

NYUGVÓ ÉS REGENERÁLÓ MÁJAKBÓL SZÁRMAZÓ PEPTIDKOMPONENSEK ÉS EZEK BIOLÓGIAI HATÁSÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA

MARCSEK ZOLTÁN, GRÓF JÓZSEF
és MENYHÁRT JÁNOS, az orvostudományok doktora

Közlésre érkezett: 1978. VIII. 17.

A májsejtproliferáció szabályozására és a májregeneráció indukálására vonatkozó megfigyelések alapján májeredetű endogén inhibitorok (Deschamps és Verly 1975, Menczel és mtsai 1976, Onda és Yoshikawa 1975, Simard és mtsai 1974, Verly és mtsai 1971) és stimulátorok (Fischer és mtsai 1971, Fred és Sorof 1966, Morley és Kingdom 1973, Morley 1974) létezése egyaránt feltételezhető. Ennek ellenére a proliferáció szabályozás molekuláris vizsgálatára vállalkozó, újabb keletű kutatások többsége egyoldalú előnyben részesíti az inhibitorokkal történő szabályozás gondolatát, és indokolatlanul kevés figyelmet szentel a stimulátorok szerepének, illetve a kettős kontroll alatt álló szabályozás lehetőségének. Az érdeklődés aránytalanságában szerepet játszik az utóbbi időben fokozatosan tért hódító kalon-koncepció (Bullough 1973, Iversen 1967, Thornley és Laurence 1975) megalapozatlanul általánosító, konzervatív értelmezése, amely a proliferáció, negatív visszacsatolás elvén megvalósuló, csak inhibitorokkal történő szabályozásnak kizárólagos szerepet tulajdonít. Noha a kalon-koncepció alapján feltételezett, sejtvonalspecifikus inhibitor anyagok elméleti fontossága vitathatatlan, a daganat-terápiával kapcsolatos potenciális jelentősége (Rytöma és mtsai 1976, Rytöma és mtsai 1977) pedig nyilvánvaló, a stimulátorok létezésére utaló megfigyelések semmibevétele a szabályozás valódi természetének félreismerése mellett azt is eredményezheti, hogy elhanyagoljuk az elméletileg és gyakorlatilag egyenrangú fontosságú, stimulátor hatásokat közvetítő, természetes szabályozó anyagok kutatását.

Aligha szorul bővebb bizonyításra, hogy egy osztódási nyugalomban, illetve aktív osztódásban levő sejteket tartalmazó, homológ szövetben jelenlevő, endogén szabályozó anyagok mennyiségének vagy/és minőségének, és így az általuk közvetített biológiai hatások eredőjének is — a szövet osztódási aktivitása aktuális mértékének függvényében — különböznie kell. E megfontolás mellett vizsgálataink irányát a proliferáció endogén regulátorainak peptid természetére utaló megfigyelések és kísérleti adatok (Morley 1974, Verly és mtsai 1971) is meghatározták. A fentiekre alapozott kísérleti tervek megvalósítása során nyert eredményekre támaszkodva, jelen közleményünkben a mitotikusan nyugvó, illetve részleges májirtással fokozott osztódásra

készített sejtekből álló májak vizes kivonataiból részlegesen tisztított peptid komponensek kromatográfiás mintázatainak és az egyes frakciókban talált anyagoknak a DNS-, RNS- és fehérje-szintézisre, valamint Novikoff hepatoma és NK/Ly ascites sejtek proliferációjára gyakorolt hatásainak összehasonlító vizsgálatával szerzett tapasztalatainkat foglaljuk össze.

A kísérleti módszerek ismertetése

Kísérleti állatok: vizsgálatainkhoz 150–200 g testsúlyú, ivarérett, hím és nőstény CFY patkányokat (LATI) használtunk.

Műtéti eljárások: a májak részleges eltávolítása éter narkózisban, minden esetben 1/2 9 és 1/2 10 óra között, Higgins és Anderson (1931) szerint történt. A műtét időpontjában eltávolított, osztódási nyugalomban levő sejteket tartalmazó májak képezték a kontroll (K), a 24 órával a részleges májirtást követően eltávolított, aktív osztódásban levő sejteket tartalmazó májak pedig a regeneráló (R) szövetből előállítható regulátor anyagok forrását.

Szövetkivonatok készítése: a K és az R májak feldolgozása azonos eljárással történt. A májakat, közvetlenül eltávolításuk után, négyszeres mennyiségű jégheideg desztillált vízzel 1500/perc fordulatszámmal, 3 percig homogenizáltuk jégbe merített, teflon-üveg homogenizátorral. A homogenizátumokat 4 réteg steril gézen szűrtük, és ezt követően 30 percig 23000 g-vel, majd 90 percig 135000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszót, különösen a regeneráló májak feldolgozásánál feltűnő mennyiségben jelentkező zsírnemű anyagok eltávolítása érdekében, laza vattát tartalmazó üvegtölcséren öntöttük át. Az így előkészített felülúszók képezték a kromatográfiás szeparációs lépések kiinduló anyagait.

Elválasztási technikák: a szövetkivonatok komponenseinek kromatográfiás szétválasztása során lényegileg Gróf és munkatársai a biológiai folyadékok peptidkomponenseinek elválasztására bevezetett, kombinált eljárását követjük (Gróf és mtsai 1974, Menyhárt és Gróf 1977).

1. Ioncserélő kromatográfia: a K és R kivonatokból előzőek szerint előállított és megközelítően azonos fehérjemennyiséget tartalmazó felülúszó 50 ml-ét, előzetesen 0,1 M ecetsavval egyensúlyba hozott DOWEX 50 W–X12 kationcserélő oszlopra (2,6×40 cm) vittük fel, majd 0,1 és 0,5 M ecetsavval, 5,0 ml/min. átfolyási sebesség mellett eluáltuk. Az eluátumok optikai aktivitását két, sorba kapcsolt rendszeren mértük; 280 nm-es transzmissziót UVICORD II. (LKB) fotométerrel, 240 nm (ill. gélkromatográfia esetén 220 nm) hullámhosszon PMQ II. (OPTON) automata spektrofotométerrel extinciót mértünk, melyeket folyamatosan lineárisan regisztráltunk. Az OPTON rendszer átfolyó küvettájának fényúthossza 1 cm, az LKB rendszeré pedig 0,3 cm volt. Az egyes kromatográfiás csúcsoknak megfelelő frakciókat egyesítettük, majd liofilizáltuk.

2. Gélkromatográfia:

a) *változat*: a fentiek szerint nyert liofilizátumokat 2,5 ml deszt. vízben oldottuk és SEPHADEX G-25 (superfine) géllal töltött oszlopra ($2,6 \times 100$ cm) vittük, majd 0,02 M foszfátpufferrel, 0,5 ml/perc átfolyási sebesség mellett eluáltuk. Az eluátum 220 és 280 nm-en mért optikai aktivitásának mérése és az eluátum kezelése mindenben megegyezett az ioncserélő kromatográfiánál leírtakkal. Az eljárást SEPHADEX G-10-en, „batch” technikával végzett sótalánítással fejeztük be.

b) *változat*: más esetekben a vizes szövetkivonatokat 80%-os (g/vol.) végkoncentrációjú etanollal fehérjéltlenítettük, illetve extraháltuk. Az alkoholos kivonatot bepároltuk, a visszamaradó anyagokat 2,5 ml desztillált vízben oldottuk, majd SEPHADEX G-25 (superfine) géllal töltött oszlopra ($2,6 \times 100$ cm) vittük fel, és az a) változat szerint eluáltuk. Az eluátumokat SEPHADEX G-10 géllal végzett rekromatografálással sótalánítottuk, s a szétválasztott frakciókat külön gyűjtöttük és liofilizáltuk.

Kémiai eljárások:

A kromatográfiásan szétválasztott frakciók peptid tartalmának bizonyítása a mintákban savanyú hidrolízis (6 N HCl, 100 C°, 24 óra) után megjelenő aminosavak papírkromatográfiás kimutatásával történt (Whatman 3 MM papír, butanol:víz:jégecet 3:1:1; előhívás ninhidrinnel). Az eluatumok peptid-komponenseinek mennyiségi meghatározása Folin-reagenssel (Lowry és mtsai 1951), a szabad aminoscsoportok mennyiségi meghatározása pedig ninhidrin reakcióval történt.

Biológiai tesztrendszerek:

1. DNS, RNS és fehérje prekursorok beépülésének mérése.

10 ml-es üvegedényekbe mért 10 μ l médiumban 20 μ g fehérjét tartalmazó teszt anyagra 0,5 ml, 4 C°-os, F 199 szövettenyésztő médiumot mértünk, amelybe 24 órás regeneráló patkánymájából (illetve vesékből), házilag készített eszközökkel preparált, 7–8 db. mikroszövethasábot ($1 \times 1 \times 3$ mm) helyeztünk. A kontroll preparátumok 10 μ l mennyiségű, az előzőekben leírt módon sótalánított, eredetileg 0,02 M koncentrációjú foszfát puffert tartalmaztak. A kónuszukon levehető és légmentesen záró gumisapkával ellátott, két injekciós tűvel átszúrt gumidugóval zárható edények gázterét a tűkön keresztül 5% CO₂-ot és 95% O₂-t tartalmazó gázkeverékre cseréltük ki. Ezt követően Hamilton mikrofecskendővel — melynek tűjét a gumidugó egyik injekciós tűjén keresztül az edénybe vezettük — 5 μ l-ben 5 μ Ci ³H-uridint, és 0,02 μ Ci ¹⁴C-leucint tartalmazó keveréket fecskendeztünk az inkubáló médiumba. 15 perces „hideg” (4 C°) inkubálás után, 37 C°-on végzett 30 perces,

majd 10 μl -ben 5 μCi ^3H -TdR-t tartalmazó medium befecskendezését követően további 20 perces rázatással (100 min^{-1} frekvencia) kombinált inkubálás következett. Az inkubációs periódus végén, a médium leöntése után 3 ml, jéghideg TCA-t pipettáztunk a szövetkubusokra. Homogenizálást és centrifugálást követően a csapadékot háromszor jéghideg TCA-val, egyszer etanol-éter 3:1 arányú keverékével, és egyszer éterrel mostuk. A mosásokat a csapadék centrifugacsőben végzett reszuszpendálásával végeztük.

Az előbbiek szerint előkezelt mintákból a DNS, RNS és fehérje szétválasztása az alábbiak szerint történt: az RNS-t szobahőmérsékleten 18 órán át, 0,5 M KOH-al hidrolizáltuk, majd a lúggal azonos térfogatú 0,75 M HClO_4 -el történő savanyítással a DNS-t és a fehérjét lecsaptuk. Centrifugálás után a felülúszót megtartottuk, és a csapadékot háromszor mostuk pontosan bemért mennyiségű desztillált vízzel, majd az eredeti felülúszót s a mosófolyadékot egyesítettük (I. felülúszó). A csapadékot, 2,5 M KOH jelenlétében 90 percig 90 $^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőbe (fehérje-hidrolízis), majd 3,0 M végkoncentrációjú HClO_4 jelenlétében, 15 percen át forró vízfürdőbe helyeztük (DNS hidrolízis). A centrifugálás után nyert II. felülúszóból ^3H -(DNS) és ^{14}C -(fehérje), az I. felülúszóból pedig ^3H -energiájú (RNS) sugárzást mértünk. A radioaktivitás mérése 5 ml szcintillációs folyadékba (Instagél) mért 500 μl mintával, 29% (^3H), illetve 65% (^{14}C) hatásfokkal történt. A fehérjét ninhidrinnel, valamint Lowry szerint (Lowry és mtsai 1951), a DNS-t Burton szerint (Burton 1965), az RNS-t pedig orcin reakcióval (Brown 1946) határoztuk meg. A radioaktivitás és a kémiai mérések eredményei alapján a DNS, RNS és fehérje-szintézis intenzitását reprezentáló specifikus aktivitásokat számítottunk.

2. Sejtproliferáció mérése:

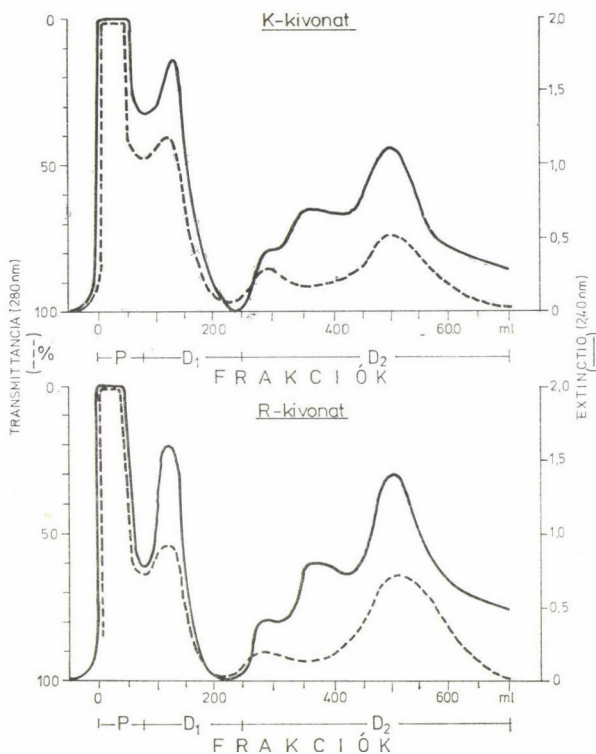
20% lószérummal kiegészített Fisher médiumban tenyésztett NK/Ly ascites és Novikoff hepatoma sejtek számában 24 óra alatt bekövetkező változás mérésével történt. A vizsgált anyagokat 10,20 és 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fehérjére számított koncentrációban adtuk a tenyészetekhez. A sejtek számolását Bürker kamrában, mikroszkóp alatt, 1200-szoros nagyítás mellett végeztük.

Eredmények

1. A K és R típusú kromatogramok összehasonlító elemzése.

A K és R májak kivonatainak ioncserélő oszlopon nyert, 240 és 280 nm-en folyamatosan regisztrált kromatogramján említésre méltó kvalitatív különbségek nem mutatkoztak (1. ábra). Mindkét kivonatból egy, a kivonat fehérje komponenseit reprezentáló (jelen vizsgálat során tovább nem analizált), P frakció mellett, egy 0,1M ecetsavval eluálható, mindkét hullámhosszon elnye-

lést mutató, viszonylag homogén D_1 -frakció és egy 0,5M ecetsavval eluálható, a K és R kivonatokban hasonló mintázatú, de nyilvánvalóan heterogén összetételű D_2 frakció volt elkülöníthető. A kémiai analízis szerint a K és R kivonatok D_1 és D_2 frakciója egyaránt peptid-komponenseket tartalmazott.

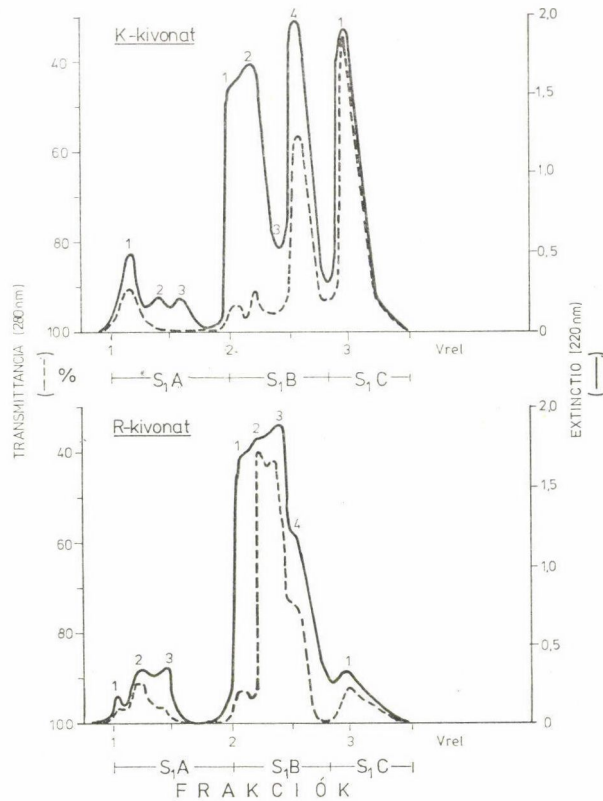


1. ábra. Kontroll (K) és regeneráló (R) patkánymájak vizes kivonatának DOWEX 50 W—X12 gyantával töltött oszlopon nyert kromatogramja. A P betű a (vizsgálatra nem került) fehérje, a D_1 és D_2 a (vizsgálatra került) peptidtartalmú frakciók jelzése

A D_1 frakciók liofilizátumának 220 és 280 nm-en folyamatosan regisztrált SEPHADEX G-25 gélkromatográfiás profilja látható a 2. ábrán. A biológiai aktivitás mérése az ábrán látható S_1A , S_1B és S_1C frakciókkal történt.

Mind a K, mind az R kivonatból származó S_1A frakciókban három komponens volt elkülöníthető, amelyek közül — V_{rel} alapján számolva — a K kivonat 1 komponense az R kivonat 2 komponensével, a K kivonat 2 komponense az R kivonat 3 komponensével identikusnak tekinthető. A K kivonat 280 nm-en elnyelést mutató anyagot nem tartalmazó 3. és az R kivonat 1 komponense viszont kizárólagosan csak a K, illetve az R kivonatokban voltak jelen.

A K és R kivonatok S_1B frakciói profiljainak eltérései feltűnőbbek. A frakciók heterogenitása mindkét esetben nyilvánvaló. Ezen belül azonban —

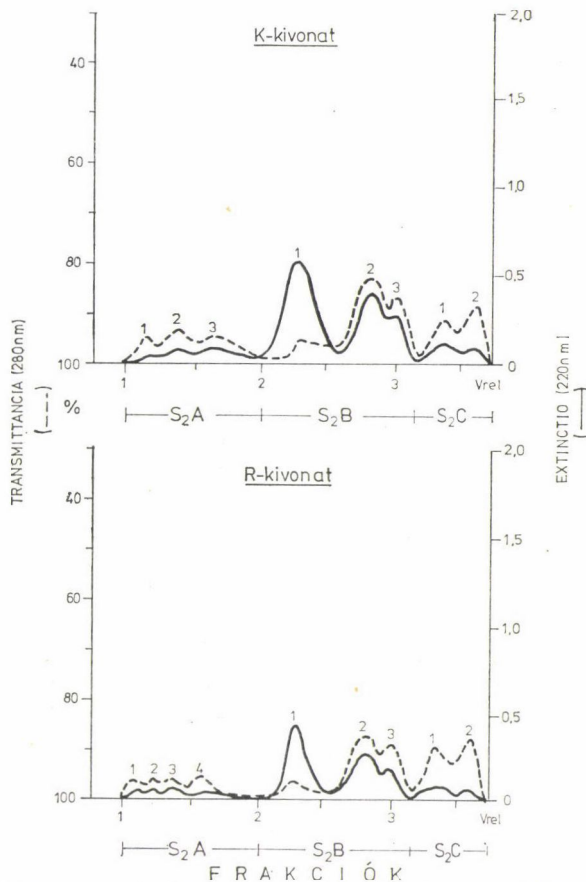


2. ábra. Kontroll (K) és regeneráló (R) patkánymájak vizes kivonatából, ioncserélő kromatográfiával előállított D₁ frakciók SEPHADEX G-25 géllal töltött oszlopon nyert 280 (transzmittancia) és 220 (extinkció) nm.-en szimultán regisztrált kromatogramjai. S₁A, S₁B és S₁C a biológiai teszteszre került frakciók, a kromatogramokon föltüntetett számok pedig a frakciók komponenseinek jelzései. A transzmittancia és az extinkció skálák egymáshoz viszonyítva nem léptékarányosak

kvantitatív és kvalitatív — különbségek mutatkoznak. A K és R kivonat S₁B frakciójának komponensei között fennálló legfeltűnőbb különbség a 280 nm-on abszorbeáló komponensek viszonylagos hiánya a K kivonatban. Amíg az R kivonatban legnagyobb mennyiségben a komponens mindkét hullámhosszon abszorbeáló anyagai voltak jelen, a K kivonat 3 komponense az S₁B frakció legkisebb mennyiségben jelenlevő anyagait reprezentálták. Végül megállapítható, hogy a 4-es komponens K kivonatban jelenlevő anyagainak mennyisége jelentősen meghaladja az R kivonatban található hasonló anyagok mennyiségét.

A K és R kivonat csaknem homogén S₁C frakcióiban csak kvantitatív különbségek találhatóak: a K kivonatból nyert S₁C frakció mennyisége kb. hatszorosa az R kivonat identikus frakciójának.

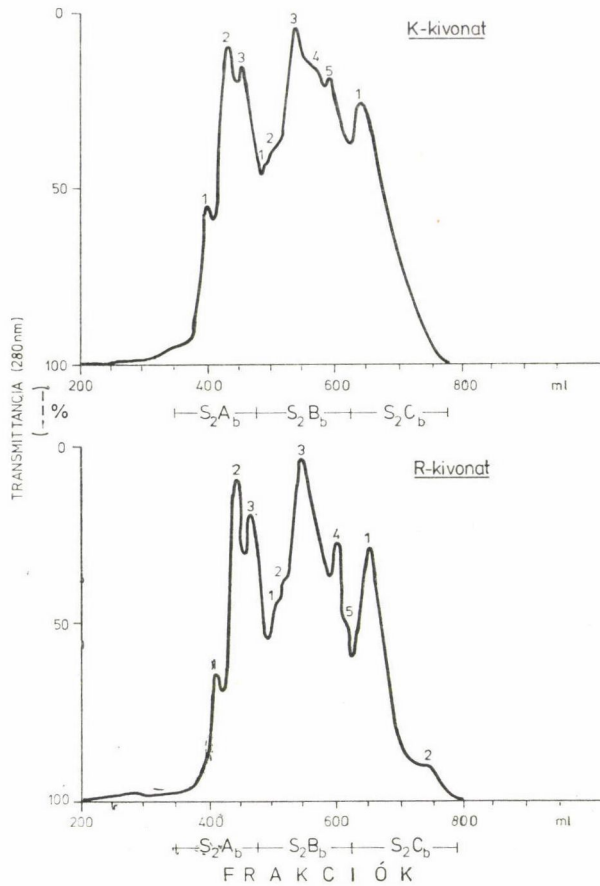
A D_2 frakció liofilizátumának géلكromatográfiával nyert profiljait a 3. ábrán mutatjuk be, ahol az S_2A , S_2B és S_2C frakciók gyűjtése a fentiekben ismertetett módon történt. A K kivonat S_2A frakciója kevesebb komponenst tartalmazott, mint az R kivonat azonos frakciója. A két kivonat S_2B és S_2C frakcióinak komponensei — a V_{rel} -ok alapján megítélve — azonosaknak tekinthetők.



3. ábra. Kontroll (K) és regeneráló (R) patkánymájak vizes kivonataiból, ioncserélő kromatográfiával előállított D_2 frakciók SEPHADEX G-25 géllal töltött oszlopon nyert 280 (transzmittancia) és 220 (extinkció) nm.-en szimultán regisztrált kromatogramjai. S_2A , S_2B és S_2C a biológiai tesztelésre került frakciók, a kromatogramokon fölűntetett számok pedig a frakciók komponenseinek jelzései. A transzmittancia és az extinkció skálák egymáshoz viszonyítva nem léptékarányosak

A géلكromatográfia b) változatával kapott, 220 nm-en regisztrált mintázatát a 4. ábrán mutatjuk be.

A K és R kivonatokból nyert S_2A_b frakciók egyaránt három, kromatográfiásan azonosan viselkedő, egymástól mennyiségileg is csak lényegtelenül különböző komponensből álltak. Ugyanakkor a K és R eredetű S_2B_b frakciók



4. ábra. Kontroll (K) és regeneráló (R) patkánymájak vizes kivonatából nyert alkoholos extraktumának a SEPHADEX G-25 gélkromatográfia *b*) változatával előállított, 280 nm.-en (transzmittancia) regisztrált kromatogramjai. S_2B_b és S_2C_b a biológiai tesztelésre került frakciók, a kromatogramokon levő számok pedig a frakciók komponenseinek jelzései

egyaránt öt komponenst tartalmaztak, melyek közül a K eredetű 4. és R eredetű 5. komponensek, kromatográfiai ismervek alapján, a heterológ frakciók azonos számozású komponenseitől különböző anyagféleségeket tartalmazó összetevőknek látszanak.

2) A gélkromatográfiával nyert frakciók biológiai hatásai:

a) Hatás a DNS szintézisre (3H -TdR inkorporáció).

Az egyes kromatográfiai frakciók DNS szintézisre gyakorolt hatásainak vizsgálata előtt, tesztrendszerünk reaktivitásának ellenőrzésére jelzett prekursoroknak makromolekulákba történő beépülését vizsgáltuk a DNS szintézist specifikusan gátló hidroxürea (HU) jelenlétében (1. táblázat).

I. Táblázat

HU (μ M test)	Szintézis (00) %		
	DNS	RNS	Fehérje
0,1	- 3	+10	+7
0,25	-41 (!)	+ 7	-2
0,50	-49 (!)	+11	+7

Tesztrendszerünk reaktivitását bizonyította, hogy HU jelenlétében kizárólag a 3 H-TdR DNS-be történő beépülése csökken ($< 0,1 \mu$ M koncentrációknál), míg az RNS-be és fehérjébe történő prekursor inkorporáció szignifikánsan nem változott.

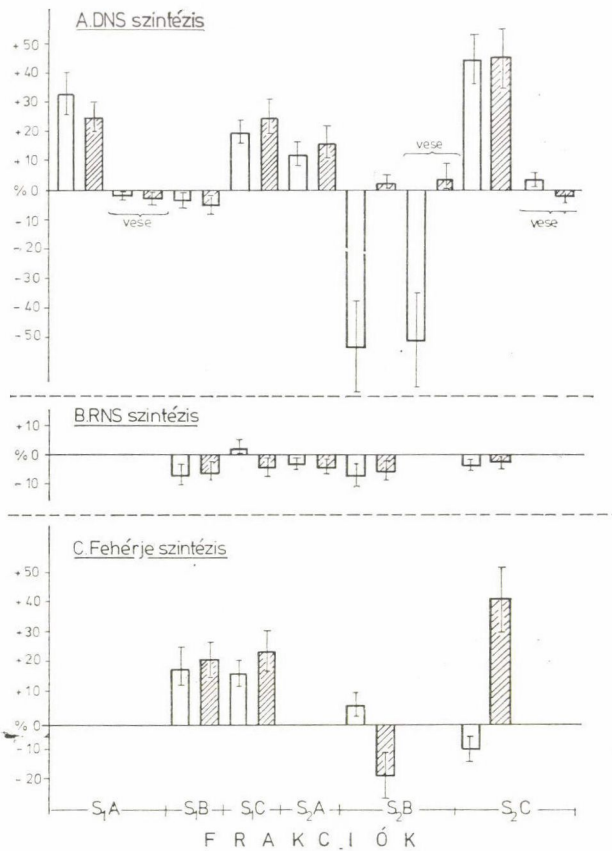
Az egyes frakciók DNS szintézisre gyakorolt hatásait az alábbiak szerint foglalhatjuk össze: az S_2B frakciók kivételével nem volt különbség a K és R kivonatokból származó gélkromatográfiás frakciók DNS szintézisre gyakorolt hatásában (5. ábra): mindkét kivonat S_1A , S_1C , S_2A és legintenzívebben S_2C frakciói stimulálták, az S_1B frakciók pedig lényegileg nem befolyásolták a regeneráló májából preparált mikro-szövethasábok in vitro DNS szintézisét. Ezzel szemben feltűnő különbségek mutatkoztak a K és R kivonatokból szeparált S_2B frakciók DNS szintézisre gyakorolt hatásai között: amíg a K-kivonatok frakciói a DNS szintézist drasztikusan csökkentették (-52%), az R-kivonatok homológ frakciói a DNS szintézist egyáltalán nem befolyásolták.

A stimulátor és inhibitor hatások szövet, illetve sejtvonalspecifikus természetének eldöntésére megvizsgáltuk a két kivonat egyaránt stimuláló hatású S_1A és S_2C , valamint a két kivonat eltérően viselkedő S_2B frakcióinak, a 48 órával előbb féloldali nefrektómiával hipertrófiára kényszerített kontralaterális vesékből készített mikro-szövethasábok in vitro DNS szintézisére gyakorolt hatásait is (5. ábra). A K, illetve R típusú S_1A és S_1C frakciók hatástalanok voltak a vesék DNS szintézisére; az S_1B frakciók viszont, a máj DNS szintézisére gyakorolt hatásaikkal megegyezően, a vesék DNS szintézisét is gátolták.

A DNS szintézisre gyakorolt hatások mellett elvégeztük a frakciók RNS- és fehérje-szintézisre gyakorolt hatásainak vizsgálatát is. A legkisebb mennyiségben szeparálható A-frakciókat már a DNS szintézis vizsgálatánál felhasználtuk. Ezért az S_1A frakciónak az RNS és fehérje, az S_2A frakciónak pedig a fehérje-szintézisre gyakorolt hatásainak vizsgálatára nem kerülhetett sor.

b) Hatás az RNS szintézisre

A vizsgált frakciók — beleértve a DNS szintézist legkifejezettebben befolyásoló S_2B és S_2C frakciókat is — a regeneráló májszövet in vitro RNS szintézisre gyakorlatilag hatástalanok voltak (5. ábra).



5. ábra. Kontroll (üres oszlopok), és regeneráló (satírozott oszlopok) patkánymájak vizes kivonatából SEPHADEX G-25 gélkromatográfia a) változatával előállított frakciók 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Lowry pozitív anyagot tartalmazó dózisainak in vitro hatása máj- és veseszövetek DNS, valamint májszövet RNS és fehérje-szintézisére. Az ábra alján a vizsgált frakciók jelzései láthatók. Az oszlopok a kontroll értékektől való százalékos eltéréseket mutatják; a pozitív (+) értékek stimulációt, a negatív (-) értékek gátlást jelentenek. Az oszlopokon látható függőleges vonalak a standard deviációt mutatják

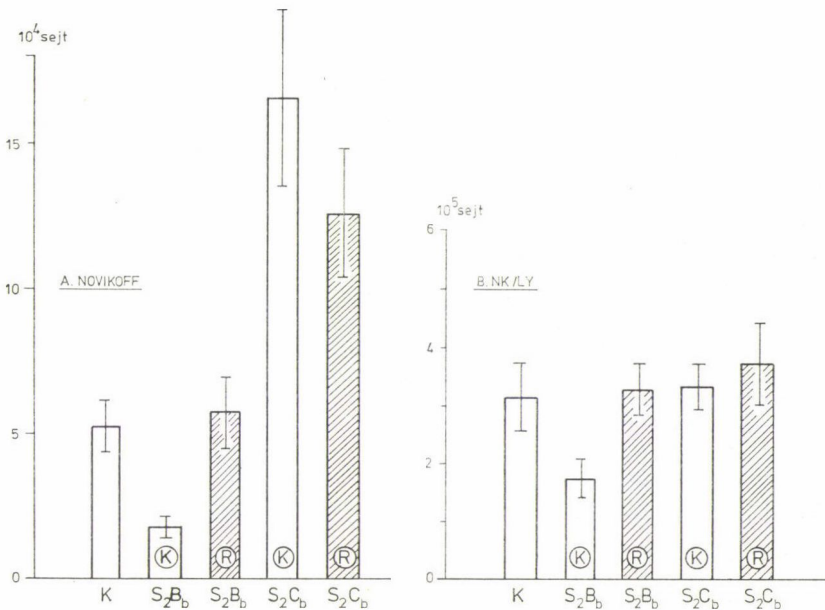
c) Hatás a fehérje szintézisre

A DNS és RNS szintézisre gyakorlatilag hatástalan S₁B, valamint a DNS szintézist stimuláló és az RNS szintézisre hatástalan S₁C frakciók egyaránt és hasonló mértékben stimulálták a regeneráló májszövet in vitro fehérje-szintézisét, tekintet nélkül arra, hogy K vagy R típusú frakciókról volt-e szó. Ezzel szemben a K és R típusú S₂B és S₂C frakciók differenciálisan hatottak a májszövet fehérje-szintézisére: a DNS szintézist a májban intenzíven csökkentő K típusú S₂B frakció, ha csak kis mértékben is, de stimulálta, az R típusú pedig szignifikánsan gátolta a máj fehérje-szintézisét. A DNS szintézist a májban intenzíven stimuláló K típusú S₂C frakció gyakorlatilag

hatástalan volt a máj fehérje-szintézisére, míg a máj DNS szintézisét stimuláló, R típusú homológ frakció a máj fehérje-szintézisét is jelentősen stimulálta (+ 43%).

d) Hatás a sejtproliferációra

A SEPHADEX gélkromatográfia b) változatával előállított S_2A_b frakció K és R típusa az NK/Ly ascites és a Novikoff hepatoma sejtek proliferációját egyformán kis mértékben (-16%) gátolta. Ezek a frakciók tehát nem tartalmaztak differenciálisan ható anyagokat. Ugyanakkor az S_2B_b és S_2C_b frakciók sejtproliferációra gyakorolt hatásai lényegi hasonlóságot mutattak a SEPHADEX gélkromatográfia a) változatával nyert S_2B és S_2C frakciók DNS szintézisére gyakorolt, differenciális hatásaival. Mint láttuk, a K kivonatból nyert S_2B frakció a máj- és a veseszövet DNS szintézisét egyaránt gátolta, az R kivonat azonos frakciója pedig mindkét szövetféleségen hatástalannak bizonyult (6. ábra). Hasonlóképpen a K kivonatból a SEPHADEX gélkromatográfia b) változatával előállított S_2B_b frakció az NK/Ly ascites és a Novikoff hepatoma tenyészetek proliferációját egyaránt gátolta, az R kivonat identikus frakciója pedig mindkét sejtenyészetben hatástalan volt (6. ábra).



6. ábra. Kontroll (K) és regeneráló (R) patkánymájak vizes kivonatából SEPHADEX G-25 gélkromatográfia b) változatával előállított S_2B_b és S_2C_b frakciók 20 $\mu\text{g/ml}$ Lowry pozitív anyagot tartalmazó dózisainak hatása a Novikoff hepatoma (az ábra A. része) és az NK/Ly ascites sejtek (az ábra B. része) proliferációjára. Az oszlopok a tenyésztő médium 1 ml.-ében levő sejtek számában, a tenyésztés első 24 órájában bekövetkező növekedést mutatják (kiindulási sejttség: $4,7 \times 10^4$ sejt/ml). Az oszlopokon látható függőleges vonalak a standard deviációt tüntetik föl

Mint ahogy a K és R kivonatokból mindkétféle eljárással előállított frakciók a kétféle szövet, illetve sejtenyészet DNS szintézisére, illetve proliferációjára, K vagy R eredetüktől függően bár differenciálisan, de azonos módon hatottak, e hatásokat nem tekinthetjük szövet-, illetve sejtvonalspecifikus hatásoknak.

A K és R kivonatokból a SEPHADEX géلكromatográfia két változatával előállított S_2C illetve S_2C_b frakciók a kétféle szövet, illetve sejtenyészet DNS szintézisére, illetve proliferációjára ugyancsak differenciálisan fejtették ki hatásukat. Mind a K, mind az R kivonatokból az *a*) változat szerint preparált S_2C frakciók stimulálták a májszövet DNS szintézisét, és hatástalanok voltak a veseszövet DNS szintézisére (5. ábra). Ezzel megegyezően, a K és az R kivonatokból a *b*) változat szerint nyert S_2C_b frakciók stimulálták a Novikoff hepatoma sejtek proliferációját, ugyanakkor hatástalanok voltak az NK/Ly ascites sejtek proliferációjára (6. ábra). Mivel az említett, májeredetű frakciók csak a májszövet, illetve hepatoma tenyészetek DNS szintézisét, illetve proliferációját stimulálták, a veseszövetre, illetve NK/Ly ascites tenyésztetre viszont hatástalanoknak bizonyultak, a frakciók hatásának szövet, illetve sejtvonalspecifikus természetét valószínűnek tarthatjuk.

Megbeszélés

Az emlős szervezetek megújuló sejtpopulációiból álló szöveteinek egymástól nagyságrendekkel eltérő mitotikus aktivitása (Bertalanffy 1969) vagy az indukált DNS szintézisnek, sejtproliferációnak elsősorban az érintett szövetre lokalizált megjelenése (Weinbren és Fritschen 1959) egyaránt arról árulkodik, hogy a sejtproliferáció szabályozása szövetenként egyedileg, azaz szövet-, illetve sejtspecifikusan történik. Ebből következik, hogy a sejtproliferáció szabályozásában szövet-, illetve sejtvonal specifikus regulátorok, vagy legalábbis olyanok vesznek részt, amelyek szövet-, illetve sejtspecifikus folyamatokat indukálnak. Másrésztől feltételezhető, hogy a K májakban jelenlevő és belőlük kivonható regulátor anyagok mennyisége vagy minősége, és így biológiai hatása is különbözik az R májakban találhatóaktól. Ennek megfelelően a részleges májirtás időpontjában eltávolított, osztódási nyugalomban levő sejtekből álló májszövetből, majd ugyanennek a májnak parciális hepatektomiával fokozott osztódásra készített sejteket tartalmazó, 24 óra múlva eltávolított maradékából kivonható regulátor anyagok természetének és hatásainak összehasonlító vizsgálata ideális (önkontrollos) kísérleti feltételeket jelent egyrészt a mitotikus homeosztázist a nyugvó májban fenntartó, másrészt a májsejtek fokozott proliferációját a regeneráló májban kiváltó hatóanyagok, röviden a májsejtproliferáció fiziológias regulátor anyagai tanulmányozásában. A K és R májából előállítható frakciók bármilyen tulajdonságában mutatkozó különbségek mindenekelőtt azért érdemelnek különös figyel-

met, mert legvalószínűbben a különbségeket felmutató komponensek tartalmazhatják a májsejtproliferációt fiziológiásan szabályozó anyagféleségeket.

Mint láttuk, a K és R típusú gélkromatográfiás profilok identikus szakaszai számos, nem egyszer feltűnő eltéréseket mutattak. A K és R eredetű S_1B frakciókban elsősorban a kvalitatív, az S_1C , S_2B és S_2C frakciókban elsősorban a kvantitatív különbségek domináltak. E profilbeli különbségekhez azonban általában nem csatlakoztak a biológiai hatások különbségei. A K és R eredetű S_1A , S_2B , S_1C és S_2A frakciók DNS, RNS és fehérjeszintézisre gyakorolt hatásaiban említésre méltó különbségek nem mutatkoztak. Ennek alapján kizárható az a lehetőség, hogy ezek a frakciók a proliferáció fiziológiás szabályozásában szerepet játszó hatóanyagokat tartalmaznak. Kivételt képeznek mindenekelőtt az S_2B és részben az S_2C frakciók, amelyek — mivel a DNS és a fehérje szintézist, K vagy R eredetüktől függően, különbözőképpen befolyásolták — megfelelnek a fiziológiás szabályozó anyagokat tartalmazó frakciókkal szemben támasztható követelményeknek. A K eredetű S_2B és S_2B_b frakciók a májszövet DNS szintézisét (5. ábra), illetve a Novikoff hepatoma tenyészetek proliferációját (6. ábra) erőteljesen gátolták, viszont az R eredetű identikus frakciók ilyen hatásokat nem közvetítettek. Ezt a megfigyelést úgy értelmezhetjük, hogy míg a mitotikusan nyugvó májból izolált komponens inhibitor anyagot tartalmaz, addig a proliferáló májszövetben a szóban forgó inhibitor eliminálására vagy hatásának semlegesítésére kerül sor. Az S_2B és S_2B_b frakciók hatása azonban nem volt szövet, illetve sejtvonalspecifikus: a vese- és májszövet DNS szintézisét, valamint az NK/Ly ascites és a hepatoma tenyészetek proliferációját egyaránt gátolta. Irodalmi adatok szerint más szövetekből, többek között veséből is előállíthatók nem szövetspecifikus, pl. a májon is hatásos inhibitor kivonatok (Volm és mtsai 1973). Ennek alapján elképzelhető, hogy a DNS szintézis, illetve a sejtproliferáció nyugalmi értékének fenntartásában minden szövet-, illetve sejtféleségben megtalálható, nem szövetspecifikus inhibitor molekulák vesznek részt. A proliferáció szövetspecifikus indukálhatósága közelebbi természetének megértéséhez az S_2C és S_2C_b frakciók tulajdonságait kell figyelembe vennünk. Mint láttuk, a K és R eredetű S_2C és S_2C_b frakciók egyaránt és csaknem azonos intenzitással stimulálták a májszövet DNS szintézisét (5. ábra) és Novikoff hepatoma tenyészetek proliferációját (6. ábra), ugyanakkor azonban hatástalanok voltak a vese-szövet DNS szintézisére (5. ábra) s az NK/Ly ascites tenyészetek proliferációjára (6. ábra). E frakciók hatása tehát szövet, illetve sejtvonalspecifikusnak tekinthető.

Ezek alapján a máj mitotikus homeosztázisának, valamint proliferációja szövetspecifikus indukálásának szabályozása a következőképpen vázolható fel. A mitotikusan nyugalomban levő májokban nem szövetspecifikus inhibitor (S_2B és S_2B_b frakció) s egy, ezzel egyensúlyt tartó, az inhibitor hatását semlegesítő, szövetspecifikus stimulátor (S_2C és S_2C_b frakció) anyagok együttesen

gondoskodnak a mitotikus nyugalmi állapot, a homeosztázis fenntartásáról. A proliferációs inger hatására a nem szövetspecifikus inhibitor eddig ismeretlen mechanizmussal eliminálódik, vagy hatása semlegesítődik. Ily módon a szövetspecifikus stimulátor hatása — a vele egyensúlyt tartó, nem szövetspecifikus inhibitor hiányában — túlsúlyra kerül, s a DNS szintézis stimulálásával szövetspecifikus proliferációs választ indukál.

Valamennyi gélkromatográfiás frakció gyakorlatilag hatástalan volt az RNS szintézisre (5. ábra). Ezt kétféleképpen értelmezhetjük. Egyrészt elképzelhető, hogy — egyezően azokkal az adatokkal, melyek a fokozott RNS szintézist a májregeneráció korai szakaszára tartják jellemzőnek (Fujoka és mtsai 1963, Glazer és mtsai 1974) — a vizsgált frakciók forrásául szolgáló, a részleges májirtás után 24 órával nyert májszövet RNS szintézist stimuláló anyagokat már nem tartalmaz. Másrészt azzal a lehetőséggel is számolhatunk, hogy az RNS szintézis szabályozásában résztvevő regulátorok anyagi természetéből következően, az alkalmazott elválasztási technikával a hatékony frakciók nem állíthatók elő.

Szemben az S_1B és S_1C frakciókkal, a K és R eredetű S_2B és S_2C frakciók nemcsak a DNS, hanem a fehérje-szintézisre is differenciáltan hatottak (5. ábra). A K típusú S_2B frakció gyakorlatilag nem befolyásolta, az R típusú viszont enyhén, de következetesen gátolta a fehérje-szintézist. A K eredetű S_2C frakció ugyancsak hatástalan volt a fehérje-szintézisre, ugyanakkor az R eredetű frakciónak kifejezett stimuláló hatása volt.

Egyelőre csak feltételezésekre szorítkozhatunk a K és R eredetű frakciók fehérje-szintézisére gyakorolt differenciális hatásának funkcionális jelentőségét illetően. A DNS szintézist az S_2C frakciók K és R típusa egyaránt, a fehérje-szintézist azonban csak az R típusú frakció stimulálta. Nincs okunk tehát feltételezni, hogy e frakció DNS szintézisre irányuló hatása a fehérje-szintézis befolyásolásán keresztül történik. Ismeretes azonban, hogy a regeneráló májszövet fehérje-szintézisének bruttó növekedésén túl a szintézis mintázata is megváltozik: bizonyos fehérjék szintézisének szelektív növekedéséhez (Novikoff és Potter 1948), másokénak szelektív csökkenése (Bush és mtsai 1962) társul. E valószínűleg specifikus szerepet játszó (inciátor?) fehérjék szintézisében bekövetkező változások — ma még ismeretlen módon — szerepet játszhatnak bizonyos, a proliferáció folyamatának szervezésében részt vevő genom szakaszok aktiválásában vagy represszálásában (Church és McCarthy 1967; Lancker 1969). Elképzelhető, hogy az R típusú S_2B és S_2C frakciók a fehérje-szintézist a K-típusú frakciókkal ellentétben befolyásoló anyagai e szabályozási folyamat mediátorait tartalmazzák.

Egyes irodalmi adatok szerint, más szövetekhez hasonlóan a májban is peptid-természetű, szövetspecifikus hatású inhibitorok, ún. kalonok kulcsszerepet játszanak a proliferáció szabályozásában (Deschamps és Verly 1975, Menczel és mtsai 1976, Onda és Yoshikawa 1975, Simard és mtsai 1974).

Azon túlmenően, hogy a májproliferáció kalon-szerű anyagokkal történő szabályozását más vizsgálatok is megkérdőjelezték (Spielhof 1971, Volm és mtsai 1973, Wayss és mtsai 1973), saját vizsgálataink sem erősítették meg szövet-specifikus inhibitorok jelenlétét a májkivonatokban. Megfigyeléseink tehát egyrészt alátámasztják a májsejtek proliferációjának pusztán kalonszerű anyagokkal történő szabályozásával szemben hangoztatott kételyek jogosságát, másrészt rámutatnak, hogy stimulátor és inhibitor hatásokat közvetítő regulátorok létezésével egyaránt számolnunk kell. Mivel pedig — amint kísérleti adatainkra támaszkodva az előzőekben már kifejtettük — a proliferáció szövet-specifikus szabályozása — serkentése vagy gátlása — egy nem szövet-specifikus és egy ezzel ellentétes, de szövet-specifikus hatású regulátor egyútt-hatásán alapuló, kettős szabályozás alatt álló rendszerrel is megvalósítható, nyilvánvaló, hogy a kalon-modell nem tekinthető a szövet-specifikus proliferáció szabályozás egyetlen elképzelhető változatának.

Összefoglalás

Kiindulva abból az elképzelésből, hogy a szöveti proliferáció szabályozásában peptid-természetű regulátor molekulák vesznek részt, föltételeztük, hogy az osztódási nyugalomban levő (nyugvó = K), valamint a részleges májirtással fokozott osztódásra készített sejtekből fölépülő (regeneráló = R) májszövetből előállítható peptid komponensek mennyiségében, összetételében és/vagy biológiai hatásában különbségek mutatkoznak. E hipotézis helyességét ellenőrzendő, összehasonlító vizsgálatokat végeztünk a K- és R-típusú patkánymájak vizes kivonatából, ioncserélő és gélkromatográfia kombinációjával részlegesen tisztított peptid tartalmú összetevők kromatográfiás mintázataira, mennyiségére, valamint az egyes frakciók biológiai hatására vonatkozóan. A kísérletek eredményei a következőkben foglalhatók össze:

1. Jóllehet a K- és R-típusú májkból előállított peptid tartalmú frakciók kromatográfiás mintázataiban és mennyiségében esetenként jelentős különbségek mutatkoztak, ezek nem tették lehetővé a frakciók biológiai hatásaiban mutatkozó különbségek értelmezését.

2. A K- és R-típusú májkból egyaránt 6–6, kromatográfiásan azonosan viselkedő peptid tartalmú frakció biológiai hatásának vizsgálatát végeztük el.

a) A szöveti DNS szintézisre gyakorolt hatás tekintetében egyetlen frakció (S₁B), K- vagy R-eredetétől függetlenül hatástalannak bizonyult. Három frakció (B₁A, S₁C és S₂A) — K- vagy R-eredetükre ugyancsak tekintet nélkül — mérsékelten, egy (S₂C) pedig erőteljesen stimulálta a májszövet, de nem befolyásolta a vese szövet DNS szintézisét (szövet-specifikus, nem differenciális hatás). A DNS szintézisre K- vagy R-eredetétől függően ható egyetlen frakciónak az S₂B frakció bizonyult: amíg a K-eredetű frakció a máj- és vese-

szövet DNS szintézisét egyaránt és erőteljesen gátolta, addig az R-eredetű identikus frakció egyik szövetféleség DNS szintézisét sem befolyásolta (nem szövetspecifikus differenciális hatás).

b) Két, módosított szeparációs eljárással kapott frakciónak (S_2B_b , S_2C_b) a sejtenyészetek proliferációjára gyakorolt hatása mindenben megegyezett a már említett S_2B és S_2C frakciók DNS szintézisre gyakorolt hatásaival: a K-eredetű S_2B_b frakció mind a Novikoff hepatoma, mind az NK/Ly ascites tenyészetek proliferációját gátolta; az R-eredetű identikus frakciók viszont mindkét tenyészet proliferációjára hatástalanoknak bizonyultak (nem szövetspecifikus, differenciális hatás). Ezzel szemben mind a K-, mind pedig az R-eredetű S_2C_b frakció stimulálta a Novikoff hepatoma tenyészetek proliferációját, és hatástalan volt az NK/Ly ascites tenyészetek proliferációjára (szövetspecifikus, nem differenciális hatás).

c) Vizsgálataink a fehérje-szintézist differenciálisan és nem differenciálisan stimuláló, illetve differenciálisan gátló peptid tartalmú frakciók létezését bizonyították.

d) Sem a K- sem az R-eredetű frakciók nem gyakoroltak említésre méltó hatásokat az RNS szintézisre.

3. Eredményeink arra mutatnak, hogy a szóban forgó peptid tartalmú frakciók a szöveti proliferáció homeosztázisát biztosító szabályozó rendszer természetes, endogén mediátorait tartalmazzák.

4. A szöveti proliferáció szabályozásában a szövetspecifikus inhibitorok szerepét egyoldalúan hangsúlyozó kalon-moddellel a DNS szintézist, illetve a sejtproliferációt nem szövetspecifikusan és differenciálisan gátló, illetve szövetspecifikusan és nem differenciálisan stimuláló mediátorok együtthatására alapozott, kettős szabályozás alatt álló rendszer alternatíváját állítjuk szembe.

Köszönetnyilvánítás: Dr. Pályi Istvánnak és Dr. Pályi Vilmának a szövettényésztési munkák elvégzéséért, Gróf Józsefnének, Kopetty Diánának és Korompay Emilnének az értékes technikai segítségéért hálás köszönetet mondunk.

IRODALOM

- Bertalanffy, F. D.: Normal and malignant cell growth (eds: Fry, J. M., Griem, M. L., Kirsten, W. H.) Springer Verlag; Berlin—Heidelberg—New-York, pp. 136 (1969).
- Brown, A. H.: Arch. Biochem. **11**, 269 (1946).
- Bullough, W. S.: Nat. Cancer Inst. Monogr. **38**, 5 (1973).
- Burton, K.: Biochem J. **62**, 315 (1965).
- Bush, S., Chambon, P., Mandel, P. és Well, J. D.: Bioche. Biophys. Res. Commun. **7**, 255 (1962).
- Church, R. és McCarthy, B. J.: J. Molec. Biol. **23**, 459 (1967).
- Church, R. és McCarthy, B. J.: J. Molec. Biol. **23**, 477 (1967).
- Deschamps, Y. és Verly, W. G.: Biomedicine, **22**, 195 (1975).
- Fischer, B., Szuch, P. és Fisher, E.: Cancer Res. **31**, 322 (1971).
- Freed, J. J. és Sorof, S.: Biochim. Biophys. Res. Commun. **22**, 1 (1966).
- Fujoka, M., Koga, M. és Lieberman, I.: J. Biol. Chem. **238**, 3401 (1963).
- Glazer, R. K., Nutler, R. C., Glass, L. E. és Menger, J. M.: Cancer Res. **34**, 2451 (1974).

- Gróf, J., Menyhárt, J., Marcsek, Z. és Babics, A.: *Kísérletes Orvostudomány* **26**, 540 (1974).
 Higgins, G. M. és Andron, R. M.: *Arch. Path.* **12**, 186 (1931).
 Iversen, O. H.: Chalmers (ed.: Houch, J. C.) North Holland Publ. Comp.—Amsterdam, pp. 37 (1976).
 Lancker, J. L.: *Biochemistry of Cell division* (ed.: Baserga, R.) C. C. Thomas Publisher, Springfield, USA, pp. 155 (1969).
 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. és Randell, R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
 Menczel, L., Nagy, E., Menyhárt, J. és Marcsek, Z.: *Kísérletes Orvostudomány* **28**, 519 (1976).
 Menyhárt, J. és Gróf, J. *J. Mol. Med.* **2**, 371 (1977).
 Morley, C. G. D. és Kingdon, H.: *Biochim. Biophys. Acta* **308**, 260 (1973).
 Morley, C. G. D.: *Persp. Biol. Med.* **17**, 411 (1974).
 Novikoff, A. B. és Potter, V. R.: *J. Biol. Chem.* **173**, 223 (1948).
 Onda, H. és Yoshikawa, J.: *Gann*, **66**, 227 (1975).
 Rytömaa, T., Vilpo, J. A., Levanto, A. és Jones, W. A.: *Scand. J. Hematol., Suppl.* **27**, 5 (1976).
 Rytömaa, T., Vilpo, J. A., Levanto, A. és Jones, W. A.: *The Lancet*, pp. 771 (1977).
 Simard, A., Corneille, L., Deschamps, I. és Verly, W. G.: *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* **71**, 1763 (1974).
 Spielhof, R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **138**, 43 (1971).
 Thornley, A. L. és Laurence, C. G.: *Int. J. Biochem.* **6**, 313 (1975).
 Verly, W. G., Deschamps, Y., Puspathadam, J. és Desrosiers, M.: *Can. J. Biochem.* **49**, 1376 (1971).
 Volm, M., Ho, A. D., Mattern, J. és Ways, K.: *Expl. Path.* **3**, 341 (1973).
 Wayss, K., Mattern, J. és Volm, M.: *Naturwissenschaften*, **7**, 354 (1973).
 Weinbren, K. és Fritschen, W.: *Brit. J. Exptl. Pathol.* **40**, 107 (1959).