

AZ EMLŐS-SEJTEK IN VITRO TENYÉSZTÉSÉNEK PROBLÉMÁI

KOCH SÁNDOR

Semmelweis Orvostudományi Egyetem II. sz. Kórbonctani Intézet,
Budapest

A sejt az élet elemi egysége, az a legegyszerűbb biológiai rendszer (organizmus), amely képes környezetétől szerkezetileg elkülönülve, de azzal állandó, szoros kölcsönhatásban saját specifikus szerkezetét fenntartani és identikusan reprodukálni [16]. A sejt lehet maga az organizmus (egysejtű), vagy lehet összetett szervezetet (többsejtű) alkotó sejtpopuláció egyik tagja.

Ha egy egysejtű természetes környezetét mesterségesen reprodukálni tudjuk, módunk van arra, hogy a kérdéses egysejtű egyetlen egyedéből kiindulva annak genotípusosan és fenotípusosan homogén in vitro tenyésztését állítsuk elő. Megfelelő feltételek biztosítása esetén az ilyen tenyészetek elvben vég nélkül fenntarthatók és szaporíthatók. A tenyészet „halhatatlan”. Tudjuk persze, hogy csakis a populáció halhatatlan, az egyes egyedek egyéni léte osztódásukkor megszűnik. A fenomenologikus állandóság háttérben az egyedek szakadatlan változása (keletkezés, fejlődés, pusztulás) áll.

A populáció növekedésének kinetikája optimális környezeti feltételek mellett az egyes egyedek „biológiai órájának” járásától függ. Ez határozza meg az egyedek létének időbeli lefolyását. Ha ilyen esetben sejtvészteség nincs, a populáció növekedése exponenciális [10]. A növekedés exponenciális jellege ilyen feltételek mellett mindaddig fennáll, amíg legalább egy sejt (és utódai) rendszeres osztódása folyik. A populáció növekedése csak akkor lehet zérus, ha vagy egyáltalán nincs osztódás (stacioner állapot), vagy ha az osztódó (kettőződő) és pusztuló sejtek száma egyenlő („steady state” állapot).

Az egysejtűek optimális szaporodását biztosító környezeti feltételek viszonylag könnyen tisztázhatók. Így mind a populáció genetikai stabilitását, mind a folyamatos maximális növekedési rátát (a kettőződési idő a lehetséges minimális) biztosítani lehet. Az ilyen módon előállított tenyészetben a kérdéses egysejtű folyamatosan tanulmányozható a maga eredeti, természetes valójában. A környezeti és tenyésztési feltételek alkalmas változtatásával bármely a természetben előforduló helyzet valóban reprodukálható. Így az egysejtű minden lehetséges és valódi reakciója (változása) elvben, és szükség esetén gyakorlatban is, a valóságnak megfelelően észlelhető laboratóriumi viszonyok között. Ugyanezért bármely egysejtű minden elvileg lehetséges természetes mutánsa is előállítható mesterséges úton a „vad” törzsből.

Ilyenformán az *in vitro* tenyésztés az önálló egysejtűek relációjában lényegében lehetővé teszi a vizsgált élőlény összes sajátságainak részletes és kimerítő feltárását.

A többsejtű szervezetet alkotó egy egyedi sejtből nyert *in vitro* tenyészetek nyilvánvaló analógonjai az egyetlen egysejtűből nyert *in vitro* tenyészeteknek. Az előbbiek informatív értéke azonban összehasonlíthatatlanul indirektebb és korlátozottabb, mint az utóbbiaké.

Tudjuk, hogy a többsejtű organizmus minden egyes sejtje egyetlen megtermékenyített petesejt utódja. Ez biztosítja a tökéletes genotípusos homogenitást. Világos ugyanakkor, hogy a jelenlévő összes genetikai potenciálok (a kezdeti sejt totipotenciális jellege) nem manifesztálódhatnak szabadon minden egyes utódsejtben. Ez esetben ugyanis a többsejtű organizmus helyett (az önálló egysejtűek analógiájára) a megtermékenyített petesejttel fenotípusosan is azonos sejtek homogen populációjának kellene keletkeznie. Az ontogenezis során tehát a genotípusos homogenitás maradéktalan megőrzése mellett az egyes sejtekben (és a belőlük kialakuló specifikus sejtcsoportokban, szervekben) az aktuálisan átrható és lefordítható genetikai információkészlet bizonyos specifikus funkciókra „profilozottá” kell váljék [11]. Ez lényegében azt jelenti, hogy a kezdeti totipotenciális jelleg többé-kevésbé reverzibilis repressziók útján korlátozott számú, de specifikus potenciálokra szűkül be. Az ilyen módon „feleslegessé váló” információkészlet azonban nemcsak megőrződik a kérdéses egyedben, hanem annak minden egyes utódába is hiánytalan másolatban kerül át. Elvben tehát a soksejtű szervezet minden egyes sejtje egy-egy potenciális megtermékenyült petesejt, amelyből az illető organizmus egésze reprodukálható kellene legyen.

A jelen tanulmány tárgyát képező, emlős szervezetekből izolált sejtek egyike esetében sem sikerült még eddig ezt az elvi lehetőséget realizálni. Az ebihal bélhámsejtjének (differenciált sejt!) magját megtermékenyített, majd enukleált szingeneikus békapetébe ültetve, az esetek kb. 35–40%-ában létrejött a differenciált mag derepressziója, és a hibrid petéből teljes értékű béka fejlődött ki [6]. A növények esetében pedig bármely izolált egyedi sejtől megfelelő feltételek mellett az eredeti növény egésze reprodukálhatónak bizonyult [19]. E rendszerekben tehát nyilvánvaló, hogy az összes korlátozó repressziók reverzibilisek és így az eredeti totipotenciális állapot helyreállítható. Úgy látszik viszont, hogy az emlős szervezetek ontogenezise az eredeti genetikai totipotencialitás irreverzibilis repressziójának eredménye.

A rendelkezésre álló kísérletes adatok egyértelműen bizonyítják, hogy az irreverzibilis differenciáltság mértéke fordítva arányos a kérdéses sejt *in vitro* tenyészthetőségével [14]. Más szóval a többsejtű organizmus valamely sejtjének *in vitro* tenyészthetőségét az szabja meg, hogy a kérdéses sejt genetikailag determinált potenciáljainak az a része, amely az *in vitro* növekedéshez való adaptálódást lehetővé teszi, dereprimálódhat-e a megfelelő

környezeti viszonyok hatására, vagy sem. Világos viszont, hogy egy ilyen derepresszió bekövetkezése szükségképpen együttjár a sejt eredeti (szervezetten belüli) fenotípusának módosulásával is. Emiatt tudomásul kell vennünk, hogy a normális, többsejtű organizmusból izolált egyetlen in vitro tenyészthető sejt sem azonos eredeti (in vivo) önmagával [13]. A primér tenyésztetek sejtjei biokémiai sajátágaikban, fény- és elektronmikroszkópos „festődésükben” ugyan igen hasonlóak lehetnek a szervezetten belüli eredetijükhöz, de ez a hasonlóság az in vitro tenyésztés idejének növekedésével fokozatosan halványul. A sejt egyre inkább a többi tenyésztett sejtekre kezd hasonlítani. E tény szükségszerűsége azonnal belátható, ha visszagondolunk az egysejtűekről mondottakra. Ott ugyanis követelményként jelöltük meg a sejt természetes környezetének reprodukálását a tenyésztetben ahhoz, hogy a sejt eredeti valójában vég nélkül tenyészthető legyen. Tökéletesen nyilvánvaló, hogy ez a követelmény az organizmusból izolált sejtek esetében jelenleg még semmiképpen sem valósítható meg. Az organizmus ugyanis, szemben az in vitro rendszerekkel, nem egyszerűen bizonyos tápanyagokat és fizikai, kémiai paramétereket biztosít egyedi sejtjeinek, mint ahogy az organizmus sem egyszerű összege egyedi sejtjeinek.

Ilyen koncepcióból kiindulva nyilvánvaló képtelenség valamely tenyésztetben élő emlős-sejtet az organizmusban élővel azonosítani. Megfelelő kritikával élve azonban az in vitro fenntartott sejt in vivo analogonjának kiváló, és igen informatív modelljéül szolgálhat [13, 23].

Hasonló az eset ahhoz, amit az enzimkémiában látunk. A nagyfokban tisztított enzimkészítmények in vitro vizsgálata óriási jelentőségű elvi megállapításokat eredményezett azok in vivo működésének lehetséges és valószínű módjaira nézve. Ennek ellenére világos, hogy az in vitro működő enzim mindössze alkalmas, de funkcionálisan nem azonos modellje az in vivo működőnek.

A mondottak alapján belátható, hogy a szövettenyésztés mint fogalom teljesen félrevezető. In vitro tenyésztetni csakis a szöveti szerkezetből kiszabadított egyedi sejteket lehet. A szövet, mint olyan, legfeljebb hosszabb-rövidebb ideig túlélhet in vitro, de amint tenyészni kezd, szükségképpen elveszti hisztológiai értelemben vett szöveti jellegét.

Az in vitro növekedést lehetővé tevő fenotípus-módosulásnak egyik legszembeötlőbb jele az in vitro tenyésztett sejtek morfológiai szegénysége, szemben a többsejtű organizmus szöveteit alkotó sejtek bámulatos formagazdagságával. E jelenségre már a legkorábbi sejttenyésztők is felfigyeltek, és ezt nevezték in vitro dedifferenciálódásnak. Ma már tudjuk, hogy tartós in vitro tenyésztés esetén a fenotípus megváltozását a genotípus megváltozása is követi. Az in vitro növény sejtörzsek ebben az értelemben mind transzformáltak [1]. A kariotípus általában csak 15–20 passzázsos át őrzi meg diploid karakterét. Ezen túl egyre kifejezettebb poliploidia kezd mutat-

kozni (sejtvonal). Ebben a fázisban a tenyészet vagy menthetetlenül kipusztul, vagy kialakul egy *in vitro* tartósan növekedni képes fix ploidiájú mutáns, a sejtörzs. Nyilvánvaló tehát, hogy minden sejtörzs artefaktum, és szükségképpen csak az eredeti sejtek többé-kevésbé „távoli rokonaként” tekinthető. Igen nagy óvatossággal kell tehát eljárni akkor, ha valamely sejtörzsen végzett megfigyelésünkből a szervezeten belüli emlős sejtekre akarunk következtetni [1, 11, 13, 23].

A mondottak figyelembe vétele mellett (és azok ellenére) nyilvánvalóak azok az előnyök, amelyeket a többsejtű szervezethez izolált és *in vitro* tartósan tenyészthető sejtek tanulmányozásának lehetősége rejt magában. Az ilyen jellegű tanulmányok vezettek arra az elvi felismerésre, hogy léteznek általános érvényű törvényszerűségek, amelyek a sejtre, mint az élet elemi egységére jellemzőek, annak jelenlegi filogenetikai helyétől és eredetétől függetlenül. Ilyenek az energiatermelés alapvető módjai, az egyes metabolitok szintézisének biokémiai útjai, a makromolekulák specifikusa, a genetikai kód és szabályozás, valamint az enzimműködés szabályozásának alapvető elvei [16]. A sejt mint szervezet szintjén ilyen közös jellemző a különféle sejtek „biológiai órája”. Ez minden, megfelelő feltételek közé kerülő sejtben működésbe lép, és mind az egyedi sejt, mind az abból keletkező populáció létezését ciklusosan ismétlődő periódusokra osztja fel [3, 22]. Az emlős sejtek esetében az óra a mitotikus ciklus, G₁, S, G₂ és M fázisainak ismétlődő, szabályos időközben egymást követő fázisaiban mutatkozik. Behizonyosodott, hogy a sejtek órája megfelelő körülmények között átmenetileg vagy tartósan spontán leáll, ill. mesterségesen leállítható, az érintett sejt életképességének károsodása nélkül, vagyis az óra megállása nem szükségképpen egyértelmű a sejt pusztulásával [4, 15].

In vivo az ontogenezis során a többsejtű szervezet szabályozó mechanizmusai bizonyos sejtek óráját irreverzibilisen leállítják a ciklus egy adott fázisában (pl. idegsejt). Az ilyen sejtek osztódása úgy látszik, többé sem *in vivo*, sem *in vitro* nem indukálható. Ettől függetlenül e sejtek a szervezet egészének teljes élettartama alatt élnek, és ellátják specifikus működésüket. Más sejtek órája csak reverzibilisen áll meg, és szükséghez képest újra indítható a sérült, vagy elpusztult sejtek pótlására, ill. bizonyos specifikus védekező funkciók ellátására (pl. porc, vagy parenchima sejtek, ill. a vérképző és immunrendszer bizonyos sejtjei). Ismét más sejtek folytonosan elhasználódnak és pótlódnak (pl. a szervezet külső és belső felszínén). A pótlásról a megfelelő szövet megfelelő sejtjeinek folytonos osztódása gondoskodik, azaz e sejtek biológiai órája állandóan teljes sebességgel jár. A többsejtű szervezetben tehát minden egyes normális sejt saját biológiai órája szigorúan alá van rendelve a szervezet mint egész saját biológiai órája járásának. E szabályozó funkció neurális úton, ill. specifikus szerkezetű molekulák útján adott és kapott parancsok, valamint visszajelentések segítségével érvényesül.

Világos tehát, hogy egy többsejtű szervezet milliójából mesterségesen kiszakított, és in vitro önálló (egysejtű típusú) életre szorított egyedi sejtek vagy életképtelennek bizonyulnak (az ontogenezis „elrontotta” a saját órájukat), vagy képessé válnak, saját biológiai órájuknak engedelmessé válva önálló létet kezdeni. A sejttenyésztő tapasztalatai szerint ez utóbbi lehetőség megvalósulásához kezdetben igen nagy, később egyre csökkenő számú sejt elegendő a tenyésztetben. A sejttörzsek (homogen stabil mutánsok) tenyészeit pedig már egyetlen sejt felhasználásával is el lehet indítani (klonozás) [7]. A kialakított sejttörzset minden esetben a lehető legnagyobb számú genetikai markerrel (kariotípus, ciklusidő, speciális enzimek aktivitása, esetleg auxotrófia, antigénsajátságok stb.) jellemezni kell [14, 18]. E törzsek ugyanis, éppúgy mint bármely más élőlény, spontán mutációkon eshetnek át. Ha meggondoljuk, hogy pl. a HeLa jelzésű humán sejttörzsből a világon évente több tonnányit állítanak elő, kézenfekvő, hogy még igen alacsony mutációs ráta esetén is reálisan fennáll a spontán mutáció keletkezésének lehetősége. Ezért szigorú szabály a standard sejttörzsekkel való munkában a tenyészetek időszakonkénti klónozása és genetikai markereik ellenőrzése, ami nélkül az illető sejttörzssel végzett kísérletek a priori értékelhetetlenek, és ezáltal egyben értelmetlenek is. Itt jegyzem meg, hogy az első sejttörzseket nem is annyira sejtbiológiai, mint víruskutatói és vírus vakcina termelési célokra állították elő. Ezeknél ugyanis a legfőbb markerként a vírusfogékonyság szerepelt, amelyet, úgy látszik, a sejt morfológiai és biológiai sajátságainak (egyéb markerek) gyakran jelentős változásai is nem, vagy alig változtattak meg [8].

Napjainkban a sejtbiológiai, biokémiai és genetikai célokat szolgáló tömeges emlőssejt-tenyésztés módszerei már igen magas szintet értek el. Tudnunk kell azonban, hogy ezeknél a legnagyobb probléma sohasem egy adott kísérlet elvégzésében áll, hanem a sejttörzs fenntartásában. Ennek alapja ugyanis a kialakításkor jellemzett sejttörzs eredeti sajátságainak maximális megőrzése a hosszan tartó fenntartás mellett [12, 14, 17, 20]. Ez rendszeres és gondos rutin tenyésztői munkát követel és magas színvonalú, megbízható ipari háttér nélkül elképzelhetetlen. Ez utóbbi biztosítja ugyanis a tenyésztésben használt összes ingrediensek (a desztillált víztől a laboratóriumi bútorok burkolatáig) gondosan levizsgált, standard minőségét, és a szállítás folyamatosságát. Ha ez az ipari háttér nem áll zökkenő nélkül rendelkezésre, a mégoly zseniális emlőssejt-tenyésztő munkája is biztos eredménytelenségre van ítélve.

Nem jelent kibúvót e követelmény alól a rövid tartamú primer sejttenyészetek használata sem. Itt ugyanis az egyéni szórás már a sejt-donor állatok szintjén is jelentkezik, s ezért a tenyésztési feltételek standardizálása iránt még szigorúbb követelményeket kell támasztanunk, mint a sejttörzsek esetében. A mondottak figyelembe vételével mind a primer, mind bizonyos

speciális sejttörzs-tenyészetek használatával kiválóan modellezhetőnek bizonyultak bizonyos specifikusan differenciált emlőssejtek *in vivo* funkciói, ú. m. rost-, extracellularis anyag-, hormon-, mirigyváladék-, ellenanyagtermelés, ritmusos kontrakciók, mozgás, fagocitózis, pinocitózis stb. Egyes anyagok, termeléséhez (pl. hormonok) kiválóan alkalmasnak bizonyultak bizonyos hormontermelő szervek rosszindulatú daganataiból készült *in vitro* tenyészetek. Ezek amilyen informatívak lehetnek a kérdéses hormon bioszintézisére, valamint őrítésére vonatkozóan, olyan alkalmatlanok a hormontermelés *in vitro* szabályozásának tanulmányozására. Lényegében ugyanez igaz minden *in vitro* működő sejtre, s ezért mindig gondolni kell arra, hogy eredményeinket arteficiális modellen nyertük, s azok nem feltétlenül közvetlenül igazak az *in vivo* rendszerekre.

Az *in vivo* genetikai anomáliák, enzim-deficienciák, raktározási betegségek stb. tanulmányozásában is kiváló eredmények születtek a sejttenyésztés szintjén. Az ilyen diagnosztikai jellegű tenyésztések esetén azonban feltétlenül figyelemmel kell lenni arra, hogy a lehető legkevesebb passzázs történjék, mert csak így remélhető, hogy a sejt az eredetihez nagyban hasonló sajátosságokat őriz meg.

Az *in vitro* emlős-sejt tenyészetek szerepe a modern daganatkutatásnak is egyik alapja. A daganatsejtek általában a viszonylag könnyen tenyészthető sejtek közé tartoznak [2, 14, 21]. Ennek oka részben az, hogy a daganatsejt éppen azért daganatsejt, mert transzformációja következtében nagyrészt függetlenné vált a szervezet szabályozó mechanizmusaitól. Másrészt e sejtek nem mutatják a kontakt gátlás jelenségét, s így igen könnyen hajlandók növekedni nem természetes szubsztrátumokon, vagy akár szuszpenzióban is, s végül a daganatsejtek többsége „dedifferenciált” az eredeti kiindulási sejt-típushoz képest.

Az *in vitro* tenyésztett daganatsejtek általában igen jól megőrzik biológiai sajátosságait, így nem egy átoltható daganattörzs probléma nélkül tenyészthető alternálva *in vivo* és *in vitro* [21]. Ez kézenfekvő módon óriási előnyt jelent, hiszen az egyik rendszerben végzett kísérletet közvetlenül ellenőrizhetjük a másik rendszerben. Külön probléma a permanensen *in vitro* tenyésztett daganatsejtek, s az azokból mesterségesen izolált mutánsok (olykor szélsőséges artefaktumok) vizsgálata. Ezek informatív értékét minden esetben az szabja meg, hogy áll-e rendelkezésre elegendő kontrollanyag annak eldöntésére, mit ér az adat az *in vivo* rendszerek szempontjából.

Lényegében hasonló megfontolások érvényesek az emlőssejt genetikai tanulmányokra, a fajazonos és fajidegen sejthibridekre [5]. Az *in vitro* tenyésztett sejteken végrehajtható az ún. génebézés is egyike a nagy perspektívájú és izgalmas lehetőségeknek. *In vivo* alkalmazása azonban már nemcsak szakmai jellegű, de etikai és jogi problémák feltevését is jelenti.

Összefoglalva az elmondottakat, azt mondhatjuk, hogy megfelelő ipari

háttér mellett, megfelelően képzett személyzettel működő emlőssejt-tenyésztő laboratóriumban „nincs lehetetlen”. Elvben valóban bármely sejt tenyészthető, transzformálható, hibridizálható [9], mutációra készíthető, vírussal fertőzhető stb., s így szinte korlátlan lehetőségeket nyújt az emlőssejtek tulajdonságainak megismeréséhez [1]. Jelenleg a döntő probléma az ipari háttér biztosítása [17, 20], a helyes kritikai szemlélet elsajátítása és az elvben adott szintű technikai lehetőségekhez méltó elméleti koncepciók megalkotása.

IRODALOM

1. BARD, J.: *Cell* **2**, 120 (1974).
2. BLUM, H. F.: *J. theor. Biol.* **46**, 143 (1974).
3. BRONK, B. V., DIENES, G. J., SCHINDLER, R., GAUTSCHI, J. R.: *Biophys. J.* **14**, 607 (1974).
4. BURTON, A. C., CANHAM, P. B.: *J. theor. Biol.* **39**, 535 (1973).
5. CSONKA, É.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **15**, 255 (1972).
6. GURDON, J. B.: *J. Embryol. exp. Morph.* **10**, 622, (1962).
7. HAM, R. G.: *J. Natl. Cancer Inst.* **53**, 1459 (1974).
8. VAN HEMERT, P., KILBURN, D. G., VAN VEZEL, A. L.: *Biotechnol. & Bioeng.* **11**, 875 (1969).
9. HARRIS, H.: *Cell fusion. (The Dunham lectures)*. Clarendon Press, Oxford (1970).
10. HORVÁTH, I.: *Kvantitatív mikrobiológiai eljárások. Biológiai tanulmányok 3. Akadémiai Kiadó, Budapest (1974).*
11. HORWITZ, B. A., HORWITZ, L. P.: *J. theor. Biol.* **42**, 169 (1973).
12. KAHN, R. H., BURKEL, W. E., PERRY, V. P.: *J. Natl. Cancer Inst.* **53**, 1471 (1974).
13. KAIGH, M. E.: *J. Natl. Cancer Inst.* **53**, 1437 (1974).
14. KRUSE, P. F., Jr., PATTERSON, M. K., Jr.: *Tissue Culture (Methods and Applications)*. Academic Press, New York & London (1973).
15. MARTZ, E., PHILLIPS, H. M., STEINBERG, M. S.: *J. Cell Sci.* **16**, 401 (1974).
16. NOVIKOFF, A. B., HOLTZMAN, E.: *Cells and organelles*. Holt, Rinehart and Winston Inc., New York (1970).
17. PYE, D.: *J. Biol. Standard* **3**, 83 (1975).
18. SAHAI SRIVASTAVA, B. J.: *Exptl. Cell Res.* **80**, 305 (1973).
19. SCHANTZ, E. M., STEWARD, F. C.: *Growth and organization in Plants*. Addison-Wesley Publ. Co., Reading, Mass. U.S.A. (1968).
20. TEMIN, H. M., PIERSON, R. W., Jr., DULAK, N. C.: *Growth, nutrition and metabolism in cells in culture*. Academic Press, New York & London (1972).
21. TSUBOI, K., TAKAOKA, T., KATSUTA, H.: *Jap. J. exptl. Med.* **43**, 107 (1973).
22. VOLPE, P., EREMENKÓ-VOLPE, T.: *Exptl. Cell Res.* **60**, 456 (1970).
23. WAYMOUTH, Ch.: *J. Natl. Cancer Inst.* **53**, 1443 (1974).