

AZ ENDOTÉL SEJT CITOPLAZMA MEMBRÁNJA

CSONKA ÉVA

SOTE II. Kórbonctani Intézet, Budapest

Az elméleti membránkutatáson kívül, melyet biológiai vagy mesterséges membránok felhasználásával végeznek, a biológiai kutatások számos egyéb szakterületén is felmerülnek sejtmembránnal kapcsolatos problémák.

Az intézetünkben is folyó arterioszklerózis-kutatás sok ilyen jellegű kérdést vet fel. Különösen a sejtmembrán permeabilitását befolyásoló tényezőknek tulajdonítanak nagy jelentőséget az arterioszklerózis kialakulásában.

Az érfalat alkotó sejtféleségek közül a betegség kezdeti fázisának kialakulásában legnagyobb szerepe talán az érfal belső oldalát borító endotél sejteknek van. A véráramból származó különféle anyagok, melyek az érfalat károsíthatják, elsősorban az endotél sejtet érintik, ill. többek között azok membránjának permeabilitása teszi lehetővé azok továbbjutását, ill. lerakódását, az érfalban.

A sejtmembránt befolyásoló tényezők közvetlen vizsgálata *in vivo* szövetekben eléggé nehézkes. Az ilyen jellegű kísérletek céljaira általában szívesen alkalmaznak szövetkultúrákat. Mivel a különböző sejtféleségeknek különböző funkciói lehetnek, azért célszerűnek látszott az ilyen kísérletek céljaira az érfal vizsgálni kívánt sejttípusait *in vitro* körülmények között tenyészteni. Mi disznó-aortából származó endotél sejttenyészetet alakítottunk ki. A sejteket fény (1. ábra) és elektronmikroszkópos módszerrel (2. ábra) identifikáltuk, hogy valóban endotél típusú tenyészetről van szó.

A továbbiakban az arterioszklerózis kialakulásánál szerepet játszó szám-talan komponens közül a koleszterin és lizolecitin hatását vizsgáltuk a tenyésztett endotél sejteken, egyelőre főként morfológiai módszerekkel. Mindkét vizsgált anyag a sejtmembránnal kapcsolatban fejti ki hatását.

A koleszterin esetében ismeretes *in vivo* kísérletekből a koleszterinnel etetett állatok endotél sejteinek károsodása. A koleszterin közismerten lényeges komponense a sejtmembránnak és befolyásolja annak permeabilitását, ennek dacára magának a folyamatnak mechanizmusa még nem tisztázott. Sok membránstruktúrára vonatkozó vizsgálat létezik, ill. hogy hogyan lehet azt befolyásolni különböző anyagokkal, azonban magát a permeabilitást nem lehet csak a membránstruktúrával meghatározni. [13] Úgy tűnik, hogy a szterolok komplexeket képeznek a foszfolipidekkel és valószínűleg ennek követ-

keztében a koleszterin a foszfolipid membránok permeabilitását csökkenti bizonyos anyagokkal szemben (víz, glukóz, glicerol stb.) [1, 2, 4] RAZIN [11] mycoplasma membránon mint modellen vizsgálta, hogy a sejt hogyan kontrollálja a membránjában felhalmozódó koleszterin-mennyiséget. Szerinte a mycoplasma esetében a membránba épülő koleszterin mennyiséget a membrán foszfolipid- és összlipidtartalma szabja meg. Mások vizsgálatai szerint [5, 7] a koleszterin jobban reagál zsírsavakat tartalmazó foszfolipid molekulákkal és bizonyos foszfolipid rétegekre kondenzáló hatása van. Az a vélemény alakult ki, hogy a koleszterin mintegy sűríti, merevíti a membránt. A membrán fluiditás koleszterin hatására csökken a membrán külső részén. A koleszterin ezt az ún. membránzáró tulajdonságát a rigid, hosszanti orientációjának köszönheti, ahogy beépül a lipid bilayer elemei közé, kombinálva a kereszt orientációjú OH csoportjával [1].

A lizolecitin esetében, majmokon végzett in vivo kísérletekből ismeretes, hogy a mesterségesen előidézett arterioszklerózis kapcsán az aorta intima és media lizolecitin tartalma rendkívüli mértékben megemelkedik [8, 9]. A lizolecitin különben a különböző membránokkal képes kölcsönhatásba lépni, ill. azokat károsítani [6]. Ennek a folyamatnak azonban ismeretlen a pontos mechanizmusa. Több adat szerint is a sejtmembrán lipidjei a lizolecitin jelenlétében inkább micelláris, mint lamelláris elrendeződést mutatnak [3]. Ez a strukturális konfiguráció is befolyásolhatja a membrán viselkedését különböző anyagokkal szemben.

Hogy az aterogenezis során miért emelkedik meg az érfal lizolecitin tartalma, pontosan nem tisztázott, azonban megállapítható volt, hogy az egészséges állatok plazmájában található lizolecitin főleg albuminhoz kötve volt jelen, míg a beteg állatoknál a lizolecitin mennyiségének több mint a fele az alacsony denzitású lipoproteinekhez kötődött, aminek következtében könnyebben bejuthat az érfalba [9]. A teljes szervezet lizolecitin produkciója azonban csak kis mértékben plazma eredetű, többségében a sejtek foszfolipáz-A aktivitásának következménye. Azonban minden szövetnek, ill. sejtnak van acetil-transzferáz aktivitása is, mely a keletkezett lizolecitint ismét lecitinné alakítja. Elképzelhető, hogy az arterioszklerotikus elváltozások következtében a sejtek erre irányuló regulációs mechanizmusa másképpen működik és ennek következtében a lizolecitin nem alakul át lecitinné, hanem felhalmozódik.

Kísérleteink szempontjából érdekessége van RAND [10] közleményének, mely szerint a lizolecitin és koleszterin equimoláris arányban keverve stabil komplexet képez. Ez a kölcsönhatás redukálja a lizolecitin membrán litikus hatását és eltér a koleszterinnek egyéb foszfolipidekkel történő reakciójától is. A lizolecitinnel történő komplex képzés esetében stabilizálja a membrán lamelláris szerkezetét.

A magunk kísérleteiben a koleszterin és lizolecitin hatását scanning elektronmikroszkópos metodikával vizsgáltuk, mivel ezzel a módszerrel a sejt

felszínén történő változások szerencsés esetben észlelhetők. Az *in vitro* tenyésztett kezeletlen endotél sejtek scanning elektronmikroszkópos felvételein jól lehet látni az endotél sejtekre jellemző, egymáshoz szorosan illeszkedő sokszögletű sejteket. A sejtek citoplazmája vakuolizált, nagyobb nagyításban úgy tűnik, hogy a kis nagyításon látható vakuolák egy szövevényes felszíni struktúra nyílásai (3. ábra).

A koleszterint dimetilformamidban oldva, majd ebből a törzsoldatból megfelelő hígításban, tápfolyadékban szuszpendálva adtuk a sejtekhez és 24 óráig tartó inkubáció után vizsgáltuk scanning elektronmikroszkópos módszerrel. A koleszterint 10^{-4}M – 10^{-12}M sorozat hígításban adtuk a sejtekhez. Azt tapasztaltuk, hogy a 10^{-4}M hígítás esetében a sejthatárok nem voltak felismerhetők és ezen az összefüggő sejtanyagon nagyon kis nyílásokból álló csoportokat találtunk, melyek közepén nagy nagyításban az eredeti sejtfelszín struktúráját lehetett felismerni. A koleszterin mennyiségének csökkenésével a vakuolizáció arányosan csökkent, de még nagy hígításban is volt némi eltérés a kontrollhoz képest (4. ábra). Mivel alacsonyabb nagyításban a kezeletlen kontrollsejtek felszínén is találtunk vakuolákat, összehasonlítottuk a kontroll és a koleszterinnel kezelt sejtek nagy nagyítású felvételeit (5. ábra), és ezek szerint a különbség nyilvánvaló.

Minden morfológiai észlelésnél felmerül a gondolat, hogy a kapott kép nem valami műtermék következménye-e. Az alkalmazott koleszterinhígítások nem voltak toxikusak a szövettényészet sejtjeire, és a sejtek festés nélkül látszólag megtartották formájukat. A megfestett sejtpreparátumokon azonban találtunk elváltozásokat, melyek igazolhatják a scanning elektronmikroszkópos felvételeken is talált felszíni eltéréseket (6. ábra).

Összehasonlításként egyéb sejttényészetek sejtjeit is vizsgáltuk koleszterinkezelés után, azonban ezeknél nem találtunk olyan nagyfokú elváltozást mint az endotél sejtek esetében (7. ábra). Ez megfelel ROTHBLAT [12] közlésének, aki hepatoma sejtekben hyperlipémiás savó hozzáadása után citoplazma vakuolizációt figyelt meg, melyek koleszterin észter tartalmúnak bizonyultak, azonban azt is megállapította, hogy nem minden sejt típus akkumulálta ilyen formán a koleszterint.

Hasonló megfontolások alapján vékonyréteg-kromatográfiával megvizsgáltuk a laboratóriumunkban fenntartott sejt kultúrák koleszterintartalmát (8. ábra). A különböző sejt típusok eltérő mennyiségben tartalmaztak koleszterint, különösen feltűnő volt az endotél sejtek alacsony koleszterintartalma. Ha a sejtek koleszterintartalmát, koleszterin hozzáadása után vizsgáltuk, az lényegesen nem változott, kivéve az endotél sejteket, melyek felvették a hozzáadott koleszterin mennyiséget. Ez a jelenség talán éppen a különböző sejtfeleségek membránjának eltérő komponenseire utal, hogy hogyan képesek felvenni, ill. beépíteni az exogén koleszterint.

A lizolecitin hatásának vizsgálatára a sejteket 10^{-4} M lizolecitinnel kezeltük. Találtunk ugyan elváltozást a kontrollhoz képest, de nem olyan nagy mértékben, mint a koleszterin hatására. Ha a lizolecitin kezelés után a sejteket még külön 10^{-4} M koleszterinnel is kezeltük, maximális elváltozást kaptunk (9. ábra). Ha azonban a 10^{-4} M lizolecitint és 10^{-4} M koleszterint egyszerre adtuk a sejtekhez a tápfolyadékban, akkor az eltérés a kontrollhoz képest igen csekély volt. Ez a jelenség megfelel a bevezetésben említett irodalmi adatnak, mely szerint az equimolárisan alkalmazott lizolecitin és koleszterin kölcsönhatásaként stabil komplex képződik [10]. Ennek következtében a lizolecitin litikus hatása eliminálódik és valószínűleg a lizolecitinnel reakcióba lépett koleszterin is másképpen fejti ki hatását. A koleszterin hajlamos a foszfolipidekkel komplexet képezni, elképzelhető, hogy az önállóan sejthez adott koleszterin az endotél sejtmembrán bizonyos foszfolipidjeivel lép reakcióba, és ennek következtében észleljük a felszíni változásokat.

A szövettényészetben kapott elváltozások értékelésénél azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a szervezetben ugyanezen sejtek funkcióját még számtalan egyéb faktor is befolyásolja. Az *in vitro* tenyésztett sejtek esetében csak bizonyos részfunkciókat vizsgálhatunk és azok eredményeit csak megfelelő kritikával adaptálhatjuk az *in vivo* történő folyamatokra. Jelen esetben a koleszterin és lizolecitin két kiragadott komponens, amely a sejtmembránra gyakorolt hatásánál fogva permeabilitás változást idézhet elő és ennek következtében az arterioszklerózis kialakulásában szereplő számtalan faktor egyike lehet.

A tihanyi Membrán Konferencián elhangzott előadás utáni vitában felmerült a vizsgálatainkban szereplő koleszterin oldószerének, a dimetilformamidnak (DMF) membrán károsító hatása és amely anyag 10^{-3} – 10^{-11} közötti koncentrációkban szerepelt kísérleteinkben. Ennek kontrollálására utólag elvégzett vizsgálataink azt mutatták, hogy a DMF csak 10^{-3} koncentrációban okozott némi elváltozást a sejtek felszínén, nagyobb hígításokban nem. Így a továbbiakban az általunk alkalmazott koleszterin hígítások közül, csak a legtöményebb 10^{-4} M hígítású koleszterinhatást nem lehet teljes értékűnek venni, mert ebben az esetben az oldószerként alkalmazott DMF 10^{-3} hígításban van jelen.

IRODALOM

1. H. BROCKERHOFF: Model of interaction of polar lipids, cholesterol, and proteins in biological membranes. *Lipids* **9**, 645–650 (1974).
2. J. J. CHILD, G. DÉFAGO, R. H. HASKINS: The effect of cholesterol and polyene antibiotics on the permeability of the protoplasmic membrane of *Pythium* PRL 21421. *Canad. J. Microbiol.* **15**, 599–603 (1969).
3. C. M. CROCE, W. SAWICKI, D. KRITCHEVSKY, H. KOPROWSKI: Induction of homokaryocyte, heterokaryocyte and hibrid formation by lysolecithin. *Exp. Cell. Res.* **67**, 427–435 (1971).
4. A., A. FINKELSTEIN, CASS: Effect of cholesterol on the water permeability of thin lipid membranes. *Nature* **216**, 717–718 (1967).
5. J. de GIER, J. G. MANDERSLOOT, L. L. M. van DEENEN: The role of cholesterol in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **173**, 143–145 (1969).
6. W. E. KLOPFENSTEIN, B. de KRUYFF, A. J. VERKLEIJ, R. A. DEMEL, L. L. M. van DEENEN: Differential scanning calorimetry on mixtures of lecithin, lysolecithin and cholesterol. *Chem. and Physics of Lipids* **13**, 215–222 (1974).

7. J. A. LUCY: Functional and structural aspects of biological membranes: A suggested role for Vitamin E in the control of membrane permeability and stability. *Annal. N. Y. Acad. Sci.* **203**, 4—11 (1972).
8. O. W. PORTMAN, D. R. ILLINGWORTH: Lysolecithin binding to human and squirell monkey plasma and tissue components. *Biochim. Biophys. Acta* **326**, 34—42 (1973).
9. O. W. PORTMAN, D. R. ILLINGWORTH: Metabolism of lysolecithin in vivo and in vitro with particular emphasis on the arterial wall. *Bioch. Biophys. Acta* **348**, 136—144 (1974).
10. R. P. RAND, W. A. PANGBORN, A. D. PURDON, D. O. TINKER: Lysolecithin and cholesterol interact stoichiometrically forming bimolecular lamellar structure in the presence of excess water, or lysolecithin or cholesterol. *Canad. J. Biochem.* **53**, 189—195 (1975).
11. S. RAZIN: Correlation of cholesterol to phospholipid content in membranes of growing *Mycoplasmas*. *FEBS letters* **47**, 81—85 (1974).
12. G. H. ROTHBLAT: Cholesteryl ester metabolism in tissue culture cells. I. Accumulation in Fu5AH rat hepatoma cells. *Lipids* **9**, 526—535 (1974).
13. G. SZABÓ: Dual mechanism for the action of cholesterol on membrane permeability. *Nature* **252**, 47—49 (1974).