of tritiated thymidine in liver and kidney. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **138**, 43—48 (1971).
- THORNLEY, A. L., LAURENCE, E. B.: The present state of biochemical research on chalones. *Int. J. Biochem.* **6**, 313—320 (1975).
- VERLY, W. G., DESCHAMPS, Y., PUSHPATHADAM, J., DESROSIERS, M.: The hepatic chalone I. Assay method for the hormone and purification of the rabbit liver chalone. *Can. J. Biochem.* **49**, 1376—1383 (1974).
- VORHEES, J. J., DUELL, E. A., BASS, L. J., HARRELL, E. R.: Role of cyclic AMP in the control of epidermal cell growth and differentiation. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* **38**, 47—59 (1973).
- WEIBEL, E. R.: Airways and respiratory surface of the lung. *Internat. Acad. Pathol. Monogr.* **8** (ed. by A. A. Liebow, D. E. Smith). pp. 1—18. The Williams and Wilkins Publishing Co., Baltimore (1970).