

## SCANNING ELEKTRONMIKROSKÓPOS VIZSGÁLATOK KEZELETLEN ÉS 20-METHYLCHOLANTHRENNEL IN VITRO MALIGNUSAN TRANSFORMÁLT EGÉR EMBRIÓ FIBROBLAST SEJTEK TENYÉSZETEIN

FERENCZ GÉZA, SZENDE BÉLA, LAPIS KÁROLY az MTA levelező tagja és  
PODMANICZKY ERZSÉBET

Közlésre érkezett: 1975. VII. 10.

In vitro fenntartott sejtek malignusan transformálhatók különböző kémiai carcinogén anyagokkal (Berwald és Sachs, 1963, 1965; Chen és Heidelberg, 1969). A malignus transformatio hatására a sejtek tulajdonságaiban beálló, eddig ismert és leírt változások egyike sem egyértelműen elfogadott a transformatio bekövetkeztének igazolására (kontakt gátlás felfüggesztődése: Edwards, 1971; Agglutinatio Concanavalin-A-val: Fox, 1971; csökkent szérumigény: Dulbecco, 1970; stb.). Az in vitro malignus transformatio bekövetkeztének bizonyítására az egyetlen elfogadott módszer az állatba való, daganatot eredményező visszaoltás (Eagle, 1970). A carcinogén kémiai anyagok hatására in vitro bekövetkező morfológiai változásokat egyre több oldalról vizsgálják (Sanford, 1974). A morfológiai vizsgálatok sorában új lehetőséget teremtett a scanning elektronmikroszkóp használata (Schaff és Lapis, 1974). Segítségével mód nyílik a kezeletlen, az onkogén vírussal, kémiai carcinogénekkal kezelt, illetve a spontán malignusan transformálódott sejt-kultúrák felszíni képződményeinek tanulmányozására (Porter, 1973).

### *Vizsgálati anyag és módszerek:*

*Kezeletlen sejtenyészet:* CBA T6T6 egér 20 napos embrióiból homogenizálással nyert sejteket 10% borjúsavót tartalmazó Parker médiumban, Falcon edényekben tenyésztettünk. A kultúrák passzálása 5 naponként ( $5 \times 10^5$  sejt (10 ml), 0,25% trypsint tartalmazó oldattal történt (K-kultúra).

### *20-methylcholanthrennel (MC) kezelt sejtenyészet:*

A kialakított egér embrió fibroblast kultúrákat a 8. passzáláskor kétfelé osztottuk. A tenyészetek egyik része nem kapott kezelést, a másik része (5 edény,  $5 \times 10^4$  sejt(edény), 14 napon keresztül 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  koncentrációban MC kezelést kapott. A kezelt kultúrákat a leírt módon passzáztuk (MC-kultúra).

*Visszaoltás:* A kezelt és a kezeletlen fibroblast sejteket egynapos CBA T6T6 egerekbe [s.c.,  $4 \times 10^6$  sejt(állat)] oltottuk. A visszaoltás a K-kultúra eseté-

ben 9—21 passzálás között összesen 13 állatba, MC-kultúra esetében a kezelés utáni 3—9 passzálás között összesen 12 állatba történt. 3 héttel az oltás után a keletkezett tumorokat szövettani vizsgálatnak vetettük alá, illetve a tumorsejteket trypsinos homogenizálás után a leírt módszerrel *in vitro* tovább tenyésztettük (MCR-kultúra).

*Scanning elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálat:* Mindhárom sejttenyésztéstípust (K-, MC-, MCR-kultúra) scanning elektronmikroszkópos vizsgálatnak vetettük alá. A sejteket Falcon petricsészébe helyezett fedőlemezen, 37 °C-on Heraeus szén-dioxidtermosztátban történő 2 napos inkubálással tenyésztettük, majd a kitapadt sejteket fiziológias konyhasóoldattal történő mosás után 2,5% glutaraldehidet tartalmazó oldatban 48 órán át 4 °C-on fixáltuk. (Az utófixálást 30 percig végeztük 2%-os OsO<sub>4</sub>-ben (pH 7,2). A sejteket pufferrel történő mosás után acetonnal dehidráltuk. A preparátumok szárítása kritikus pont módszerrel, folyékony CO<sub>2</sub>-ben történt (Boyde és Wood 1969). Ezután az anyag felszínét szénréteggel és 200—300 Å vastagságú aranyréteggel fedtük (Hochvacuum-Technik Dresden B301 típusú készülék). A preparátumokat JSM-50A scanning elektronmikroszkóppal 20-kV gyorsító feszültség mellett vizsgáltuk.

### *Eredmények*

A scanning elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz felhasznált kezeletlen és MC-nel *in vitro* kezelt sejteket szövettenyésztési módszerekkel és egérbe történő visszaoltással hasonlítottuk össze. A sejttenyésztetek morfológiai különbségeit fénymikroszkóppal, a sejtek növekedését alacsony koncentrációjú savót tartalmazó médiumban, a kolóniaképzést lágyagarban vizsgáltuk. Ezen kísérletekben a kezelt és a kezeletlen sejtek között jelentős különbségeket találtunk. Az eredmények — melyeket más helyen részletesen közlünk — arra utalnak, hogy a MC-nel kezelt sejtek malignusan transformálódtak. A malignus transformatio igazolását az jelentette, hogy a kezelt sejtek CBA T6T6 egerekre visszaoltva orsósejtes sarcomát okoztak. A kezeletlen kultúrák esetében, azonos számú sejttel történt oltás után nem fejlődtek ki tumorok. A tumorokból trypsinos homogenizálással nyert sejtek újratenyésztésekor szövettenyésztésben ismét intenzíven szaporodtak.

A scanning elektronmikroszkópos morfológiai összehasonlító vizsgálat is a malignus transformatio bekövetkeztére utal. A közölt képek a kezeletlen kultúra esetében a 17., az MC-nel kezelt kultúra esetében a kezeléstől számított 7., a szövettenyésztésbe visszavitt (MCR-kultúra) sejteknél pedig az újratenyésztéstől számított 2. passzálásból nyert SEM preparátumoknak felelnek meg.

A kezeletlen kontroll sejtek tenyésztésében (K-kultúra) a sejtek közel párhuzamos elhelyezkedésűek, nem nőnek egymásra, közöttük bizonyos távolság van. Ez megfelel a fénymikroszkóposan észlelt állapotnak. A sejtek

ilyen, viszonylag rendezett növekedése a malignusan nem transformált kultúrák jellemző képe, a sejtek további osztódásának, egymásránövésének a kontakt gátlás jelensége szab határt. A sejtek felszínén változó alakú, részben gracilis mikrovillus-szerű, szélesebb nyelű, lángnyelvyszerű nyúlványok figyelhetők meg és azok alakulásában, eloszlásában bizonyos rendezettség látható. A sejtnyúlványok többnyire párhuzamosak, számuk viszonylag kevés (1. és 2. ábra).

A MC-nel kezelt, malignusan transformált kultúrákban jól megfigyelhető a sejtek sokirányú és többrétegben történő (multilayer, criss-cross) növekedése. A K-kultúrákban gátat szabó kontakt inhibíció itt nem érvényesül, a közvetlenül egymás mellett levő, vagy egymást keresztező sejtek is képesek osztódni. Az osztódásra készülő sejtek tagolt felszínű gömbalakokat öltönek. Úgy tűnik, hogy a sejtek volumene megnőtt. Jelentős változást mutat a sejtfelszín is. A sejtnyúlványok vaskosabbak, szélesebbek és lényegesen rendezetlenebb elhelyezkedésűek, mint a kezeletlen kultúra esetében, helyenként szinte lebernyegszerű, unduláló jellegűek. Az osztódáskor kötelékeiből kiszabaduló, lekerekedett sejtek felszíne a többiekéhez képest kevésbé tagolt (3. és 4. ábra).

Az állatokban 3 hét alatt kialakult tumorok reexplantált sejtjei malignus voltuknak megfelelően sűrűn egymás mellé és fölé burjánoznak, a kontakt inhibíció hiányának megfelelően többrétegű, keresztbe-kasul történő (multilayer, criss-cross) növekedést mutatnak.

Emellett a sejtek scanning elektronmikroszkóppal a sejtnyúlványok tekintetében jellegzetes képet adnak. Szembetűnő, hogy a sejtfelszín a kezeletlen, K-kultúrákhoz képest, de az *in vitro* malignusan transformált sejtek felszínéhez képest is tagoltabbá vált. A nagyszámú, gracilis mikrovillus-jellegű, egymást keresztező nyúlványoktól a sejtfelszín valósággal hollyossá vált. Érdekes jelenség, hogy az osztódásra készülő, lekerekedett sejtek felszíne is sokkal tagoltabb, mint az *in vitro* transformált, de állatban nem passzált kultúrák esetében (5. és 6. ábra).

### *Megbeszélés*

A CBA T6T6 egér embrió fibroblast sejtekből kialakított *in vitro* rendszerünkben egymás mellett vizsgálhatjuk a kezeletlen és a methylcholanthrenel malignusan transformált fibroblast sejtek morfológiai sajátosságait. A malignus transformatio bekövetkezését többféle módszerrel követtük és állatba való visszaoltás segítségével igazoltuk. Az egerekben kifejlődött tumorok sejtjeit ismét szövettani körülmények között vizsgálva összehasonlítottuk azokat az eredeti és a transformált kultúrákkal. A kísérletekben igen hasznos információt nyújtottak a scanning elektronmikroszkópos vizs-

gálatok. Megállapíthattuk, hogy a malignusan transformált sejtek tenyészetiben — a kezeletlen kultúra monolayer növekedésével szemben — jellegzetes a kontakt gátlás megszűnésével magyarázható korlátlan és több rétegben történő rendezetlen sejtnövekedés. Bár erről a jelenségről felvilágosítást nyújt a fénymikroszkópos vizsgálat is, a sejtek egymáshoz viszonyított térbeli elhelyezkedése és a sejtfelszíni képződmények, a scanning elektronmikroszkópos módszerrel lényegesen jobban tanulmányozhatók. Megfigyelhető, hogy a sejtnyúlványok sűrűségében, orientációjában és vastagságában a háromféle tenyészet sejttei között jelentős különbségek vannak. Az MCR-kultúra sejttei felszíni képződményeinek igen jellegzetes volta — de különösen a sejtfelszínen a malignus transzformációval párhuzamosan végbemenő változások gazdagsága — valószínűleg a közbeiktatott *in vivo* növekedésével együttjáró, megváltozott körülmények hatásával függ össze. Elképzelhető, hogy ezek a morfológiai változások nemcsak a vizsgált sejtvonalon, hanem más sejt kultúrák malignus transzformációja esetén is jelentkeznek. Az ilyen irányban kiterjesztett vizsgálatok alapot jelenthetnek a malignus transzformáció scanning elektronmikroszkópos jellemzéséhez.

Köszönetünket fejezzük ki Dr. Schaff Zsuzsának és Csikós András mérnöknek a SEM vizsgálatokban és preparálási technikában nyújtott irányításukért és segítségükért, valamint Dr. Kovács János tanszékvezető docens úrnak a scanning elektronmikroszkópos kapacitás biztosításért.

### Összefoglalás

A szerzők CBA T6T6 egér embrióból kialakított kultúrákat 20-methyl-cholanthrénnel *in vitro* malignusan transformáltak. Scanning elektronmikroszkóp segítségével hasonlították össze a kezeletlen és az MC-kezeléssel transformált, valamint a kezelt sejtekből származó tumorok szövettenyészetbe re-explantált sejteit. A 3 sejttípus jelentős eltérést mutatott a sejtek egymáshoz viszonyított helyzetében, valamint a felszíni képződmények számában és alakjában.

### IRODALOM

- Berwald Y. és Sachs L.: *Nature* (London) **200**, 1182, (1963).  
 Berwald Y. és Sachs L.: *J. Nat. Cancer Inst.* **35**, 641 (1965).  
 Boyde, A. és Wood C. J.: *Microscopie* **90**, 221 (1969).  
 Chen T. T. és Heidelberger C. J.: *Nat. Cancer Inst.* **42**, 903 (1969).  
 Dulbecco R. és Stoker M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **66**, 204 (1970).  
 Eagle H., Foley G. E. és Koprowski H.: *J. Exp. Med.* **131**, 863 (1970).  
 Edwards J. G. és Campbell J. A.: *J. Cell Sci.* **8**, 53 (1971).  
 Edwards J. G. és Williams J. P.: *Nature* (New Biol.) **231**, 147 (1971).  
 Fox T. C. Sheppard J. R. és Burger M. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 244 (1971).  
 Porter K. R. Todaro G. J. és Virginia Fonte: *J. Cell. Biol.* **50**, 633 (1973).  
 Sanford Katherine K. és *J. Nat. Cancer Inst.* **53**, 1481 (1974).  
 Schaff Zsuzsa, Lapis K. Berezesky Irene K.: *Orvosi Hetilap* **115**, 1236 (1974).