

SZÖVETTENYÉSZTÉS ÉS DIFFERENCIÁLÓDÁS, TEKINTETTEL A PORCSEJTEKRE

HADHÁZY CSABA

DOTÉ Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézete, Debrecen

A differenciálódás jellemző alaki és funkcionális sejttulajdonságok kialakulását eredményező progresszív specializálódási folyamat, amely normális embrionális fejlődés folyamán megy végbe, vagy azzal analóg, annak ismétlődése [48]. Fejlődési potenciával rendelkező, reagálni tudó és képes ún. kompetens sejtet és annak specializálódását kiváltó stimulust (induktor) feltételez, specifikus proteinek (enzimek és struktúrfehérjék) szelektíve aktiválódott strukturális gének által meghatározott szintézisén alapszik. A folyamat nyomon követése jellemző ismérvek („differenciálódási kritériumok”, fenotípus-jellemzők) alapján történik, amik sejt-, ill. szövetféleségenként különböznek. Emiatt — konkrétumok vázolhatósága céljából — egy sejt-féleség: a kondrocita differenciálódásának aktuális problémáit ismertetem.

A sejt- és szövettenyésztés a differenciálódás tanulmányozásához a tágabb környezettől való izolálás, a kontrollálható miliő s a homogén vizsgáló megteremtésével vitathatatlanul nagy segítséget nyújt.

I.

Porcdifferenciálódási kritériumként esetenként (pl. induktorhatás, táp-talajkomponensek tesztelése stb.) megelégszünk morfológiai jegyek (jellemző sejthalak, metakromatikus festődés, -index, porctok képződés stb.) vizsgálatával, más esetekben funkcionális kritériumokat kell tanulmányoznunk. Az utóbbiakat a porcsejt-produktumok — glükózaminoglikán (GAG)-protein komplexek (proteoglikánok: PG), glükoproteid kötőkomponensek (GPL), a kollagén, ill. az ezeket eredményező anyagcsere-folyamatok között kell keresnünk. Megjegyzendő, hogy a porcsejtek a kollagént és a PG-okat szimultán, de nem szükségszerűen egymástól függően termelik [9, 115], a fenotípusukat vesztett sejtekben ezek képződésének megszűnése a legszembetűnőbb [106].

A porcszövet kollagén molekulája kizárólag $\alpha 1$ (II) láncokból áll, így különbözik a más szövetféleségekben található $\alpha 1$ (II) és $\alpha 2$ láncokból épült molekuláktól [91, 92]. Izolált porcsejtek porcra jellemző kollagént termelnek [137], huzamosabb tenyésztés alkalmával a termelt kollagén $\alpha 2$ láncokat is tartalmaz [79].

Fenotípus-jellemzőként gyakran vizsgálják a kondrotinszulfát (ChS) mennyiségét, vagy a szintézisben részt vevő egyes enzimek aktivitását. E kritériumok megbízhatatlanok. A porc ugyanis ChS mellett más GAG-féleségeket is tartalmaz [59, 128], s GAG-spektruma speciestől, életkortól, előfordulási helytől függően változhat [89]; más támasztószövetekben is ugyan-ezen GAG-ok találhatók. A GAG építőkövek száma meglehetősen csekély, az egyes GAG-ok bioszintézise alig különbözik. Az ezekben részt vevő enzimeket nem porcosodó embrionális szövetekben is kimutatták [87, 112]. Kondrogenézis alkalmával ezek aktivitása fokozódik [90].

A GAG-láncmolekulák peptidekhez kötve képződnek és hosszabbodnak. A proteo-ChS képződésekor a peptidhez — transzferázok segítségével — előbb xilóz, majd galaktóz kapcsolódik, s ún. kötődési régiót képeznek. Ehhez alternálódva aktív glukoronsav és aktív N-acetilgalaktózamin adódik [109]. A lánc hosszabbodásnak a terminális hexozaminegység szulfatálódása vet véget [131]. A porcsejtek két különböző proteo-ChS-t termelnek, amelyek közül az egyik (90%) porcra jellemző, a másik (10%) ubikviterebb [103]. A differenciálatlan sejtek az általános típusú PG-t termelik, kondrogenézis folyamán egyre nagyobb mennyiségben jelenik meg a porcspecifikus [43].

A porc képződést megelőzően a differenciálatlan sejtek kondenzálódnak, majd a sejtek lekerekedésével, növekedésével párhuzamosan az intercellularis állomány is felhalmozódik [11]. E jelenséggel kapcsolatban tudnunk kell, hogy a sejtközi állomány nem kollagén komponensei kisebb-nagyobb aggregátumok formájában fordulnak elő, amelyek PG-okból s az ezeket összekötő GPL-ből állnak [110]. A PG-ok aggregálódása, helyhez kötése tehát a GPL megjelenésének következménye, ami species- és szövetspecifikus antigén-determinánsokat tartalmaz [28, 68].

II.

Az *in vitro* differenciálódás-vizsgálatok jelentős része a *sejtek differenciált állapotának in vitro megtartását lehetővé tevő feltételeket* keresi.

Az első vizsgálatok rámutattak [31, 38, 39, 120], hogy a tenyésztetőség alapfeltétele a porcsejtek alapállományból való kiszabadítása. Szaporodásuk fenotípus-jellemzőik elvesztését eredményezi, szaporodásuk gátlása — egyes esetekben — e jellemzők megjelenését idézte elő. MOSCONA [94] tripszines technikája a porcsejtek tenyésztését — az alapállományból való kiszabadítás megoldásával — új alapokra helyezte. Végtagtelepek izolált mezoblasztjait vizsgálva azok aggregálódását, az aggregátumokban porcsejtek képződését észlelte [95]. Rámutatott, hogy a disszociált sejtek megőrizhetik specifikus hisztogenetikus tulajdonságaikat, s hogy a sejtek közötti közvetlen kapcsolat e tulajdonságok kibontakozását elősegíti.

Izolált porcsejtek *in vitro* fenotípus-viszonyait modernebb módszerekkel először a HOLTZER-munkacsoport vizsgálta [1, 22, 64, 99, 119]. 10 napos csirke embrió csigolyákból vett porcsejtek monolayereit tanulmányozva megállapították, hogy a gyorsan növő tenyészetekben a porcsejtek első oszlásából származó sejtek még speciális bioszintézisekre képesek. A további generációk azonban fokozatosan elvesztik fenotípusukat s fibroblasztszerű sejtekké alakulnak. Organoid tenyészetekben (aggregátumok) a fenotípus megőrzésének lehetősége nagyobb. A „dedifferenciálódás” részleges, a sejtek nem nyerik vissza a szomitasejt potenciát.

Bár HOLTZER és munkatársai számos részlet-eredménnyel is gazdagították ismereteinket, a differenciált sejtek fenotípusának tartósabb megőrzése változatlanul nyitott kérdés maradt. Emiatt feltűnést keltettek COON [23] eredményei, amelyek szerint csirke embriókból származó porcsejtek fenotípusa klóntenyészetekben hosszabb ideig öröklődik, s hogy a monolayerekben „dedifferenciálódott” sejtek fenotípusa klonális feltételek között, vagy kevésbé sűrű monolayerben ismét jelentkezik. (Megjegyzendő, hogy COON tenyészetei is tartalmazznak fibroblasztszerű sejteket, megállapításai a primér kultúrák ún. cartilage making colonies [CMC] sejtjeire vonatkoznak.) COON [23] lényegében számos, időközben ismertté vált technikai módosítást adaptált, s ezek együttes felhasználásával megfelelő módszereket bocsátott rendelkezésünkre. Ezek birtokában posztnatális és felnőttből származó sejtekre is kiterjedő széles körű vizsgálat indult meg, s megállapították, hogy a fiatalabb és idősebb egyedekből származó porcsejtek sajátosságai az embrionális porcsejtekével megegyeznek [44, 56, 116]. Az eredménnyel kecsegtető módszer részletei a következők:

Az izolálás terén a tripszin-kollagenáz kombináció bevezetése KAWIAK és munkatársai [67] érdeme. További gyakran használt disszociáló folyadék a csak kollagenázt tartalmazó FBC-oldat [56]. Az előbbieken kívül a porcsejtek izolálására pankreatint, pronázt, papaint használnak [18]. Az enzimoldatokhoz a sejteket védendő, esetenként valamennyi csirke-, vagy fetális borjúsérumot (FCS) adnak [33, 44]. A disszociálást mechanikai módszerrel elősegíthetjük, erre a célra mágneses keverővel működtetett kétterű izoláló kamra [44, 67] használatos. A disszociálás befejezésekor a sejteket hűtjük és mossuk, hogy az enzimhatást felfüggesztjük s az aggregálódást megakadályozzuk. Ez hideg (5–15 °C) médium hozzáadásával s kíméletes centrifugálással (100–200 g, 3–4 perc) történik. E médiumban a sejteket pipettázással szuszpendáljuk, a sejtesomókat nylon-szita segítségével távolítjuk el.

Táptalajok, táptalaj adalékok a fenotípus-jellemzőket lényegesen befolyásolják. Izolált porcsejtek tenyésztéséhez komplex táptalajok használatosak, amelyek többségi összetevője a HAM-féle F–10 [54], F–12 [55], ezek COON által módosított formái [18], a Dulbecco módosította Eagle [44], valamint a CMRL 1066 táptalaj [104]. Az F–10, módosított F–12 és CMRL

1066 táptalajok monolayer és klóntenyészetekre való hatását LAVIETES [78] részletesen vizsgálta, s a CMRL 1066-ot találta legmegfelelőbbnek, amiben a porcsejtek szaporodnak, mátrixot termelnek, porcotokat képeznek s az in vivo viszonyokhoz hasonlóan degenerálódnak. A táptalajok több-kevesebb pufferezett sóoldatot (Hanks- vagy Earle-oldat) és szérum adalékot is tartalmaznak. A homológ szérumokat a FCS kiszorította a használatból, mivel a szaporodást és a fenotípus megőrzését elősegíti. Rendszerint 10%-ban használatos, ez alatt hatékonysága csökken, 5% már szuboptimális állapotot idéz elő [57]. A lószérumot (HS) gátló hatásúnak mondják [23, 30]. Az embrió-kivonat (EE) hatása, jelentősége vitatott. A konvencionális EE egyesek szerint a tenyészeteket nem befolyásolja [56, 64], mások szerint dedifferenciálódást idéz elő [25]. COON [23], COON, CAHN [24] az EE-t Sephadex G-25-ös oszlopon szűrték, s abból H- (kizárt térfogat), valamint L-frakciót (visszatartott térfogat) állítottak elő. Adataik szerint az L a fenotípus megőrzését elősegíti, a H pedig gátolja. Mások szerint [57] az L frakciónak nincs észrevehető hatása, a H frakció viszont a fenti értelemben stimuláló. Később CAHN [17] véleménye is módosult, H gátlást csak nagyobb koncentráció esetén észlelt, hígabb H-tartalmú oldattól maga is stimuláló hatást tapasztalt. Feltehetően a hatás bizonytalansága miatt az EE használata háttérbe szorult. A porcsejtek kollagént aszkorbinsav ($50 \mu\text{g/ml}$) jelenlétében termelnek [79]. A tapasztalatok szerint az aszkorbinsav a PG képződést is stimulálja [81, 82, 100], a fenotípus megőrzésének időtartamát meghosszabbítja [82]. A fenti táptalajok közül aszkorbinsavat csak a CMRL 1066 tartalmaz. Konkrét táptalaj-formulákat illetően lásd: 18, 44.

Tenyésztéshez az esetek többségében plasztik edényeket és CO_2 inkubátort használnak.

Monolayer kialakításához $2-4 \times 10^4$ sejtet számítunk táptalaj ml-enként [18, 44]. LAVIETES [78] szerint $2,5 \times 10^4$ csirke embrió sternumsejt/ml CMRL 1066 szuszpenzió 60 mm Ø-jű plasztik csészében 9–10 nap alatt folyamatos porcsejt-monolayer alakít ki. Megfelelő táptalajban a sejtek GAG-okat és kollagént termelnek [25, 79, 117]. Az előbbieket közül mindennek előtt Ch4—S-t, lényegesen kevesebb keratoszulfátot (KS), valamint csekély mennyiségű hialuronsavat (HA) és kondroitint (Ch) mutattak ki [114]. A termelt ChS mólsúlya kevesebb, láncossza rövidebb az in vivo mérhetőnél [70], ezt azzal magyarázzák, hogy a környéki matrix elvesztését a sejtek fokozott termeléssel kompenzálják. A kollagén $\alpha 2$ láncokat is tartalmaz [117]. Monolayerek indító médiumául HAM, SATTLER [56] a letapadást elősegítő F—12-t használják, amit hamarosan CMRL 1066-ra cserélnek. A monolayerek passzálásakor előbb szérum nélküli táptalajjal öblítünk, majd disszociálunk. Utóbbi célra 1–5 mg/ml kollagenáz oldat használható. Monolayerekben a fenotípus-jellemzők az 1. passzázs után redukáltak, a 4. szubkultúrában már fibroblaszt alakú sejtek dominálnak, az 5. pedig kizárólag az utóbbiakból áll [78].

A fenotípust jellemző anyagsere és -termékek tanulmányozásához nagyobb mennyiségű sejt szükséges. Ilyen vizsgálatok *szuszpenziós tenyészetekben* (spinner edények) történnek. NEVO, HORWITZ, DORFMAN [100] táptalaja F-12, 10% FCS tartalommal, amihez $0,5-1 \times 10^5$ /ml sejtet adnak. E tenyészetek generációs ideje kb. 48 óra [66]. A vizsgálatokat a lag fázisban végzik. A 2-3. napon a tenyészetek szemmel látható aggregátumokat tartalmaznak, a sejtek felszínén és a sejtek között nagyobb mennyiségű metakromatikus anyag látható.

Porcsejtek klónolása más sejtféleségekkel egyező módon szövetből, vagy rövid ideig tenyésztett primér tömegkultúrából történhet. E célból rendszerint 1×10^2 sejt/60 mm Ø-jű csésze sűrűségben szélesztünk. Kétféle klón fejlődik. Domináns típus: a CMC, ami sűrűn egymás mellé rendeződött kerekded sejtekből áll, ezek metakromatikusán festődnek. A másik klóntípus ortokromatikusán festődő fibroblasztoszerű sejtekből áll, generációs idejük rövidebb, hamarosan szétmászhatnak. A klonális milió ezek szerint szelektálja a fenotípusúakat megőrző és fibroblasztoszerű sejteket, amelyek megítélésében a vélemények megoszlanak. Az egyik nézet szerint a két sejtféleség egymásba átalakulhat [19, 23, 77], mások szerint a fibroblaszt alakú sejtek klonális feltételek között sem változtatják fenotípusukat [22]. Mintegy 6 nap eltelével a klónok centruma többszörösen rétegződik, a médiumban úszó sejtek találhatók. Ekkor kerülhet sor szubklónolásra, amit klónoló hengerrel, vagy „scarping-módszerrel” végezhetünk [18]. Adekvát feltételek között embrióból [23] és felnőttből vett porcsejtek [56] fenotípusa legalább 3 passzáson át (több mint 30 generáció) megőrizhető. Ezt követően nagy, ellapult sejtek képződnek, amiket előregedett képleteknek tekintenek [16, 66].

Primér porcsejt tömegkultúrák szennyező fibroblasztokat is tartalmaznak. Utóbbiak eltávolítása történhet úgy, hogy kb. 1000 sejtet tartalmazó CMC klónokból poolt képezünk s ezt inokuláljuk. További lehetőség: *szelektív táptalaj* használata. Erre a célra a MACPHERSON, MONTAGNIER [85] által más célra bevezetett táptalaj szolgál (lágú agar), amelyen a porcsejtek szaporodnak s mátrixot képeznek [66]. E táptalaj F-12-t 10% FCS-t, 0,3% triptózfoszfátot, 0,5% agart (vagy agarózt) tartalmaz, s lehetővé teszi a porcsejtek más támasztószöveti sejtektől való izolálását [66].

Az *aggregátum-tenyészetek* MOSCONA-nak [96] köszönhetőek, aki többek között végtagtelep axiális részéből vett mezoblasztokból forgó keverő segítségével aggregátumokat állított elő, amelyek részben porccá differenciálódtak. (Technikai leírás: 44, 96). E tenyészetekkel kapcsolatban MOSCONA [97] összefoglalására utalok, csak annyit jegyzek meg, hogy e módszer sejt-sejt kölcsönhatások, hisztodifferenciálódás tanulmányozására alkalmas.

Támasztószöveti orgánkultúrák végtag-blasztémák és vázrész primordiумok tanulmányozására használatosak, hogy további differenciálódásukat figyelemmel kísérjük s e folyamat részleteit, befolyásolhatóságát megismer-

jük. Ezen túlmenően tápanyag, anyagsere, funkcionális és patológiai vizsgálatok céljait szolgálják. Az első ilyen vizsgálatokat mindenekelőtt FELL és munkatársai végezték [33, 34, 35, 36, 121]. Az organoid tenyésztés technikája a FELL-, ROBISON- [34] féle óraüvegtől a mai Falkon plasztik organ edényig lényegesen változott. Technikai megoldások: 11, 98. E módszerek részben természetes, részben mesterséges táptalajt használnak. Az előbbiek EE-t is tartalmaznak, amely — mint mondják — ilyen körülmények között az explantátumok növekedését s differenciálódását elősegíti [41, 69]. GAILLARD [41] szerint az EE hatása függ az embrió korától, az általa bevezetett „dinamikus médium” fokozatosan idősebb embrióból készített kivonatot tartalmaz. Az ismert összetételű táptalajok többsége a 858-as médium [58] módosítása. Közülük a BL—I [12] és BGJ [13] a legismertebbek. Mesterséges táptalajokban az explantátumok gyorsabban növekednek, szárazanyag tartalmuk azonban csökken, áttetszőkké válnak. Plazma adalék e hatást kompenzálja [14]. Az utóbbi időkben a BGJ médiumot FCS-al és aszkorbin-savval komplettálják [4], s más — az izolált sejtek tenyésztésekor bevált — táptalajokkal: F—12, CMRL 1066 helyettesítik. Az izolálás az explantátumok „shockját” idézi elő, ami hidratációban nyilvánul meg [10, 11]. A tenyésztés kb. 5. napjáról a hidratáció fokozódik, az intercelluláris állomány destruálódik. Organ tenyészetekben különböző eredetű előporcos blasztémák, szövetfragmentumok növekedésük során lényegében in situ viszonyokra emlékeztető alakot hoznak létre. Ezt táplálási feltételek, [37], mechanikai hatások [80, 143] stb. befolyásolják, az alapvető sajátosságok azonban már a blasztémában bizonyos mértékig rögzítettek [144].

III.

További in vitro vizsgálatok a differenciálódás részletei, s a befolyásoló faktorok szerepének megismerését célozzák. Az embrionális porcképződést mindenekelőtt a csigolyák kialakulását figyelemmel kísérve tanulmányozták.

Az 1950-es évek in vivo kísérletei [60, 61, 63, 122, 123, 142] rámutattak, hogy a csigolyaporc a velőcső (gerinevelő), s feltehetőleg a chorda indukáló hatására a szomitákból képződik. Az indukáció a fejlődés korai időszakában (fenti esetekben 2,5 napos korig) érvényesül, későbbi stádiumban a determinált sejtek spontán porccá differenciálódnak.

Az in vitro vizsgálatok többségét csirke embriókon végezték. Korai (17—19 szomita stádiumig) periódusból származó szomitákat tenyésztve „spontán porcképződést” nem észleltek. Ezen szomiták mellé gerinevelő, vagy chorda darabkákat ültetve: a szomitákban porc differenciálódott [3, 49, 50, 73]. Megállapították, hogy az indukcióhoz élő gerinevelő (annak ventrális fele), vagy ép chorda szükséges, inert anyagok, elhalt, vagy másféle szövetek

hatástalanok. Az indukciós hatás átmeneti. Porcindukcióhoz bizonyos mennyiségű (rendszerint 6–8) szomita szükséges [3, 50, 73]. Az említettnél idősebb egyedek szomitáiban „spontán porcdifferenciáció” megy végbe. E vizsgálatokat organoid módszerekkel (plazma-alvadék: 3,49, Chen-féle eljárás: 73, nutriens agar: 71) végezték. További kísérletek a hatásos anyag izolálására, összetételének megismerésére irányultak. Megállapították, hogy a ventrális gerincevelőfélből származó induktor diffuzibilis [60, 63]. E vizsgálatok technikai megoldását lásd: 45, 46, 73. STRUDEL izolált induktora [124, 125] a gerincevelő és chorda szupernatánsa, hő- és alkoholérzékeny, kémiai összetétele ismeretlen. LASH és munkatársai részletes analízist végeztek [65, 75], véleményük szerint a gerincevelőből származó kondrogén hatású anyag citidinmonofoszfátot, 7 aminosavféleségeket és hexozamint tartalmaz. (Az extraktumok in vitro tesztelése: 29, 75, 125]. Adekvátabb feltételek között a „spontán porcképződés” plazma alvadékot használó eljárások esetén a 18., agar tartalmú médiumokban 16. stádiumból származó szomitákban is bekövetkezhethet [62]. ELLISON, AMBROSE, EASTY [29], ELLISON, LASH [30] ismert összetételű táptalajokat (F–12, NCTC 109) használtak, amikhez HS-t, FCS-t és/vagy EE adalékot adtak. FCS jelenlétében a spontán porcképződés már 11. stádiumból származó szomitákban is bekövetkezett, a FCS-hoz képest a HS hatástalannak, sőt gátlónak, az EE mérsékelten stimulálónak bizonyult. Ha a tenyészeteket olajréteggel fedték (hermetikusan zárták), a „spontán” porcképződés már a 9. stádiumú szomitákban is megindult.

Az ektoderma induktív funkcióját a koponya és végtag-vázrészek képződése során is kimutatták [7, 8, 50, 136].

Az 1960-as években kezdődtek URIST és munkatársai vizsgálatai, amelyek szerint a hidegen, 0,6 N HCl-al dekalcinált és liofilizált csont olyan anyagot tartalmaz, amely posztfötális, izom eredetű pluripotens sejtekben — közvetlen kontaktus esetén — porc- és csontképződést indukál [138]. E jelenséget in vitro vizsgálatok alkalmával is észlelték [102, 132, 139]. Az induktor kémiai összetétele ismeretlen, extracelluláris eredetű, neutrális proteázokkal degradálható fehérjének tartják [140, 141]. Bromodeoxiuridin (BudR) e hatás érvényesülését gátolja [132].

IV.

A *porc-differenciálódás mechanizmusát* megértendő LASH és munkacsoportja a ChS bioszintézis részleteit tanulmányozta. Első adataik szerint induktor hatására a szomita sejtekben a szulfát-felhalmozódás [74], s az aktív szulfát (PAPS) szintézisében részt vevő enzimek aktivitása [42, 76] kimutathatóvá válik. Kontrollokban ezt nem tapasztalva a fenti változásokat porc-specifikus válasznak tekintették. Mivel időközben ChS-t képződést befolyá-

solatlan szövetben is kimutattak [40], álláspontjukat módosították, arra gondoltak, hogy az induktor a ChS-bioszintézis volumenét növeli [42, 76]. Később a hexozamin komponens anyagcseréjét vizsgálták. E téren porcdifferenciálódásra jellemző változást nem találtak [72, 87, 88], így arra konkludáltak, hogy a kondrogenezist nem új anyagcsereviszonyok kialakulása, hanem a már meglévők intenzitásának fokozódása és stabilizálódása indukálja.

A GAG-ok és porcdifferenciálódás kapcsolata HALL [51, 52, 53] vizsgálatai során is felmerült. Szerinte a porcképződést a felhalmozódó Ch és ChS indukálná. Ezek differenciálódást, makromolekulák szintézisét előidéző hatása sejtfelszín receptorok közvetítésével NEVO, DORFMAN [101] vizsgálatai alapján is elképzelhető.

Fehérjeszintézis-gátlók felhasználásával további eredmények születtek. Puromicin és aktidion jelenlétében a ChS-termelés reverzibilis gátlását észlelték [27], ami arra utal, hogy a ChS bioszintézise a vázfehérjéjétől függ. E puromicin hatás d-xilóz (a kötődési régió első tagja) hozzáadásával megszüntethető [15], a xilóz tehát a fehérjeláncot a ChS bioszintézisben iniciátori minőségben helyettesítheti. BudR-el a ChS-termelés szintén gátlható [83, 84], a BudR gátolja a porcfenotípus kialakulását is [2, 83]. Mivel a BudR a GAG-bioszintézisben részt vevő enzimek aktivitását nem befolyásolja, az UTP-intermedierek szintjét nem alterálja, d-xilóz hatására a GAG-lánc kialakul: valószínűleg a PG-fehérjekomponens képződésére hat [84]. E feltevést valószínűsíti, hogy BudR hatására a porcespecifikus PG-képzés háttérbe szorul [103]. A porc-fenotípus expressziója és a specifikus vázfehérje kialakulása között ezek szerint kapcsolat áll fenn [84].

A specifikus kollagének a porcszövet képződésében és felépítésében szintén lényeges szerepe lehet. 1-prolint egy analógjával (1-acetidin-2-karboxilsav) helyettesítve abnormis prekursor polipeptid képződik [129], amit a porcsejtek és előfutáraik visszatartanak [130]. Ez esetben a kondrogenezis gátolt, lágy, duzzadt mátrix képződik [4].

V.

A porcképződés *kauzalitására* vonatkozó adatok szegényesek. E vonatkozásban érdekes adat, hogy nanogramm mennyiségű HA a porcsejtek differenciálódását, a mesenchyma- vagy blasztémasejtek kondenzálódásának megakadályozásával, gátolja [135]. A differenciálódást megelőzően az előbbi sejtek által termelt HA endogén hialuronidáz hatására lebomlik, ezt követően a kondrogenezis is bekövetkezik [133, 135]. A HA izolált porcsejtek ChS-szintézisét, PG-jaik felhalmozódását [118] és aggregálódását [134] is gátolja. Ezek szerint a HA a porcdifferenciációban és a mátrix-termelésben reguláló szerepet tölthet be.

Porc-, ill. izomképzésre el nem kötelezett csirkeembrió végtagmesenchymát 3-acetilpiridin jelenlétében tenyésztve izomsejt-differenciáció gátlását, a porcépződés igen jelentős fokozódását észlelték [20]. E hatás nikotinamiddal megszüntethető [21]. Ezen adatok alapján a NAD hatását is vizsgálták, s annak kondrogén differenciációt elősegítő hatását tapasztalták [111].

A befolyásoló tényezők között meg kell említenünk az O_2 ellátás mértékét is, amely támasztószövetek képzésére determinált sejtek fejlődési irányát befolyásolja [5, 6], amennyiben e sejtek csökkent O_2 ellátás esetén porcsejteké differenciálódnak. Az utóbbi időkben monolayer [105] és szuszpenziós tenyészetek [100] GAG-termelésének fokozódását tapasztalták csökkent O_2 tenzió jelenlétében. Az oxigénhiányos miliő fenti hatásai feltehetően e sejtek O_2 -igénytelenségével magyarázhatók [86, 117].

Az indukáló stimulus hatásmódját számos elmélet tárgyalja. Ezek közül példaként csak URIST utóbbi időkből származó, porcdifferenciációra vonatkozó hipotéziseit [138] említem. Az egyik a „molekuláris szállítószalag” elképzelés, amely alapállománnyal körülvett mesenchymasejtek közötti induktorátvitelt lenne hivatva magyarázni. Ezt a feladatot a PG-molekula látná el. Hogy hogyan? Erre nincs magyarázat. Egy másik: az ún. „félvezető” elképzelés. E szerint a dekalcinált csontmátrix elektron-emitterként hatva elektromos áramot produkál, mely a membránokat alterálva bioszintetikus folyamatokat „bekapcsoló” áramköröket alakít ki. Érdekes, hogy a csontmátrix indukáló hatása magas töltésű elektrokemikáliákkal valóban reverzibilisen befolyásolható.

Összefoglalás

A szövettenyésztés története kezdetétől fogva összefonódott a differenciálódás vizsgálatával. Az utóbbi évek a porcsejtek tenyésztése, porcdifferenciálódás vizsgálata terén előrehaladást hoztak. A megfelelőbb in vitro feltételek kisebb sejtesoportok hosszabb, sejttömegek rövidebb ideig differenciált állapotban való megőrzését, szaporítását tették lehetővé. A tömegtenyészetek felhasználhatók egyes enzimek, anyagszereutak aktivitása és szabályozása, valamint sejt–sejt kölcsönhatások tanulmányozásához. A klóntenyészetek — kontrollálható feltételek között — a specifikus tulajdonságok megszerzése, átvitele, valamint mikrokörnyezeti hatások terén szolgáltathatnak hasznos adatokat. Az organoid tenyészetek e téren induktor hatású anyagok, befolyásoló faktorok tesztelésére, blasztémák differenciálódásának tanulmányozására használtak. A közlemény technikai jellegű irodalmat is tartalmaz.

IRODALOM

1. ABBOTT, J., HOLTZER, H.: *J. Cell Biol.* **28**, 473 (1966).
2. ABBOTT, J., HOLTZER, H.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **59**, 1144 (1968).
3. AVERY, G., CHOW, M., HOLTZER, H.: *J. Exp. Zool.* **132**, 409 (1956).
4. AYDELOTTE, M. B., KOCHHAR, D. M.: *Developm. Biol.* **28**, 191 (1972).
5. BASSETT, C. A. L.: *J. Bone Joint Surg.* **44 A**, 1217 (1962).
6. BASSETT, C. A. L., HERRMANN, I.: *Nature* **190**, 460 (1961).
7. BENOIT, J. A. A.: *C. R. Soc. Biol. Paris* **149**, 998 (1955).
8. BENOIT, J. A. A.: *J. Embryol. Exp. Morph.* **3**, 33 (1960).
9. BHATNAGAR, R. S., PROCKOP, D. J.: *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 383 (1966).
10. BIGGERS, J. D.: *Nat. Cancer Inst. Monogr.* No **11**, 1 (1963).
11. BIGGERS, J. D.: In: *Cells and tissues in culture*. Vol. **2**, 197 Ed.: E. N. Willmer. Academic Press, London—New York (1965).
12. BIGGERS, J. D., LUCY, J. A.: *J. Exp. Zool.* **144**, 253 (1960).
13. BIGGERS, J. D., GWATKIN, R. B. L., HEYNER, S.: *Exp. Cell Res.* **25**, 41 (1961).
14. BIGGERS, J. D., HEYNER, S.: *J. Exp. Zool.* **152**, 41 (1963).
15. BRETT, ROBINSON: cit.: **83**, (1971).
16. BRYAN, J.: *Exp. Cell Res.* **52**, 319 (1968).
17. CAHN, R. D.: In: *Stability of the differentiated state*. **58**, Ed.: H. Ursprung. Springer, New York (1968).
18. CAHN, R. D., COON, H. G., CAHN, M. B.: In: *Methods in developmental biology* Eds.: F. Wilt, N. K. Vesells. **493**, Crowell, New York. (1967).
19. CAHN, R. D., LASHER, R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **58**, 1131 (1967).
20. CAPLAN, A.: *Exp. Cell Res.* **62**, 341 (1970).
21. CAPLAN, A. I., ZWILLING, E., KAPLAN, N. O.: *Science* **160**, 1009 (1968).
22. CHACKO, S., ABBOTT, J., HOLTZER, H.: *J. Exp. Med.* **130**, 417 (1969).
23. COON, H. G.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **55**, 66 (1966).
24. COON, H. G., CAHN, R. D.: *Science* **153**, 1116 (1966).
25. CORVOL, M. T., MALEMUD, C. J., SOKOLOFF, L.: *Endocrinology* **90**, 262 (1972).
26. DANIEL, J. C., KOSHER, R. A., LASH, J. W., HERTZ, J.: *Cell Differentiation* **2**, 285 (1973).
27. DE LA HABA, G., HOLTZER, H.: *Science* **149**, 1263 (1965).
28. DI FERRANTE, N., DONNELLY, P. V., SAJDERA, S. W.: *J. Lab. Clin. Med.* **80**, 364 (1972).
29. ELLISON, M. L., AMBROSE, E. J., EASTY, G. C.: *J. Embryol. Exp. Morph.* **21**, 331 (1969).
30. ELLISON, M. L., LASH, J. W.: *Developm. Biol.* **26**, 486 (1971).
31. FELL, H. B.: *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B.* **112**, 417 (1932).
32. FELL, H. B.: *J. Anat.* **66**, 157 (1932).
33. FELL, H. B.: *Phil. Trans. B.* **229**, 407 (1939).
34. FELL, H. B., ROBINSON, R.: *Biochem. J.* **23**, 767 (1929).
35. FELL, H. B., CANTI, G. R.: *Arch. exp. Zellforsch.* **15**, 311 (1934).
36. FELL, H. B., CANTI, R. G.: *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B.* **116**, 316 (1935).
37. FELL, H. B., MELLANBY, E.: *J. Physiol.* **116**, 320 (1952).
38. FISCHER, A.: *J. Exp. Med.* **36**, 393 (1922).
39. FISCHER, A., PARKER, R. C.: *Arch. exp. Zellforsch.* **3**, 297 (1929).
40. FRANCO-BROWDER, S., DE RYDT, J., DORFMAN, A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **49**, 643 (1963).
41. GAILLARD, P. J.: *Protoplasma* **23**, 145 (1935).
42. GLICK, M. C., LASH, J. W., MADDEN, J. W.: *Biochim. Biophys. Acta* **83**, 84 (1964).
43. GOETINCK, P. F., PENNYPACKER, J. P., ROYAL, P. D.: *Exp. Cell Res.* **87**, 241 (1974).
44. GREEN JR., W. T.: *Clin. Orthop. Rel. Res.* **75**, 248 (1971).
45. GROBSTEIN, C.: *Exp. Cell Res.* **10**, 424 (1956).
46. GROBSTEIN, C.: *Exp. Cell Res.* **13**, 575 (1957).
47. GROBSTEIN, C.: In: *The Cell*. vol. **1**, 437 Eds.: J. Brachet, A. E. Mirsky. Academic Press, New York (1959).
48. GROBSTEIN, C.: In: *Cells and tissues in culture*. vol. **1**, 463. Ed.: E. N. Willmer. Academic Press, London—New York (1965).
49. GROBSTEIN, C., PARKER, G.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **85**, 477 (1954).
50. GROBSTEIN, C., HOLTZER, H.: *J. Exp. Zool.* **128**, 333 (1955).
51. HALL, B. K.: *Life Sciences* **8**, 553 (1969).
52. HALL, B. K.: *Biol. Rev.* **45**, 455 (1970).
53. HALL, B. K.: *Clin. Orthop. Rel. Res.* **74**, 249 (1971).
54. HAM, R. G.: *Exp. Cell Res.* **29**, 515 (1963).
55. HAM, R. G.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **53**, 288 (1965).

56. HAM, R. G., SATTLER, G. L.: *J. Cell Physiol.* **72**, 109 (1968).
57. HAM, R. G., MURRAY, L. W., SATTLER, G. L.: *J. Cell Physiol.* **75**, 353 (1970).
58. HEALY, G. M., FISCHER, D. C., PARKER, R. C.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **89**, 71 (1955).
59. HJERTQUIST, S. O., LEMPERG, R.: *Calc. Tiss. Res.* **10**, 223 (1972).
60. HOLTZER, H.: *J. Exp. Zool.* **121**, 121 (1952).
61. HOLTZER, H.: *J. Exp. Zool.* **121**, 573 (1952).
62. HOLTZER, H.: *Biophys. J.* **4**, 239 (1964).
63. HOLTZER, H., DETWILER, S. R.: *J. Exp. Zool.* **123**, 335 (1953).
64. HOLTZER, H., ABBOTT, J., LASH, J., HOLTZER, S.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **46**, 1533 (1960).
65. HOMMES, F. A., VAN LEEUWEN, G., ZILLIKEN, F.: *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 320 (1962).
66. HORWITZ, A. L., DORFMAN, A.: *J. Cell Biol.* **45**, 434 (1970).
67. KAWIAK J., MOSKALEWSKI, S., DARZYNKIEWICZ, Z.: *Exp. Cell Res.* **39**, 59 (1965).
68. KEISER, H., SANDSON, J. I.: *Arthr. Rheum.* **17**, 219 (1974).
69. KIENY, M.: *Arch. Anat. micr. Morph. exp.* **47**, 86. (1958).
70. LARSSON, S. E., KUETTNER, K. E.: *Calc. Tiss. Res.* **14**, 49 (1974).
71. LASH, J. W.: *Developm. Biol.* **6**, 219 (1963).
72. LASH, J. W.: *J. Cell Physiol.* **72**, Suppl. 1. 1, 35 (1968).
73. LASH, J., HOLTZER, S., HOLTZER, H.: *Exp. Cell Res.* **13**, 292 (1957).
74. LASH, J. W., HOLTZER, H., WHITEHOUSE, M. W.: *Developm. Biol.* **2**, 76 (1960).
75. LASH, J. W., HOMMES, F. A., ZILLIKEN, F.: *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 313 (1962).
76. LASH, J. W., GLICK, M. C., MADDEN, J. W.: *Nat. Cancer Inst. Monograph. No* **13**, 39 (1963).
77. LASHER, R., CAHN, R. D.: *Developm. Biol.* **19**, 415 (1969).
78. LAVIETES, B. B.: *Developm. Biol.* **21**, 584 (1970).
79. LAYMAN, D. L., SOKOLOFF, L., MILLER, E. J.: *Exp. Cell Res.* **73**, 107 (1972).
80. LELKES, G.: *J. Embryol. Exp. Morph.* **6**, 183 (1958).
81. LEVENSON, G. E.: *Exp. Cell Res.* **55**, 225 (1969).
82. LEVENSON, G. E.: *Exp. Cell Res.* **62**, 271 (1970).
83. LEVITT, D., DORFMAN, A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **69**, 1253 (1972).
84. LEVITT, D., DORFMAN, A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**, 2201 (1973).
85. MACPHERSON, I., MONTAGNIER, L.: *Virology* **23**, 291 (1964).
86. MARCUS, R. E. *Arthr. Rheum.* **16**, 646 (1973).
87. MARZULLO, G., LASH, J. W.: In *Experimental Biology and medicine*. vol. **1**, 213 Eds.: E. Hagen, W. Wechsler, P. Zilliken, A. F. Gardiner. Karger, Basel—New York (1967).
88. MARZULLO, G., LASH, J. W.: *Developm. Biol.* **22**, 638 (1970).
89. MATHEWS, M. B.: *Amer. Assoc. Adv. Sci.* **199** (1968).
90. MEDOFF, J.: *Developm. Biol.* **16**, 118 (1967).
91. MILLER, E. J.: *Biochemistry* **11**, 4903 (1972).
92. MILLER, E. J., LUNDE, L. G.: *Biochemistry* **12**, 3153 (1973).
93. MORGAN, I. F., MORTON, H. I., PARKER, R. C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **73**, 1 (1950).
94. MOSCONA, A.: *Exp. Cell Res.* **3**, 535 (1952).
95. MOSCONA, A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**, 410 (1956).
96. MOSCONA, A.: *Exp. Cell Res.* **22**, 455 (1961).
97. MOSCONA, A.: In: *Cells and tissues in culture*. Ed.: E. N. Willmer, vol. **1**, 489 Academic Press, London—New York (1965).
98. MOSCONA, A., TROWELL, O. A., WILLMER, E. N.: In: *Cells and tissues in culture*. vol. **1**, 19. Ed.: E. N. Willmer. Academic Press, London—New York (1965).
99. NAMEROFF, M., HOLTZER, H.: *Developm. Biol.* **16**, 250 (1967).
100. NEVO, Z., HORWITZ, A. L., DORFMAN, A.: *Developm. Biol.* **28**, 219 (1972).
101. NEVO, Z., DORFMAN, A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 2069 (1972).
102. NOGAMI, H., URIST, M. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **134**, 530 (1970).
103. PALMOSKI, M. J., GOETINCK, P. F.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **69**, 3385 (1972).
104. PARKER, R. C., CASTOR, L. N., MCCOLLOCH, E. A.: *Spec. Publ. N. Y. Acad. Sci.* **5**, 303 (1957).
105. PAWELEK, J. M.: *Developm. Biol.* **19**, 52 (1969).
106. PROCKOP, D. J., PETTENGILL, O., HOLTZER, H.: *Biochim. Biophys. Acta* **83**, 189 (1964).
107. REDDI, A. J., HUGGINS, C. B.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **69**, 1601 (1972).
108. REDDI, A. H., HUGGINS, C. B.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **71**, 1648 (1974).
109. RODEN, L.: In: *Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix*. vol. **2**, 797 Ed.: E. A. Balazs. Academic Press, London—New York (1970).
110. ROSENBERG, L., HELLMANN, W., KLEINSCHMIDT, A. K.: *J. Biol. Chem.* **245**, 4123 (1970).
111. ROSENBERG, M. J., CAPLAN, A. I.: *Development Biol.* **38**, 157 (1974).

112. SEARLS, R. L.: *Developm. Biol.* **11**, 155 (1965).
113. SEARLS, R. L., JANNERS, M. Y.: *J. Exp. Zool.* **170**, 365 (1969).
114. SHULMAN, H. J., MEYER, R.: *J. Exp. Med.* **128**, 1353 (1968).
115. SMITH, P. H.: *Connective Tiss. Res.* **1**, 181 (1972).
116. SOKOLOFF, L., MALEMUD, C. J., GREEN JR., W. T.: *Arthr. Rheum.* **13**, 118 (1970).
117. SOKOLOFF, L., MALEMUD, C. J., SRIVASTAVA, V. M. L., MORGAN, W. D.: *Fed. Proc.* **32**, 1499 (1973).
118. SOLURSH, M., VAEREWYCK, S. A., REITER, R. S.: *Developm. Biol.* **41**, 233 (1974).
119. STOCKDALE, F. E., ABBOTT, J., HOLTZER, S., HOLTZER, H.: *Developm. Biol.* **7**, 293 (1963).
120. STRANGEWAYS, T. S. P.: *Tissue culture in relation to growth and differentiation*. Heffer and Sons, Cambridge (1924).
121. STRANGEWAYS, T. S. P., FELL, H. B.: *Proc Roy. Soc. London. B.* **99**, 340 (1926).
122. STRUDEL, G.: *C. R. Soc. Biol. Paris* **147**, 132 (1953).
123. STRUDEL, G.: *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.* **18**, 260 (1953).
124. STRUDEL, G.: *C. R. Seanc. Acad. Sci.* **249**, 470 (1959).
125. STRUDEL, G.: *Develop. Biol.* **4**, 67 (1962).
126. STRUDEL, G.: *C. R. Seanc. Acad. Sci.* **254**, 2078 (1963).
127. STRUDEL, G.: *J. Embryol. Exp. Morph.* **11**, 399 (1963).
128. SVEJCAR, J., ROBERTSON, W. v. B.: *Anal. Biochem.* **18**, 333 (1967).
129. TAKEUCHI, T., PROCKOP, D. J.: *Biochim. Biophys. Acta* **175**, 142 (1969).
130. TAKEUCHI, T., ROSENBLUM, J., PROCKOP, D. J.: *Biochim. Biophys. Acta* **175**, 689 (1969).
131. TELSER, A., ROBINSON, H. C., DORFMAN, A.: *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 458 (1966).
132. TERASHIMA, Y., URIST, M. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **146**, 855 (1974).
133. TOOLE, B. P.: *Developm. Biol.* **29**, 321 (1972).
134. TOOLE, B. P.: *Science* **180**, 302 (1973).
135. TOOLE, B. P., JACKSON, G., GROSS, J.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **69**, 1384 (1972).
136. TÖRÖ, I.: *Anat. Anz.* **89**, 285 (1935).
137. UITTO, J., PROCKOP, D. J.: *Biochemistry* **13**, 4586 (1974).
138. URIST, M. R., DOWELL, T. A., HAY, P. H., STRATES, B. S.: *Clin. Orthop. Rel. Res.* **59**, 59 (1968).
139. URIST, M. R., NOGAMI, H.: *Nature* **225**, 1051 (1970).
140. URIST, M. R., IWATA, H.: *J. theor. Biol.* **38**, 155 (1973).
141. URIST, M. R., IWATA, H., CECCOTTI, P. L., DORFMAN, R. L., BOYD, S. D. McDOWELL, R. M., CHIEN, C.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **70**, 3511 (1973).
142. WATTERSON, R. L., FOWLER, I., FOWLER, B. J.: *Am. J. Anat.* **95**, 337 (1954).
143. WEISS, P., AMPRINO, R.: *Growth* **4**, 245 (1940).
144. WEISS, P., MOSCONA, A.: *J. Embryol. Exp. Morph.* **6**, 238 (1958).