

**Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**A reaktív vegyületek és a negatív energiamérleg hatása az
apoptózis és a nekrosis kialakulására**

PhD értekezés

Dr. Domokos Mónika

2010.

Témavezető és témabizottsági tagok:

Prof. Dr. Gálfi Péter
SZIE-ÁOTK Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Dr. Neogrády Zsuzsa
SZIE-ÁOTK Élettani és Biokémiai Tanszék

Dr. Jakus Judit
MTA Kémiai Kutatóközpont

Készült 8 példányban. Ez a sz. példány.

.....
Dr. Domokos Mónika

TARTALOMJEGYZÉK

Gyakrabban alkalmazott rövidítések	6
1. Összefoglalás	9
1.1. A butirát által indukált sejthalál és differenciáció összefüggésben van a különböző ROS mintázatokkal HT29-eredetű humán vastagbélrák sejtekben.....	9
1.2. Az endometrium apoptotikus sejtjeinek aránya az involúció korai időszakában hyperketonaemiás tehenekben csökken	10
2. Bevezetés	12
3. Irodalmi áttekintés	16
3.1. A sejt differenciáció.	16
3.2. A butirát hatása a sejt működésre.....	17
3.3. A szabad gyökök és egyéb reaktív vegyületek képződése és hatásai.	19
3.4. A sejthalál néhány jellegzetessége	244
3.4.1. Nekrózis	25
3.4.2. Az autofágia	26
3.4.3. A kornifikáció	27
3.4.4. Az apoptózis	27
3.5. Biokémiai változások és jelátviteli utak az apoptózisban	29
3.5.1. Kaszpáz-függő utak	29
3.5.1.1. Az extrinsic út.....	30
3.5.1.2. Az intrinsic út.....	32
3.5.2. A kaszpáz-kaszád és következményei	34
3.5.3. Pro-apoptotikus és anti-apoptotikus faktorok.....	35
3.5.4. Kaszpáz-független utak	36
3.5.5. Az apoptózis energiafüggése, átmenete nekrózisba	37
3.5.6. A sejthalál szerepe a szöveti involúcióban.....	38
3.5.7. Az apoptózis kimutatásának néhány módszere	40
3.5.7.1. Mikroszkópos megfigyelés	40
3.5.7.2. A transzlokálódott foszfatidil-szerin annexin V módszerrel való kimutatása	41
3.5.7.3. A sejtmag kromatinjának specifikus festése.....	41
3.5.7.4. Gélelektroforézis.....	42
3.5.7.5. In situ end-labeling (ISEL) módszerek	42
3.5.7.6. Kaszpázok vizsgálata	43

3.5.7.7. Mitokondriális módszerek.....	44
4. Kísérletek	45
4.1. A butirát által indukált sejthalál és differenciáció összefüggésben van a különböző ROS mintázatokkal HT29-eredetű humán vastagbélrák sejtekben	45
4.1.1. Bevezetés és célkitűzés az adenocarcinoma sejtvonalakon végzett kísérletekhez	45
4.1.2. Anyag és módszer	46
4.1.2.1. Reagensek és törzsoldatok	46
4.1.2.2. Sejtvonalak és sejttenyésztés.....	46
4.1.2.3. Sejtosztódás vizsgálata.....	47
4.1.2.4. Sejtleválás kimutatása	48
4.1.2.5. Sejthalál vizsgálata.....	48
4.1.2.5.1. Propidium-jodiddal festett magok FACS analízise.....	48
4.1.2.5.2. Propidium-jodiddal illetve Hoechst 33285-tel festett magok mikroszkópos vizsgálata.....	49
4.1.2.5.3. Apoptózis meghatározása TUNEL próbával.....	49
4.1.2.5.4. Apoptózis és nekrozis meghatározása DAPI és tripánkék festékekkel.....	50
4.1.2.6. Sejtdifferenciáció kimutatása	51
4.1.2.7. Szabad gyökök és reaktív oxigén vegyületek meghatározása.....	51
4.1.2.7.1. Szabad gyök meghatározás ESR spektroszkópiával	51
4.1.2.7.2. Reaktív oxigén vegyületek mérése	51
4.1.2.7.3. H ₂ O ₂ termelődésének meghatározása.....	52
4.1.2.8. A GSH/GSSG arány mérése valamint a redoxpotenciál számítása	52
4.1.2.9. Statisztikai számítások	53
4.1.3. Eredmények	53
4.1.3.1. A butirát által kiváltott sejtdifferenciáció a letapadt és levált sejtekben	53
4.1.3.2. A butirát által előidézett proliferációgátlás és sejtleválás	56
4.1.3.3. A butirát által kiváltott sejthalál HT29R és HT29-21 sejteken.....	57
4.1.3.4. A butirát hatására szelektíven kialakuló különböző redox tulajdonságok vizsgálata HT29R, HT29-12 és HT29-21 sejteken.....	60
4.1.3.5. ROS indukció és sejtleválás	66

4.1.3.6. A dihidrokinon (DHQ), rezveratrol és ciklosporin-A hatása a butirát által kiváltott sejthalálra.....	68
4.1.4. Megbeszélés	72
4.2. Az endometrium apoptotikus sejtjeinek aránya az involúció korai időszakában hyperketonaemiás tehenekben csökken	78
4.2.1. Bevezetés és célkitűzés az endometrium mintákon végzett kísérletekhez	78
4.2.2. Anyag és módszer.....	80
4.2.2.1. Kísérleti állatok és mintagyűjtés.....	80
4.2.2.2. A vér biokémiai vizsgálata	81
4.2.2.3. Vizsgálati csoportok	81
4.2.2.4. Immunhisztokémia.....	82
4.2.2.5. Az eredmények kiértékelése	84
4.2.2.6. Statisztikai számítások.....	84
4.2.3. Eredmények.....	84
4.2.4. Megbeszélés	91
5. Új tudományos eredmények	95
6. Irodalomjegyzék.....	96
7. Saját publikációk	108
7.1. Referált hazai vagy külföldön kiadott tudományos folyóiratokban megjelent (vagy közlésre elfogadott) publikációk.....	108
7.2. Kongresszusi kiadványokban megjelent előadás vagy poszter összefoglalók.....	108
8. Köszönetnyilvánítás	111

GYAKRABBAN ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK

AIF	Apoptosis-inducing factor / apoptózis-indukáló faktor
AP-1	Activator protein-1 / aktivátor fehérje-1
ATP	Adenosine-triphosphate / Adenozin-trifoszfát
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1 / apoptotikus proteáz aktiváló faktor-1
Bak, Bax, Bid	Pro-apoptotikus faktorok
Bcl-2, Bcl-x(L)	Anti-apoptotikus faktorok (B cell lymphoma / B-sejtes lymphoma)
BHB	β -hidroxi-butirát
BSA	Bovine serum albumin / szarvasmarha szérum albumin
CAD	Caspase activated DNase / kaspáz aktivált DNáz
CLA	Common leukocyte antigen / közös leukocytá antigén
CsA	Ciklosporin-A
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole / 4,6-diamidino-2-indofenol
dATP	deoxy-Adenosine-triphosphate / dezoxi-adenozin-trifoszfát
dUTP	deoxy-Uridin-triphosphate / dezoxi-uridin-trifoszfát
DCF	2,7-dichlorofluorescein-diacetate / 2,7-diklorofluoreszcein-diacetát
DFF	DNA-fragmenting factor / DNS daraboló faktor
DHQ	1,5 dihydroxyisoquinoline / 1,5-dihidroxi-izokvinolin
DISC	Death-inducing signalling complex / halált kiváltó jelző komplex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium / Dulbecco szerint módosított Eagle tápfolyadék
EC	Extracelluláris
EM	Elektronmikroszkóp(os)
ER	Endoplazmatikus retikulum
ESR	Elektron spin rezonancia
FACS	Fluorescence-activated cell sorting / fluoreszcencia segítségével végzett sejtválogatás
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
FADD	FASR-associated death domain / FASR-hez kapcsolt halál domén
FASL	Fas-ligand
FASR	Fas-receptor
FBS	Foetal Bovine Serum / szarvasmarha magzati szérum

FITC	Fluoreszcein-izotiocianát
FMN	Flavin-mononukleotid
FR	Free radicals / szabad gyökök
GFP	Green Fluorescent Protein / zöld fluoreszcens fehérje
GSH	Redukált glutation
GSSG	Oxidált glutation
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1 / hipoxia indukált faktor-1
HMG	Highy Motility Group / nagy mozgékonyágú csoport
IC	Intracelluláris
ICAD	Inhibitor of CAD / CAD gátló
ISEL	<i>In situ</i> end-labeling / <i>in situ</i> láncvég megjelölés
ISNT	<i>In situ</i> nick translation / <i>in situ</i> láncvég transláció
LC3	Microtubule associated protein light chain 3 / mikrotubulushoz kötődő fehérje könnyű lánc 3
MAPK	Mitogen-activated protein kinase / mitogén aktivált proteinkináz
MLCK	Miosin light chain kinase / miozin könnyű lánc kináz
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxifenil)-2-(4-szulfofenil)-
2H-	tetrazolium só
NAD(P)	Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) / Nikotinamid-adenindinukleotid(-foszfát)
NEB	Negative energy balance / negatív energia-egyensúly
NEFA	Non-esterified fatty acids / nem észterifikált zsírsavak, szabad zsírsavak
NFκB	Nuclear factor κB / Sejtmag faktor κB
NOX	NADPH-oxidase /NADPH-oxidáz
PARP	Poly-ADP-ribose-polimerase / poli-ADP-ribóz-polimeráz
PBS	Phosphate buffered saline / Foszfáttal pufferelt sóoldat
PI	Propidiumiodide / Propidium-jodid
PM	Puerperalis metritis
PS	Phosphatidylserine / foszfatidil-szerin
RIP	Receptor-Interacting Protein / receptorról kölcsönhatásba lépő fehérje
RNS	Reactive nitrogen species / reaktív nitrogén vegyületek
RNOS	Reactive nitrogen oxide species / reaktív nitrogén-oxid vegyületek
ROS	Reactive oxygen species / reaktív oxigén vegyületek

SEM	Standard error of mean / átlag szórása
SOD	Superoxide dismutase / szuperoxid-dizmutáz
Tcf-4	T cell factor-4 / T-sejt faktor-4
TGF β	Transforming growth factor β / transzformáló növekedési faktor β
TNF α	Tumor nekrosis factor- α / tumor nekrosis faktor α
TNFR	TNF α -receptor
TRADD	TNFR-associated death domain / TNFR-hez kapcsolt halál domén
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane / trisz(-hidroxi-metil-)amino-metán
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick-End Labeling / terminális dezoxinukleotid-transzferáz irányított dUTP láncvég jelölés
TXSH	Redukált thioredoxin
TXS ₂	Oxidált thioredoxin

1. Összefoglalás

Kísérleteink során különféle sejtvonalakban *in vitro* vizsgáltuk a butirát hatását, egyes szabad gyökök és a ROS keletkezését, valamint az ezek között fennálló esetleges ok-okozati összefüggéseket a sejtek osztódására, differenciációjára, apoptózisára és nekrozisára, valamint egy involválódó szerv, a méh esetében *in situ* tanulmányoztuk a szervezet energetikai állapotának hatását a sejtek apoptózisára.

1.1. A butirát által indukált sejthalál és differenciáció összefüggésben van a különböző ROS mintázatokkal HT29-eredetű humán vastagbélrák sejtekben

Irodalmi adatok bizonyítják, hogy a tumorsejtvonalakban a butirát vagy más hiszton-deacetiláz gátlók által indukált sejthalál összefüggésben van a reaktív oxigén vegyületek megemelkedett szintjével. E vegyületek kémiai természete és szerepe a butirát által kiváltott hatásokban azonban még tisztázásra vár. A sejttenyészetek butiráttal való kezelése már millimoláris koncentrációban is teljes hiszton acetilációt és részben ennek következtében számos más hatást (pl. génexpresszió változást, sejtosztódás gátlást, sejtciklus leállást, differenciációt és sejthalált) vált ki.

Munkánk célja az volt, hogy feltárjuk a különböző redox jellemzők és a butirát által indukált sejthalál és differenciáció kapcsolatát, továbbá, hogy összehasonlítsunk különféle humán vastagbél adenocarcinoma sejtvonalakat: a HT29R-t (amely rezisztens a butirát által indukált sejt differenciációval szemben, ugyanakkor rendkívül érzékeny a sejthalálra) a HT29-12 és HT29-21 sejtvonalakkal (amelyek érzékenyek a differenciációra ugyanakkor a HT29R-hez képest mérsékeltebb érzékenységet mutatnak a butirát által indukált sejthalállal szemben). Arra kerestük a választ, hogy vajon a differenciáció-rezisztens HT29R sejtek fenotípusa kapcsolatba hozható-e a butirát által indukált redox paraméterek valamelyikével.

Annak érdekében, hogy kiderítsük a butirát hatására a tumorsejtekben kialakuló redox paraméterek szerepét, összehasonlítottuk a HT29R sejtvonalat a HT29-12 és HT29-21 sejtvonalakkal, különös tekintettel a butirát által indukált szabad gyökök, reaktív oxigén vegyületek és a hidrogén-peroxid (H_2O_2) szintjeinek alakulására. Butirát koncentráció-függő növekedést figyeltünk meg a szabad gyökök (elektron spin

rezonancia spektroszkópiával meghatározva) és a reaktív oxigén vegyületek (diklorofluoreszcein teszttel kimutatva) szintjében a HT29R sejteknél, azonban ezt nem tapasztaltuk a HT29-12 és HT29-21 sejtvonalak esetében. Ez utóbbiaknál – szemben a HT29R sejtekkel – a H₂O₂ kibocsátásban (fenolvörös teszttel meghatározva) mutatkozott dózis-függő növekedés butirát hatására. A HT29R sejtekben a butirát kevert típusú sejthalált váltott ki, amelyben a nekrozis volt túlsúlyban; ez azonban átváltott apoptózisba – mint elsődleges sejthalál típus – amikor a sejtekhez 1,5-dihidroxizokinolint, rezveratrolt vagy ciklosporin A-t adtunk. Eredményeink arra utalnak, hogy a HT29R sejtekben a butirát hatására képződő szabad gyökök és reaktív oxigén vegyületek a sejthalál termékei, míg a HT29-12 és HT29-21 sejtekben képződő H₂O₂ funkcionálisan a sejtdifferenciációhoz kötődik.

1.2. Az endometrium apoptotikus sejteinek aránya az involúció korai időszakában hyperketonaemiás tehenekben csökken

Vizsgálataink másik fő területét a méretében és tömegében is megnövekedett vemhes méh ellés utáni fiziológiás átépülése, az involúció, vizsgálata adta. A sejtek apoptózissal való pusztulása jelenti a szöveti leépülés központi elemét, hiszen ez lehetővé teszi, hogy a sejtek szétesése nélkül történjék meg a szövet lebontása, mely így nem indukál gyulladást a környezetében.

Az ellés utáni időszak megnövekedett energiaigénye elsősorban a meginduló laktációval magyarázható, miközben ezzel párhuzamosan a tehenek takarmányfelvétele nem növekszik arányos mértékben. Ezt súlyosbítja továbbá a méhinvolúció energiaigénye, hiszen a szöveti leépülés során a szervezet számára előnyösebb sejthalál, az apoptózis szintén energiaigényes folyamat. A foszfatidil-szerin transzlokáció a membránban, a kaszpáz kaszkád enzimszisztéma működése, a kialakuló DNS fragmentáció és a DNS darabokat magukba foglaló apoptotikus testek létrejötte egyaránt ATP-t igényel. A DNS darabolódása ezeken túl egy javítómechanizmust, a PARP (Poli-ADP-ribóz-polimeráz) enzimet is aktiválja, mely nagy mennyiségű ATP felhasználásával igyekszik a genetikai anyag sérüléseit helyrehozni, amíg a kaszpáz-3 enzim el nem hasítja azt.

Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk az apoptózis alakulását a méhinvolúció során endometrium biopsziás mintákban, amikor a tartósan fennálló energiahányos állapot ketontestek felhalmozódásához, ketózishoz vezet.

Eredményeink szerint az egészséges méhű, normoketonaemiás tehenek vérében mért β -hidroxi-butirát (BHB) koncentráció $0,45 \pm 0,12$ mmol/l volt. Ezekből az állatokból nyert biopsziás mintákban az összes sejt $49,97 \pm 6,18\%$ -a mutatott apoptózist. A puerperalis metritis előfordulása esetén, normoketonaemiás csoport vérmintáiban mért átlagos BHB koncentráció $0,42 \pm 0,15$ mmol/l. Az apoptózis előfordulási aránya $51,67 \pm 0,15\%$ volt az endometrium mintákból készített metszeteken. A hyperketonaemiás csoport egyedeiben $1,47 \pm 0,32$ mmol/l átlagos BHB koncentráció volt mérhető. Az apoptózis mértéke a vizsgált állatokban $23,83 \pm 6,44\%$ -nak adódott, függetlenül attól, hogy az állatok puerperalis metritis-szel terheltek voltak-e vagy sem. Eredményeink azt mutatják, hogy a normoketoneamiás csoporthoz képest a magas vér ketonanyag szinttel rendelkező állatok méhbiopsziáiban az össz-sejtszámot alapul véve arányában kevesebb az apoptotikus sejt. Kísérleteink eredményéből arra lehet következtetni, hogy energiahány, vagyis ketózis esetén az endometrium sejtjei kevésbé apoptózissal, inkább másik sejthalál formával, az ATP-t nem igénylő nekrozissal pusztulnak el, ami gyulladást indukálva hozzájárulhat az ellés után kialakuló szaporodásbiológiai zavarok kialakulásához.

2. Bevezetés

A szerveket, szöveteket alkotó sejtek mennyisége és minősége, vagyis az egyes sejtek osztódásának, differenciációjának és elhalásának összhangja szolgálja az adott szerv, szövet zavartalan működését. Ezek a folyamatok biztosítják a szervek kialakulását, fiziológiás működését, valamint a szöveti le- és átépülést, mint amilyen az élettani involúció. Az összhang megbomlása azonban sok esetben kontrollálatlan növekedéshez, tumor képződéshez is vezethet. A folyamatok szabályozásában számos faktor vesz részt külön-külön, de egymással összhangban is, különféle jelátviteli utakon keresztül. Irodalmi adatok szerint e szignálok közül a különféle sejttípusok esetében a kromatin hisztonfehérjének acetilációját fokozó butirát, a sejtek redox státuszát befolyásoló szabad gyökök, így a ROS és RNS molekulák jelentős mértékben hatnak a fent említett folyamatokra. Mivel a sejthalál két alapvető formájának, az apoptózisnak és a nekrozisnak igen eltérő az energiaigénye, vagyis az apoptózis lezajlása energiaigényes, míg a nekrozis nem, feltehetőleg a szervezet és az egyes sejtek energetikai állapota is befolyást gyakorolhat a fenti folyamatokra, különösen a sejtelhalás formájára.

Kísérleteinkben ezért különféle sejtvonalakban *in vitro* vizsgáltuk a butirát hatását, egyes szabad gyökök és a ROS vegyületek keletkezését, valamint az ezek között fennálló esetleges ok-okozati összefüggést a sejtek osztódására, differenciációjára, apoptózisára és nekrozisára, valamint egy involválódó szerv, a méh esetében *in situ* tanulmányoztuk a szervezet energetikai állapotának hatását a sejtek apoptózisára.

A sejtek osztódása a sejtciklus során meghatározott rend szerint történik, folyamatos osztódásra azonban csak az omnipotens őssejtek illetve azok elsődleges leszármazottai képesek. A differenciáció során egy kevésbé specializálódott sejt specifikusabb formát és funkciót vesz fel, miközben elveszti osztódási képességét, hiszen a sejtciklus során a proliferáció fázisából kikerülő sejtek képesek csak a differenciálódásra.

A vastagbélhámsejtek tanulmányozására alkalmazott sejtvonalak közül a HT29 és annak szubklónjai tumoros eredetük miatt végtelen számú osztódásra képesek. Ha ezeket a sejteket differenciációra készítjük, akkor elsősorban az abszorptív típusú enterocyták tulajdonságait veszik fel, ekkor azonban megszűnik proliferálódó

képességük. A daganatterápiában ezért is különösen fontos a transzformálódott sejtek differenciációra készítése, hiszen ebben az esetben elvesztik proliferációs és metastasiszt képző tulajdonságukat.

A vastagbélhámsejtek egyik fontos differenciációt előidéző szignálja a butirát, hiszen a vastagbél azon szakaszaiban, ahol anaerob fermentáció folyik, fiziológias körülmények között is termelődik, más rövidszénlancú monokarbonsavakkal együtt. Ezek a vegyületek a termelődés helyén felszívódva és metabolizálódva az emésztőcső sejtjeinek jelentős energiaforrásául szolgálnak. A sejtekbe került butirát nem metabolizálódott hányada a hisztonfehérjék hiperacetilációját idézi elő azáltal, hogy csökkenti a hiszton-deacetiláz enzim aktivitását. Régóta ismert, hogy a butirát *in vitro* már millimoláris koncentrációban minden sejt osztódására gátló hatást fejt ki. A leírt jelenség jól megfigyelhető kérődzők bendőhámjában is, ahol az osztódásgátlás és proliferációfokozódás a bendőhámsejtek osztódásának napi ritmusát adja. Más sejtek azonban butirát jelenlétében maradandóan károsodhatnak, és a sejtosztódást gátló hatás irreverzibilissé válhat. A reverzibilis folyamatnak tekinthető sejtosztódásgátlás mellett az apoptózis és a nekrozis is ilyen irreverzibilis állapot. Ezek a folyamatok befolyásolják a sejtek életműködését, szabályozzák azok érését és pusztulását, ami kihat az emésztőcső felépítésére, és jelentős mértékben meghatározza annak funkcionális állapotát.

Az apoptózis kialakulása a sejtelhalás kedvezőbb formájának tekinthető, míg a nekrozis – mivel gyulladásos folyamatok kialakulásához vezet – károsnak fogható fel. Az apoptózis programozott folyamat, azonban feltételezhető, hogy a nekrozisnak is lehet bizonyos tényezők által kiváltott más útja, mely az apoptózishoz hasonlóan szabályozott lehet, bizonyos esetekben azzal összefüggésben. Az apoptózis és a nekrozis kialakulásának gyakorisága végső soron szabályozza a szövetek le- vagy felépülését, így számos adaptációs folyamat lényeges összetevője: ilyen többek között a vizsgálataink középpontjában álló vastagbélhámsejtek osztódása, érése és differenciációja, valamint az ellés után lezajló méhinvolúció.

A butirát szerepe egy adott folyamatban sokrétű lehet. Fokozhatja a pro-apoptotikus, vagy az anti-apoptotikus fehérjék expresszióját, ugyanakkor butiril-KoA formájában aktiválódva metabolizálódhat egyes sejtekben a mitokondriumban (béta-oxidáció), és a keletkezett redukálódott koenzimekről a hidrogén a légzési láncra tevődhet át, ahol az vízzé oxidálódik, a potenciálkülönbség pedig ATP termelődésre

fordítódik. Számos vizsgálat bizonyítja, hogy a légzési lánc működése során mindig keletkeznek szuperoxid-anion szabad gyökök, amelyek a mitokondriumban lévő szuperoxid-dizmutáz hatására hidrogén-peroxiddá alakulhatnak. Egyes esetekben azonban ezeknek a reaktív molekuláknak a mennyisége jelentősen megnő, azok egy része nem dizmutálódik hidrogén-peroxiddá, emiatt a reaktív szuperoxid anion gyökök károsíthatják a mitokondriumot és a nukleáris DNS-t. A szabad gyökök képződésének, valamint azok kedvezőtlen hatásának mértékét azonban egyes antioxidánsok, így például egyes polifenolok, jelentős mértékben befolyásolhatják.

A szabad gyökök károsító hatására kialakuló DNS sérülés növeli a „repair” mechanizmusok, ezen belül különösen a poli-ADP-ribóz-polimeráz aktivitását. Az enzim ATP igénye igen magas, ezért az apoptózisban lévő sejt ATP koncentrációja olyannyira csökken, hogy a kaszpáz-kaszád rendszer aktiválódása zavart szenved, ami végül nekrozishoz vezet. A poli-ADP-ribóz-polimeráz az apoptózis kialakulása során általában a kaszpáz-3 szubsztrátjává válik, elhasad és inaktíválódik, utat engedve az apoptózis zavartalan lefolyásának. Abban az esetben, ha aktív marad, azaz nem hasad el, nekrozis alakul ki.

Vizsgálataink két fő területre összpontosultak. Elsőként arra próbáltunk fényt deríteni, hogy milyen szabályozási utakhoz köthető a butirát jelenlétében kialakuló apoptózis és nekrozis, illetve annak hiánya. Ennek során igyekeztünk jellemezni a butirát sejtanyagcserében betöltött szerepét, valamint az apoptózist és nekrozist kiváltó hatását és annak mechanizmusát colorectalis adenocarcinoma sejteken. Fontos jelentőséget tulajdonítottunk a nagy energiaigényű poli-ADP-ribóz-polimeráz kimutatásának a különböző sejthalál típusokban, valamint az antioxidáns hatással rendelkező polifenoloknak az apoptózis, illetve nekrozis kialakulására.

Munkánk másik fő területe a negatív energia-egyensúly esetén létrejövő, ketonanyagnak számító, β -hidroxibutirát felhalmozódás hatására kialakuló sejthalál típusok vizsgálata volt. Jellemzően ilyen állapot alakulhat ki nagy tejtermelésű tehénekben akkor, amikor jelentős energiaigényű folyamatok, így a tejtermelés beindulása és az ellés utáni méh involúciója zajlik. A fiziológiás szövetátépülésben központi szerepet játszó apoptózis súlyos zavart szenvedhet a sejtek nem megfelelő ATP ellátása esetén, amely következményesen szaporodásbiológiai problémákhoz vezethet.

Kísérleteink során a sejtek redox státuszának és energetikai állapotának hatását vizsgáltuk az apoptózis és a nekrozis kialakulására. Munkánk molekuláris hátterének vizsgálatához gastrointestinalis sejttenyészeteket, majd az egyes elméleti feltevések bizonyítására *in situ*, az involúció korai szakaszában gyűjtött tehén uterus-bioptátumokat használtunk.

(i) Először olyan sejttenyészeteken végeztünk vizsgálatokat, melyeknél a butirát hatására eltérő folyamatok alakulnak ki. Vizsgáltuk a butirát által kiváltott differenciáció fokát, valamint a kiváltott sejthalál mértékét és formáját HT29R, HT29-12, HT29-21 sejtvonalakon. Mivel a nekrozis és az apoptózis lezajlása irodalmi adatok szerint szoros kapcsolatot mutat a poli-ADP-ribóz-polimeráz működésével, így annak vizsgálatát is indokoltnak tekintettük. Vizsgáltuk, hogy különféle hatású vegyületek (DHQ, rezveratrol, CsA) miként befolyásolják a butirát által kiváltott sejthalált. Az említett folyamatokban a reaktív vegyületek lényeges szerepet játszhatnak, ezért a szabad gyökök, a ROS/RNS és a hidrogén-peroxid keletkezését is tanulmányoztuk a butirát által kiváltott folyamatokban.

(ii) Végül az involúció korai szakaszában gyűjtött tehén uterus-bioptátumokból készült metszeteken azt tanulmányoztuk, hogy milyen összefüggés áll fenn az állatok energiaállapota és az apoptózist mutató sejtek aránya között. Azt feltételeztük, hogy a szervezet energiahányos állapotát jelző hyperketonaemia sejtszinten ATP hiányban nyilvánul meg, ami befolyásolja a sejthalál kialakulását. Mivel az apoptózis energiahányos állapotban zavart szenvedhet, nagyobb mértékű nekrozis alakulhat ki, ami növelheti a gyulladásos folyamatok előfordulásának gyakoriságát.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A sejtdifferenciáció

Egy soksejtű szervezet sejtjeinek fenotípusosan és funkcionálisan különbözővé válása a sejtdifferenciáció. A több sejtből álló szervezetek valamennyi sejtje tartalmazza ugyan a fajra jellemző teljes genomot, de az egyes sejtek csak bizonyos gének expresszióját biztosítják. A differenciáció növeli a komplexitást, hiszen a szervezet egyes sejtjei, szövetei és szervei különleges működésekre specializálódnak, amely funkciók együttese teszi ki a szervezet integrált működését (Bronner-Faser, 2006).

Az őssejtek korlátlan számú osztódásra képesek, nem specializálódott sejtek, amelyek aszimmetrikus osztódás révén egyrészt önmagukhoz hasonló sejteket képeznek, másrészt elkötelezett utódsejteket is létrehozhatnak. Ezek az elkötelezett sejtek termelik azután folyamatosan az egyes szövetek sejtjeit, pótolják az ott elpusztult szöveteket. Az omnipotens őssejtekből bármilyen típusú sejt képes kifejlődni, kivéve az ivarsejteket, a magzatburkot és a méhlepényt. Multipotensnek azokat az őssejteket nevezik, amelyekből csak kisszámú sejtípus képes kialakulni. Ilyenek a kifejlett szervezet szöveti őssejtjei, amelyek az élet során a folyamatosan elhaló sejtek állandó újraképződését biztosítják (Bronner-Faser, 2006).

Az inter-, illetve intracellulárisan ható szignálok túl számos, a sejt külső környezetéből származó differenciációt indukáló molekulát ismerünk: D-vitamin, bizonyos A-vitamin formák, eikozapentaénsav, butirát. A colon modellezésére általunk is alkalmazott HT29 sejtvonal és annak szubklónjai, a felsoroltak közül, butirát jelenlétében differenciálódnak.

A vastagbélhamban zajló differenciáció során a kripták mélyén lévő folyamatosan osztódó őssejtekből származó leánysejtek a lumen felé haladva fokozatosan érnek a colorectalis hámot alkotó három fő sejtípusá (Carethers, 1998):

- abszorptív enterocyták;
- mucintermelő kehelysejt;
- enteroendokrin sejt.

A differenciáció során a sejtekben ultrastrukturális változások mennek végbe, miközben polarizáltabbá is válnak az enterocyták azáltal, hogy kialakulnak a sejtek

közötti „tight junction”-ok, megváltozik a citokinek összetétele, illetve az apikális részen megjelenik a kefeszegély. A kefeszegélyhez számos, az abszorptív funkcióhoz szükséges, enzim kötődik: így például az alkalikus-foszfátáz, a dipeptidil-peptidáz IV, a szacharáz és az N-aminopeptidáz (Velcich et al., 1995). Mivel az alkalikus-foszfátáz enzimnek a lipidtranszportban van szerepe, ezért a differenciálódott sejtek membránjának foszfolipid összetétele is megváltozik. A vastagbélben a butirát hatására *in vivo* és *in vitro* egyaránt differenciációs folyamatok indulnak meg, melynek egyik jellemző markere a fokozódó alkalikus-foszfátáz aktivitás.

A terminális differenciáción átesett sejtek a felszíni hámhöz érve végül elvesztik sejtközötti kapcsolataikat, és apoptózissal elpusztulva lesodródnak a lumen felé. A vastagbél hám megújulásához mindössze 4-5 nap elegendő, tehát aktív sejtosztódásnak, differenciációnak és apoptózisnak kell működnie a szöveti homeostasis fenntartásához.

3.2. A butirát hatása a sejtműködésre

Az emésztőtraktus azon szakaszaiban, ahol anaerob fermentáció folyik, nagy mennyiségben keletkeznek rövidszénláncú monokarbonsavak, amelyek számos biológiai hatással rendelkeznek. Ahol ezek a feltételek adottak – kérődzőknél elsősorban a bendő, a monogastricus fajokban a vastagbél – jelentős mennyiségben képződnek a mikrobiális fermentáció végtermékeként, elsősorban szénhidrátokból, monogastricus fajokban főképp amiláz rezisztens szénhidrátokból. Az acetát, propionát és butirát együttes koncentrációja a 100-200 mmol/l-t is elérheti (Bergman, 1990; Kristensen et al., 1996). A vizsgálatok szerint az acetát, a propionát és a butirát egymáshoz való aránya átlagosan 75:25:10, ami a takarmány, illetve táplálék szénhidrát tartalmától és annak összetételétől függően lényeges eltéréseket mutathat. A rövidszénláncú monokarbonsavak az emésztőcső sejtjeinek jelentős energiaforrásául szolgálnak (Baldwin, 1998), nem metabolizálódott hányadék pedig hiszton-deacetiláz inhibitoroként hat. Érdekes módon mind a felszívódás, mind a metabolizmus, valamint a hiszton hiperacetiláció terén a butirát mutatja a legnagyobb aktivitást (Riggs et al., 1977). A bélhámsejtek energiaszükségletének akár 70%-át is képes a butirát önmagában fedezni (Scheppach, 1994).

Az eukarióta DNS a hiszton fehérjékkel együtt alkotja a kromatin állományt. A kromatin ismétlődő alapegységei a nukleoszómak, melyek négy hiszton (H2A, H2B, H3, H4) oktamerjéből (core-hiszton), és az a köré balmenetesen csavarodó DNS 146

bázispárból álló egységéből állnak. Az core-hiszton N-terminális farokrésze a nukleoszómát körülvevő tér felé irányul, ezáltal igen reakcióképes, acetilálódhat, foszforilálódhat vagy metilálódhat (Grant, 2001).

Az aktuális kromatinszerkezet döntő szerepet játszik a génextpresszió szabályozásában, mivel meghatározza a transzkripciós faktorok hozzáférését a DNS-hez. Magát a kromatin szerkezetét két enzimesoport képes befolyásolni: a kromatin átrendeződését kialakító ún. „remodelling” fehérjék, mint a HMG (High Motility Group) enzim, mely a DNS-hurkok „kitekeredését” biztosítja; valamint a kromatint módosító enzimek. Ez utóbbiak felelősek a hisztonok poszttranszlációs módosításáért. A hiszton-aciltranszferáz hatására kialakuló acetilált hisztonokat a transzkripcionálisan aktív formának tekintjük, míg a deacetilált forma az inaktív kromatin (Grant, 2001). Ennek az a magyarázata, hogy az acetiláció során a farokrész lizinjeinek pozitív töltései neutralizálódnak, ennek következtében csökken a farokrész DNS-hez való kötődésének erőssége, valamint megváltozik a hiszton-hiszton és a hiszton-reguláló fehérje közötti interakció, ami a transzkripciónak kedvez (Grant, 1999; Roth et al., 2001). A hiszton-deacetiláz gátlása során a hisztonok acetiláltak maradnak és a hisztonhoz szorosan kapcsolódó DNS elernyedve utat enged a génátírásnak.

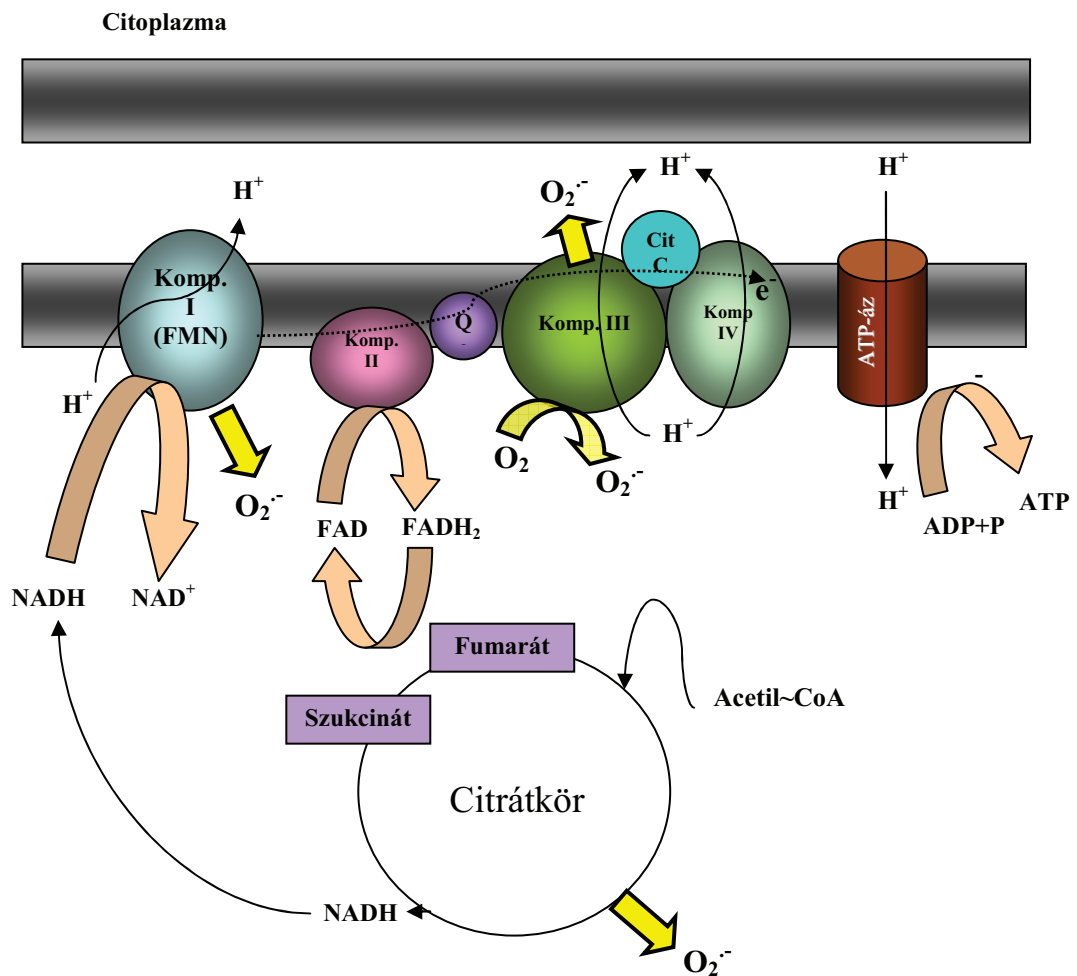
A butirát hiszton-deacetiláz enzimre kifejett gátló hatásának következménye a sejtek differenciációját előidéző hatása, hiszen a differenciációt meghatározó molekuláris mechanizmusokat részben a kromatin állapota határozza meg. A vegyület sejtdifferenciációt fokozó hatását először leukemia sejteken figyelték meg (Kameji et al., 1977; Chou és Takahashi, 1987). A hiperacetilált állapotban maradó hiszton ugyanis lehetővé teszi, hogy számos olyan gén expressziója induljon meg, amelyek a sejtosztódás csökkenését (reverzibilis hatás), a differenciáció fokozódását és egyes esetekben a sejt halálát (irreverzibilis hatás) okozzák. Vizsgálatok bizonyítják, hogy *in vitro* körülmények között a butirát minden eukarióta sejt osztódását gátolja koncentrációfüggő és reverzibilis módon. A leírt jelenség jól megfigyelhető kerdőzök bendőhámjában, ahol a hámsejtek osztódásának napi ritmusát adja (Gálfí és Neogrady, 2001). Egyes sejtek esetében azonban butirát jelenlétében a sejtosztódás gátló hatás irreverzibilissé válik, és maradandó károsodások érik a sejteket (Cuisset et al., 1997). Azt is megállapították, hogy a hiszton-deacetiláz gátlás nincs közvetlen kapcsolatban a butirát apoptózist kiváltó hatásával (Gálfí et al., 2000), mivel a hisztonok

hiperacetiláltsága minden sejt esetében megfigyelhető, de az apoptózist előidéző hatás nem.

3.3. A szabad gyökök és egyéb reaktív vegyületek képződése és hatásai

A sejtek metabolizmusában túlnyomórészt olyan redox folyamatok szerepelnek, amelyek során fiziológiás körülmények között is keletkeznek erős oxidatív tulajdonsággal rendelkező oxigén (Reactive Oxygen Species, ROS), illetve nitrogén (Reactive Nitrogen Species, RNS) vegyületek. Közéjük tartoznak a külső elektronegativitáson egy vagy több párosítatlan elektront tartalmazó szabad gyökök, mint a hidroxil-gyök, szuperoxid-gyök, nitrogén-oxid-gyök vagy a lipidperoxid-gyök; illetve a gyökös tulajdonságokkal nem rendelkező erősen reakcióképes molekulák, mint például a hidrogén-peroxid vagy a hipoklórsav.

A reaktív vegyületek enzimatis hatása következtében vagy nem enzimatis úton képződhetnek. Szuperoxid-anion gyökök ($O_2^{\cdot-}$) például enzimatisan termelődhetnek a NADPH-oxidáz, a xantin-oxidáz, a lipoxigenáz, a ciklooxygenáz vagy a citokrom P-450 monooxygenáz stb. működése során, illetve nem enzimatis úton a mitokondriális oxidatív foszforiláció révén. A mitokondriumban legnagyobb mennyiségben szuperoxid-gyök keletkezik a légzési komplex I és III egységének működése közben (1. ábra).



1. ábra: A szuperoxid-anion gyök keletkezésének lehetőségei a mitokondriumban. Az ábra a biológiai oxidáció bizonyos folyamatait, a citrátkört, a légzési láncot és az oxidatív foszforilációt ábrázolja. Szuperoxid-anion gyök (sárga nyíllal jelölve), a légzési komplex I és III, valamint a citrátkör egyes enzimeinek működése során keletkezik.

A légzési komplex I a mitokondriális mátrixba, míg a komplex III a mátrixba, valamint a belső és külső mitokondriális membrán közötti térbe is juttat szuperoxid-gyököt. Ezen túlmenően a citrátkörben is keletkezhet szuperoxid-anion, például az α -ketoglutarát-dehidrogenáz aktivitása során (Zmijewski et al., 2005). A szuperoxid-anion gyök a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim hatására hidrogén-peroxiddá (H_2O_2) alakul, amellyel együtt, miután a ROS vegyületek közé tartoznak, számos biológiai hatást képesek indukálni. Termelődésük azonban nem csupán a mitokondriumra szorítkozik, hanem a sejt számos más kompartmentjében is végbemehet (1. táblázat).

1. táblázat: Reaktív oxigén vegyületek keletkezési lehetőségei a sejtben.

Előfordulási hely	Enzim neve	ROS típusa
Mitokondrium	Légzési komplex I és III, Citrátkör	$O_2^{\cdot-}$
Peroxiszóma	Glikolát-oxidáz, D-aminosav-oxidáz, urát-oxidáz, L- α -hidroxisav-oxidáz, zsíracil-KoA-oxidáz	H_2O_2
Endoplazmatikus retikulum	Citokróm P450 NADPH-oxidáz	$O_2^{\cdot-}$
Mikroszóma	NADH-oxidoreduktáz	$O_2^{\cdot-}$
Citoplazma	Ciklooxigenáz, lipoxigenáz, xantin-oxidáz, aldehyd-oxidáz, dihidroorotát-dehidrogenáz, flavoprotein-dehidrogenáz, triptofán-dioxigenáz, NAD(P)H-kinon-oxidoreduktáz	H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$
Plazmamembrán	NADPH-oxidáz	$O_2^{\cdot-}$

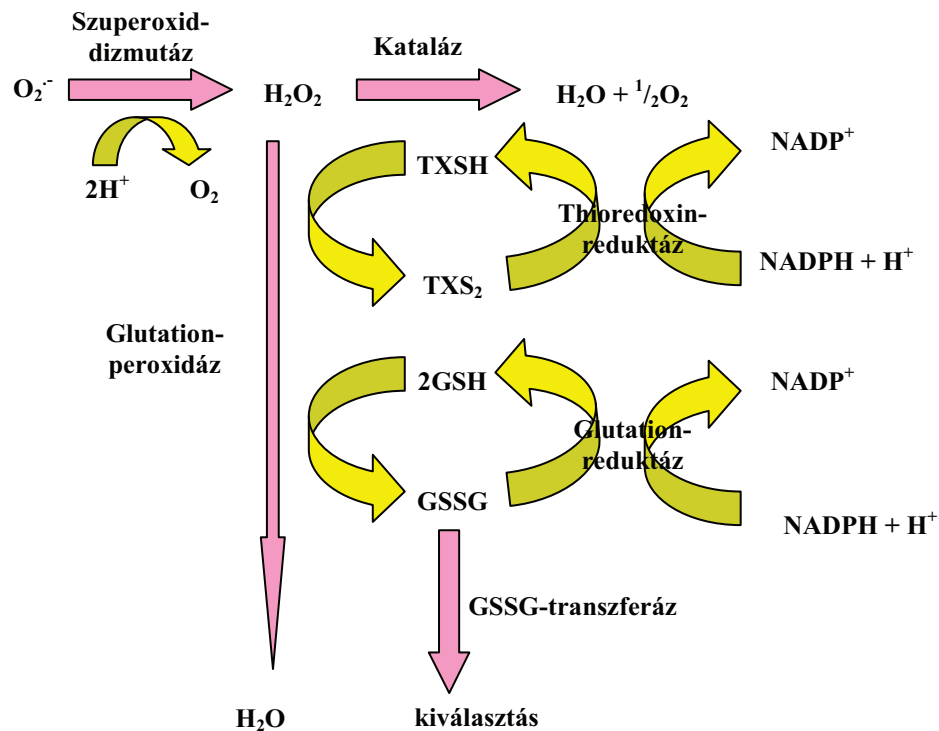
A reaktív oxigén vegyületek mindig keletkeznek a fiziológiás metabolizmus során, de a sejt maga is képes befolyásolni termelődésüket például a mitokondriumban a Ca^{2+} ionkoncentráció szabályozásával (Batty et al., 2009). Bár a szabad gyökök és reaktív vegyületek olyan patológiás elváltozásokat indukálhatnak, mint a lipid-peroxidáció, fehérje oxidáció vagy a DNS károsítás, de meghatározott koncentrációban és helyen termelődve a sejt fiziológiás működéséhez szükséges szignálokként is fontos szerepet töltenek be (Dröge, 2002). A jelátviteli utakban betöltött szabályozó szerepük is nagy reakciókészségüknek köszönhető, hiszen kölcsönhatásba lépve a különféle szignálmolekulákkal vagy enzimfehérjékkel befolyásolják azok működését. A ROS vegyületek egyik legjellemzőbb reakciója, amikor a cisztein szulfhidril csoportját oxidálva dimerizációt, vagy több fehérjére hatva protein komplexet hoznak létre (Finkel és Holbrook, 2000). A jelátviteli utakban ROS által kiváltott hatásokat négy fő csoportba oszthatjuk (Waldeck et al., 2009):

- fokozva egyes ionok IC koncentrációját (pl. Ca^{2+}) kontrakciót és a sejt migrációját váltja ki;
- egyes transzkripciós faktorok aktiválásával (AP-1, NF κ B, HIF-1) gyulladást idéz elő;
- a mátrix metalloproteinázokra hatva képes módosítani az extracelluláris mátrix fehérjéit;
- reverzibilis módon inaktívál olyan protein tirozin-foszfátázokat, mint a mitogén aktivált tirozin-kinázok (MAPK), amelyek egy fontos IC jelátviteli utat képviselve végső soron transzkripciós faktorokat aktiválnak (pl. c-myc, p38), melyek az apoptózist, a sejtnövekedést és a differenciációt szabályozzák.

A reaktív oxigén vegyületek közül elsősorban a stabilabb és membrán permeábilis hidrogén-peroxid, másodsorban a szuperoxid-anion tölt be fontos szerepet a jelátviteli utakban. Az 1. táblázatban felsoroltak alapján látható, hogy számos enzim képes reaktív oxigén vegyületeket termelni, legfőbb forrásuknak mégis a NADPH-oxidáz (NOX) tekinthető. Az enzim működését először a phagocytá típusú sejtekben ismerték fel, ahol a kórokozók elpusztításában van fontos védelmi funkciója az extracelluláris tér felé nagy mennyiségben termelődő szuperoxid-anion gyöknek. Ezekben a sejtekben a NADPH-oxidáz membránhoz kötött enzimként lelhető fel. A nem phagocytá sejtekben a NOX enzimnek számos izoformája ismert, amelyek kisebb koncentrációban a sejt különböző kompartmentjeiben termelve a szuperoxid-gyököt a szignál transzdukcióban töltönek be fontos szerepet (Hancock et al., 2001).

A reaktív oxigén vegyületek szignálfunkciójának fontos feltétele, hogy ne csak a képződésük, hanem lebontásuk vagy kevéssé reaktív vegyületekké történő redukciójuk is szabályozható legyen (2. ábra). A szuperoxid-anion gyök a szuperoxid-dizmutáz szubsztrátjává válva hidrogén-peroxiddá alakul. A hidrogén-peroxid „inaktiválásának” legegyszerűbb módja, ha a kataláz vízzé és molekuláris oxigénné bontja (Chance et al., 1979). A glutation-peroxidáz pedig a hidrogén-peroxid vízzé és molekuláris oxigénné történő redukciójához szükséges hidrogént a redukált glutation (GSH) oxidációja révén nyeri (Sarma és Mugesh, 2008). Az oxidált glutationt (GSSG) a glutation-reduktáz alakítja vissza GSH formába, hidrogén donorként NADPH-t felhasználva (Mannervik, 1987). A thioredoxin-rendszer hasonló elv szerint működik, miközben a thioredoxin-reduktáz a NADP koenzimről vonja el a hidrogént (Holmgren, 1998). Emellett azonban

a GSSG, a GSSG-transzferáz enzim segítségével, nagy hatékonysággal kijut a sejtekből, lehetővé téve annak eltávolítását a szervezetből (Batty et al., 2009).



2. ábra: A szuperoxid-anion gyök, illetve a hidrogén-peroxid enzimátikus átalakulási lehetőségei (részletes leírás az ábra előtti szövegben).

A ROS vegyületeken kívül a reaktív nitrogén származékokat is meg kell említeni: ezek a vegyületek elsősorban a nitrogén-monoxid gyök, és annak szuperoxid-anionnal való reakciójából keletkező peroxinitrit származékai. A nitrogén-monoxid gyök legfőbb forrása a nitrogén-oxid-szintáz, amely az argininből állítja elő a nitrogén-monoxidot, és amely számos más hatása mellett például a simaizomtónus szabályozásán keresztül a vérerek átmérőjét is befolyásolja (Dröge, 2002).

A biológiai rendszerek az oxidatív vegyületeket többféle antioxidatív mechanizmus útján tartják ellenőrzésük alatt, mivel a fokozott mennyiségben termelődő reaktív vegyületek károsítva a sejteket számos betegség kockázatát növelik (Halliwell és Gutteridge, 2008). Az elsődleges szabad gyök fogó antioxidáns védelmet az antioxidáns enzimek látják el, de léteznek nem enzimátikus antioxidánsok is: például a mitokondriális koenzim-Q vagy a liponsav, továbbá a korábban már említett GSH. Az

extracelluláris térben a Cu^{2+} -kötő cöruoplazminnak, a Fe^{2+} -kötő transzferrinnek, az albuminnak, a piruvátnak, a húgysavnak van jelentős antioxidáns hatása. Exogén antioxidánsok egyes vitaminok (C, E, A), a béta-karotin vagy a flavonoidok, mint például a kísérleteinkben is használt rezveratrol. Az antioxidánsok általában olyan vegyületek, melyek reakcióba lépve a szabad gyökökkel vagy egyéb reaktív vegyületekkel megakadályozzák, hogy a sejt valamely fontos molekulája károsodjon az azokkal való kölcsönhatás során.

3.4. A sejthalál néhány jellegzetessége

A sejtek pusztulása a szövetek, szervek és az egész szervezet életének szükséges velejárója, fiziológias és patológias viszonyok között egyaránt. Már 1842-ben említették arról, hogy a normális fejlődés során sejtek pusztulnak el a szervezetben (Vogt, 1842). A XX. században kutatások sora foglalkozott a sejtek halálának folyamataival, eleinte a morfológiai, később egyre inkább a biokémiai változásokat előtérbe állítva.

1972-ben írták le a sejthalál egy sajátos módját, amely merőben eltér az addig megismert sejtpusztulási formától, és szerepet játszik az embrionális fejlődésben, a proliferálódó szövetekben a sejtek állandó „átépülésében”, valamint különböző patológias folyamatokban is (Kerr et al., 1972). A sejthalál e formájának a görög eredetű „apoptózis” elnevezést adták, ami magyarul levélhullást jelent.

Korábban a sejthalál valamennyi formáját nekrozisnak nevezték, és a szabad szemmel is látható nagy tömegű sejt- és szövetelhalást is ezzel a kifejezéssel jelölték. 1972 után a sejthalálnak már két alapvető formáját különítették el: a nekrozist és az apoptozist. A nekrozis általában passzív folyamat, amely a sejtek viszonylag gyors pusztulásával, szabálytalan szétesésével jár. A citoplazmamembrán károsodása nyomán a sejtalkotók jelentős része az extracelluláris térbe jut, és ott az elpusztult sejt maradványai gyulladást okoznak. Általánosságban elmondható, hogy a nekrozis valamilyen kóros folyamat velejárója, patológias viszonyok eredménye és/vagy okozója (Majno és Jorris, 1995).

Ezzel szemben az apoptózis inkább aktív folyamat következménye. A sejtciklusnak, a sejtek életének természetes velejárója, ugyanakkor patológias viszonyok között is gyakori jelenség. A korai kutatások még csak a jellegzetes morfológiai

jegyeket ismerték fel, de ma már tudjuk, hogy az apoptózis bonyolult és szigorúan szabályozott intracelluláris jelátviteli mechanizmusok eredményeként zajlik le (Häcker, 2000).

Az apoptózis előnye a nekrozissal szemben, hogy nem következik be a sejt szétesése, hanem membránnal határolt apoptotikus testek keletkeznek, amelyeket a phagocyták bekebeleznek. Így az apoptózis nem okoz gyulladást, bár az immunrendszert aktiválja. Lezajlása nagyrészt energiaigényes, amit a sejt az ATP hidrolízisével nyer (Hu et al., 1999).

Az apoptózis a többsejtű szervezetek működésének elengedhetetlen feltétele. A vírussal fertőzött és a tumoros sejtek pusztulása, az előregedett sejtek újakra cserélődése, vagyis a szöveti homeostasis fenntartása szintén apoptózissal történik. Nagy számban találunk apoptotikus sejteket, amikor egy szerv fiziológiás körülmények között méretében és tömegében megkisebbedik. Így például a fiziológiás involúciós folyamat fontos része, hogy a feleslegessé váló sejtek apoptózissal pusztulnak el. A sejtek differenciációjában, valamint az immunrendszer kialakulásában és működésében is vitathatatlan a programozott sejthalál fontossága (Häcker, 2000).

A további kutatások a sejthalál újabb változatait fedezték fel, így ma négy alapvető sejthalál formát ismerünk, és további számos atipikus változatot különítünk el. Így a már korábban említett apoptózis és nekrozis mellett meg kell említenünk az autofágiát és a kornifikációt (Kromer et al., 2009).

3.4.1. Nekrozis

A nekrozisra jellemző legfőbb morfológiai jegyek közé tartozik, hogy a sejtorganellumok duzzadásával egyidejűleg a sejt térfogata jelentősen megnövekszik. A sejtmembrán felszakad, melynek eredményeként annak belső tartalma a külső környezetbe, az extracelluláris térbe jut, és ott gyulladást indukál. A nekrozist sokáig teljesen szabályozatlan, véletlenszerű eseménynek tartották, de mára már tudjuk, hogy egyes nekrotikus formák kiváltásában jelátviteli utak is szerepet játszhatnak. A Receptor-interacting proteint (RIP-1) számos nekrotikus sejthalál során sikerült már kimutatni, amelynek a sejt pusztulásában betöltött szignál funkcióját jelzi, hogy apoptózis során a kaspáz-8 inaktíválja (Galluzzi és Kroemer, 2008). Ezidáig azonban

nem sikerült a nekrozisra biztosan jellemző biokémiai paramétert meghatározni, ezért e sejthalál típust mind a mai napig inkább negatív módon, az apoptózisra vagy más sejthalál formákra jellemző tulajdonságok hiányával jellemezzük (Temkin et al., 2005).

3.4.2. Autofágia

Az autofágia során a sejt saját fehérjéit és sejtalkotóit bontja le azáltal, hogy kettős membránnal körülvett vezikulák kialakulásával ún. autofagoszómák jönnek létre. Ez a citoplazmát vagy egyéb sejtalkotókat is tartalmazó kompartment a lizoszómával egyesülve autolizoszómát alakít ki, amelyben az odajutott anyagok a savas hidrolázok aktivitása révén lebontásra kerülnek (Noda et al., 2002).

Az autofágia ősi mechanizmus, melynek elsődleges szerepe hogy éhezés során a sejt, illetve a szervezet túlélését biztosítsa a nélkülözhető sejtalkotók lebontása révén. Fontos feladata van továbbá az egész szervek egyidejű pusztulásával járó események lezajlásában, mint amilyen például a rovarok vagy a kétéltűek metamorfózisa során a lárvális szervek pusztulása. A tumoros sejtekre az autofágiás aktivitás csökkenése jellemző, ezáltal a folyamat a túlzott mértékű sejtnövekedéssel és proliferációval szembeni biztonsági kontrollként is értelmezhető. Az autofágiás sejthalál az apoptózissal szemben a programozott sejthalál kaspáz-független formájának tekinthető (Gozuacik és Kimchi, 2004).

Morfológiailag leginkább elektronmikroszkóppal lehet elkülöníteni az autofágiás sejthalált az apoptózistól a kromatin kondenzáció nélkül létrejövő erőteljes citoplazmatikus vakuolizáció alapján. Biokémiai elkülönítésre eddig csak egyetlen fúziós fehérje, a GFP-LC3 protein (Microtubule associated protein light chain 3, melyet Green Fluorescent Proteinhez kötnek) megnövekedett mennyisége és sejtbeli lokalizációjának meghatározása nyújt támpontot (Kromer et al., 2009). Az LC3 fehérje fiziológiai körülmények között oldott állapotban található meg a citoplazmában, az autophagoszóma kialakulásakor azonban annak kettős foszfolipid membránjában nagy mennyiségben koncentrálódik. Valójában a GFP és LC3 génjeinek N-terminális végét kapcsolják össze és kötik őket egy megfelelő promotor régióhoz. Az így létrehozott plazmid vektort mikroinjektálják egér megtermékenyített petesejtjeibe, amelyből egy

GFP-LC3 fehérjét a szöveteiben expresszáló transzgénikus állat fejlődik ki (Mizushima és Kuma, 2008).

3.4.3. Kornifikáció

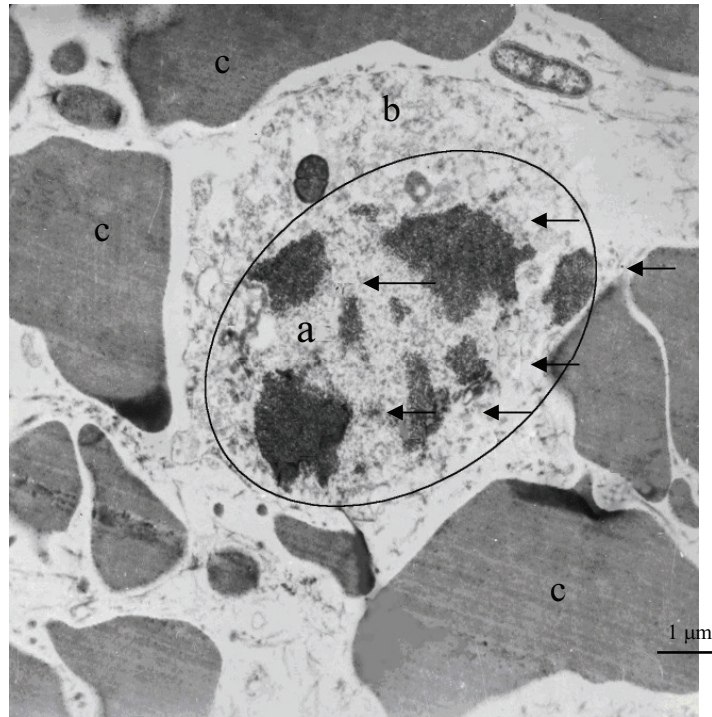
A bőr hámrétegében lezajló szarusodás az apoptózistól mind morfológiailag, mind biokémiailag különböző programozott sejthalál típus. Míg más sejthalál formáknál kívánatos az elpusztult sejtek eltávolítása, addig a kornifikáció során elhalt sejtek fontos védelmi szerepet töltenek be (Kromer et al., 2009). Az epidermis legfőbb alkotóeleme a keratinocytá, mely differenciációja folyamán a bazális rétegből a felszín felé vándorol. E folyamat során, amelynek végállapota az elszarusodott és elpusztult corneocytá, a sejtek programozott morfológiai és funkcionális változásokon mennek keresztül. Ennek eredményeként az elszarusodott sejtekben specifikus fehérjék (involucrin, keratin, loricrin) és lipidek (zsírok, ceramidok) halmozódnak fel, amelyek biztosítják az elszarusodott hám funkcióját: mechanikai ellenállás, rugalmasság, vízhatlanság (Lippens et al., 2005).

Hasonló folyamat játszódik le a kérődzők előgyomraiban, ahol a többrétegű elszarusodó laphám legfelső sejtrétegei a kornifikáció során elhalnak, de fontos védelmi funkciót ellátva továbbra is a hám felületén maradnak (Gálfı et al., 1992).

3.4.4. Apoptózis

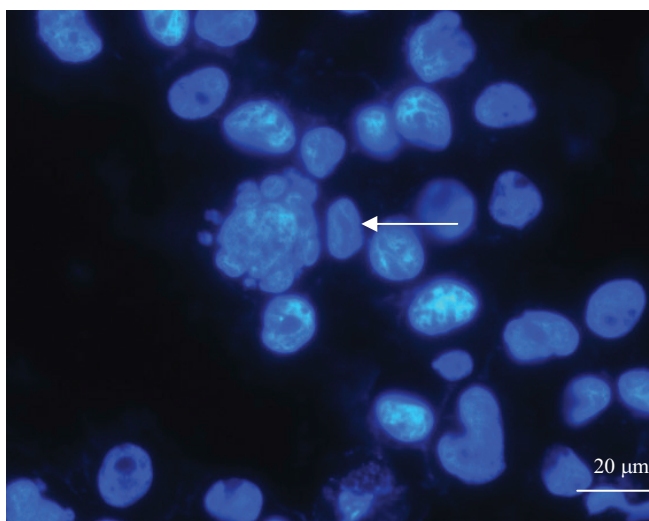
Az 1972-ben Kerr által megfogalmazott és leírt apoptózis elsősorban morfológiai jegyek alapján határozta meg a sejthalál e típusát. A sejt lekerekedésével és térfogatcsökkenésével kezdődő folyamat eredményeként a sejt környezetével való kapcsolata megváltozik. E változások hátterében a kaspázok hatására a sejt vázalkotó fehérjék szerkezetében végbemenő átalakulások állnak. A plazmamembránon jellegzetes kitüremkedések („bleb”-ek) képződnek, és a sejt elválik az extracelluláris (EC) mátrix elemeitől, valamint a szomszédos szöveti sejtektől. A környező sejtektől illetve a mátrix elemeitől való elválás hámsejteknel különösen fontos eleme az apoptózisnak. Hiszen apoptózis esetén kialakuló „sejtleválás” fordítva is igaz, vagyis a

hámsejt alaptól való elszakadása apoptózist idéz elő. A folyamatot anoikis apoptózisnak hívjuk, mert fontos szabályozó szerepe van abban, hogy az esetlegesen leváló sejtek ne legyenek képesek metastasist képezni (Valentijn et al., 2004).



3. ábra. Egy normoketonaemiás szarvasmarha endometrium biopsziás mintájáról készült elektronmikroszkópos felvétel. A hámsejt magjában jól látható elektrondenz területek (nyíllal jelölve) az apoptózisra jellemző kromatinállomány kondenzációt és fragmentációt jeleznek. A kötőszöveti sejt magja „a”-val, citoplazmája „b”-vel, a körülötte levő vörösvérsejtek „c”-vel jelölve. Saját felvétel.

A sejtmagban a maghártya belső oldalához tömörödő kromatinállomány sűrűbb anyaggá kondenzálódik, ami elektrondenz területek formájában jelenik meg az elektronmikroszkópos (EM) képeken (3. ábra). Ezzel párhuzamosan endonukleázok a kromoszómális DNS-t elhasítják: a nukleoszómák közötti területen hasítva 200 bázispárnyi DNS-darabok keletkeznek (Wyllie, 1980a). Az így kialakult fragmentumokat gélelektroforézisnek alávetve jellegzetes ún. DNS-létrát kapunk. A DNS széttöredezése az apoptózis egyik legjellegzetesebb bélyege, és eredményeképpen a sejtmag végül kis, homogén darabokra esik szét (4. ábra).



4. ábra: HT29R sejteken fluoreszcens DAPI magfestés után jól látható a középen lévő sejt magfragmentációja (nyíllal jelölve). Saját felvétel.

A mitokondriumok megduzzadnak vagy kondenzálódnak, membránjuk permeabilitása megnő. Az endoplazmatikus retikulum (ER) az apoptózis késői szakaszában kitágul, citoplazma-vakuolumok képződnek, és a legtöbb membránstruktúra kondenzációja, depolimerizálódása figyelhető meg. A folyamat végén létrejövő apoptotikus testek olyan, membránnal határolt, változatos méretű és összetételű vezikulák, amelyek az elpusztult sejt anyagait tartalmazzák. Az apoptotikus testeket az apoptózis során transzlokálódott plazmamembrán veszi körül, melynek foszfatidil-szerint tartalmazó belső rétege kerül kívülre, kemotaktikus ingert szolgáltatva ezzel a fagocytáknak (Kerr et al., 1972; Häcker, 2000).

3.5. Biokémiai változások és jelátviteli utak az apoptózisban

3.5.1. Kaszpáz-függő utak

Az apoptózis folyamatában központi szerepet töltenek be a kaszpáz (cisztein-aszpartát-specifikus proteáz) enzimek, amelyek aktív kötőhelyén cisztein található és az aszparaginsav mellett hasítják el csaknem száz különféle szubsztrátjukat: többek között

a DNS-javító enzimeket, mint például a PARP; a nukleáris laminokat, ezáltal biztosítva a magfragmentációt; citoskeletális komponenseket, mint az aktin és a gelsolin (Kothakota et al., 1997).

Az inaktiválás mellett számos molekulát aktiválni képesek, például önmagukat is autokatalízis útján, így beindítva a kaszpáz kaszkádot, illetve más ún. effektor kaszpázokat. Valamennyi kaszpáz inaktív zimogénként termelődik, az iniciátor kaszpázoknak jellemzően nagyobb és összetettebb ún. prodoménjük van, amelyek leválásával aktiválódik az enzim. Aktiválják még az endonukleázokat (kaspáz-aktivált DNáz) azáltal, hogy elhasítják annak inhibitorát, így utat engedve a DNS fragmentálódásának (Li et al., 2001).

Az emberben összesen 14 féle kaszpáz enzimet ismerünk, melyek közül a kaszpáz-8 és kaszpáz-9 más kaszpázokat elhasítva indítja be a kaszkádot, ezért ezeket iniciátor kaszpázoknak nevezzük. Az effektor kaszpázok, mint például a kaszpáz-3, ezzel szemben más sejten belüli fehérjék hasítását végzik.

Az apoptózisnak két jellegzetes útja lehet attól függően, hogy külső vagy belső szignálok indítják be a sejthalál folyamatát: az extrinsic és intrinsic út. Ezek az utak egymástól függetlenül, de egyszerre, egymást erősítve is lejátszódhatnak.

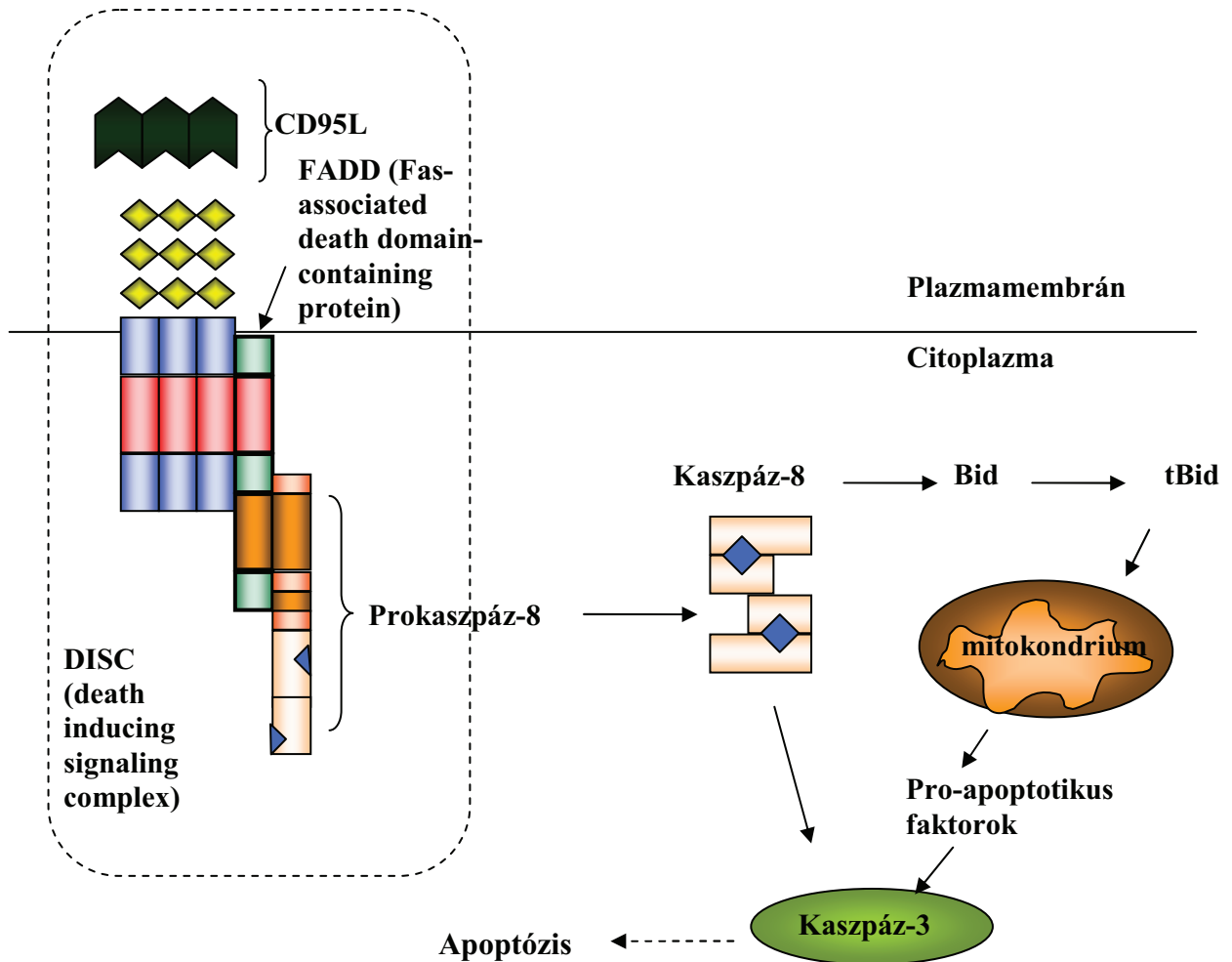
3.5.1.1. Az extrinsic út

Az extrinsic vagy receptorális út valamilyen kedvezőtlen külső körülmény, és ezt követően egy ligand receptorhoz kötődése hatására indul be. Ezeket a ligandokat általában az immunrendszer sejtjei bocsátják ki.

Két fő „halálreceptor”-típus található a citoplazmamembránon, a FasR (Fas-receptor) és a TNFR (Tumor Nekrózis Factor α -1 receptor), melyek mindegyike jellegzetes trimer szerkezetet alkot a plazmamembránban (Wajant, 2002). Ezek a receptorok csak akkor lépnek működésbe, ha megfelelő ligand kapcsolódik hozzájuk, ami a macrophagok által termelt FasL (Fas-ligand) illetve a TNF α .

A receptornak a membrán belső oldalán lévő intracelluláris doménjeihez kapcsolódik a FADD (Fas-associated death domain) vagy a TRADD (TNFR1-associated death domain) (Cheng et al., 2002) molekula, amelyek a receptorhoz kötődött liganddal és a prokaspáz-8 enzimmal közösen alkotják az ún. DISC-et (Death-

inducing signalling complex). A DISC molekulakomplex kialakulásával elhasad a prokaspáz-8 és létrejön az aktív kaspáz-8, amely elindítja a kaspáz-kaszád autokatalitikus reakciósorát, valamint pro-apoptotikus faktorok (Bid) aktivációját is serkenti (Beg et al., 1996) (5. ábra). A Bid (BCL-2 interacting domain) faktor elhasadásával létrejön a hasított Bid (tBid – truncated Bid), mely a mitokondriumba jutva további apoptotikus faktorok felszabadulását idézi elő.



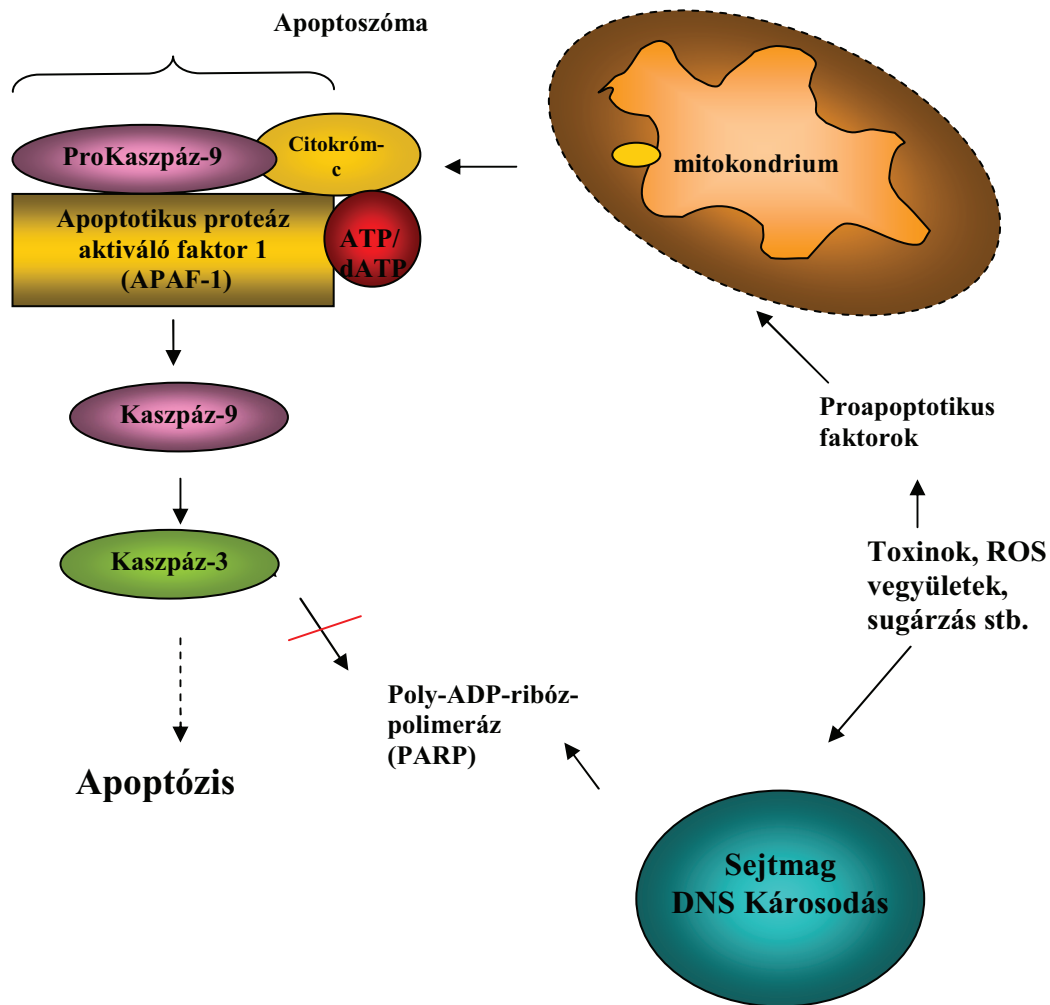
5. ábra: A receptoriális vagy extrinsic apoptotikus út menete (a magyaráztot lásd az ábrát megelőző szövegben).

Az immunrendszer sejtjei nemcsak a receptoriális úton, hanem a sejtmembránt átlukasztó perforin enzimjük segítségével is képesek granzyme-B molekulát juttatni a sejtbe és így közvetlenül is aktiválni a kaspázokat (Häcker, 2000).

3.5.1.2. Az *intrinsic* út

Az *intrinsic* út a sejt homeostasisának súlyos fokú megváltozásakor (pl. redox állapot, pH) vagy a genom irreverzibilis sérülésekor (pl. vírusfertőzés, sugárzás) indul be. A folyamatban kiemelt szerepe van a mitokondriumoknak, ezért mitokondriális útnak is szokták nevezni. Ennek bonyolult szabályozásában nagy szerepet játszanak különféle pro- és anti-apoptotikus faktorok, amelyek a Bcl-fehérjecsaldba (B cell lymphoma) tartoznak. Az apoptózis kezdetén a pro-apoptotikus faktorok (Bak, Bax) a mitokondrium külső membránjában csatornákat hoznak létre, emiatt megnő a membrán permeabilitása és citokróm-c molekulák jutnak ki a citoplazmába (Van der Heiden et al., 1997).

Ezzel egyidejűleg a mitokondrium belső membránja depolarizálódik, és a szabaddá váló citokróm-c a citoplazmába kerülve a prokaspáz-9, Apaf-1 (Apoptotikus proteáz aktiváló faktor-1) és ATP molekulákkal együtt az apoptoszómát hozza létre. Az Apaf-1 proteolitikus hasítás eredményeként aktív kaspáz-9-cé alakítja a prokaspáz-9-et, miközben az ATP és/vagy a dATP hidrolizálódik (6. ábra). A kaspáz-9 ezután a prokaspáz-3 enzimet hasítva aktiválja azt, és ezzel beindítja a kaspáz-kaszádót (Li et al., 1997; Saleh et al., 1997; Acehan et al., 2002).



6. ábra: A mitokondriális vagy intrinsic apoptotikus út menete a citoplazmában (a magyaráztot lásd az ábrát megelőző szövegben).

Az intrinsic út beindítására képes hatások gyakran közvetlenül is károsítják a sejtet és annak örökítőanyagát. A DNS károsodás eredményeként egy javító (repair) enzim, a PARP aktiválódik és a sejt tartalék ATP molekuláinak felhasználásával igyekszik a sérült maganyagot helyreállítani. Mivel a pusztuló sejt számára már felesleges a károsodott molekulák javítása, ezért a fiziológiás apoptózis során a PARP a kaspáz-3 szubsztrátjává válva elhasad és inaktiválódik.

Az intrinsic út kezdetén kialakuló megnövekedett mitokondrium membrán permeabilitás a mitokondrium depolarizációját is okozza, aminek eredményeként a metabolikus folyamatok is zavart szenvednek és fokozott szabad gyök képződés indulhat be. Így a mitokondrium károsodása a szabad gyök képzés fokozódásával is

járhat, vagy más oldalról a fokozott szabad gyök képződés is előidézhetheti a mitokondrium károsodását.

Ismeretes, hogy a p53 tumorszuppresszor gén, illetve az általa kódolt fehérje, fontos szerepet tölt be az apoptózis indukciójában. Ha a DNS sérül, a p53 koncentrációja megemelkedik a citoplazmában, és a proapoptotikus Bax faktor termelésének fokozásával, valamint az antiapoptotikus szignálok (Bcl-2) csökkentésével megindítja az apoptózis mitokondriális útját. Emellett több Fas-receptor jelenik meg a sejthártyán, ezáltal serkentve az extrinsic utat is (Schuler és Green, 2001).

3.5.2. A kaszpáz-kaszád és következményei

Az extrinsic út során a kaszpáz-8, míg az intrinsic út során a kaszpáz-9 aktiválja a prokaspáz-3 enzimet, a két út tehát ezen a ponton összekapcsolódik. Az aktivált kaszpáz-8 vagy kaszpáz-9 elhasítja a prokaspáz-3-at és kialakul a kaszpáz-3, majd sorban aktiválódik a kaszpáz-7 és a többi kaszpáz. Az effektor kaszpáz-3 aktiválja a DNS hasítását végző $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -függő endonukleázt, a CAD-ot (caspase-activated DNase) azáltal, hogy inaktiválja az azt gátló és a citoplazmában tartó ICAD (inhibitor of CAD) molekulát (Janicke et al., 1998). A CAD szabaddá válásával az a sejtmagba kerül, ahol elhasítja a DNS szálakat.

Az effektor kaszpázok túlnyomórészt a citoplazmában működnek, de számos magbéli fehérjét is hasítanak, mint például a javítóenzim PARP-ot és a sejtmag integritásáért felelős laminokat (Liu et al., 1997). A sejtváz lebontása is nagyrészt kaszpáz-közvetített folyamat, amelynek során az ATP-hidrolízis mellett számos struktúrfehérjét (pl. aktin, fodrin, gelsolin) is elhasítanak, valamint aktiválják a sejtvázat lebontó enzimeket és a különféle szabályozó szerepű protein-kinázokat (Kothakota et al., 1997). A kaszpázok működése eredményezi a „bleb”-ek kialakulását is, hiszen serkentik az aktin-miozin komplex szabályozásáért felelős MLCK-t (Miosin light chain kinase), a következményesen működésbe lépő aktin-miozin komplex pedig létrehozza a kitüremkedéseket (Coleman, 2001).

Az apoptózis során – szintén kaszpáz-mediált folyamat eredményeként – a fiziológiásan a sejtmembrán belső oldalán lokalizálódó foszfatidil-szerin (PS) és foszfatidil-etanolamin a külső membránfelszínre kerülnek, transzlokálódnak, ami

specifikus apoptotikus bélyegnek tekinthető. Ezek a molekulák az ún. „eat me” szignált biztosítják a fagocyták számára (Emoto et al., 1997).

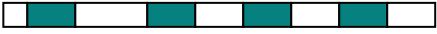


A folyamat záró lépéseinek, az apoptotikus testek kialakulásának és a citoplazma-vakuolák képződésének, molekuláris háttere még kevésbé tisztázott, de feltehetően nagyrészt szintén kaspáz-mediált (Häcker, 2000) eseményekről van szó.

3.5.3. Pro-apoptotikus és anti-apoptotikus faktorok

Az apoptózis központi szabályozásában lényeges szerepet tölt be a Bcl-2 családba tartozó csaknem 20 különböző fehérje. A csoport első tagját 1988-ben fedezték fel folliculáris B-sejtes lymphomákban, ahol jelentős expressziójával gátolta a daganatosan transzformált sejtek apoptózisát (Vaux et al., 1988). Az azóta eltelt időben számos, a családba tartozó fehérjét írtak le, amelyek szerepe a mitokondrium membránstabilitásának fenntartása és a pro-apoptotikus proteinek gátlása. Tagjaikat három funkcionális csoportba oszthatjuk (Blaineau és Aouacheria, 2009) (2. táblázat).

A sejt sorsát az apoptózist gátló anti-apoptotikus faktorok és az apoptózist indukáló pro-apoptotikus faktorok aránya határozza meg. Az anti-apoptotikus molekulák hatásukat úgy fejtik ki, hogy fehérjepárokat képezve a sejthalált kiváltó tagokkal gátolják azokat. A párképzés során az egyik fehérje BH3 doménje a másik fehérje BH1, BH2, BH3 és BH4 doménje által képzett zsebbe illeszkedik. A sejthalált kiváltó Bax és Bak fehérjék – amennyiben nincsenek gátolva – a mitokondriumba jutva membráncsatornát képeznek, amelyen keresztül a mitokondriumból képes kijutni a kaspáz-rendszert aktiváló citokróm-c. A csak BH3 domént tartalmazó fehérjék elősegítik a Bax/Bak proteinek csatornát létrehozó képességét oly módon, hogy BH3 doménjükkel a védőtagok zsebébe illeszkedve a gátló párokból felszabadítják a sejthalált kiváltó tagokat (Dejean et al., 2006).

2. táblázat: A Bcl-2 fehérjecsaldába tartozó anti- és pro-apoptotikus faktorok csoportosítása, a legismertebb példák az egyes csoportokra és vázlatos szerkezeti felépítésük

Anti-apoptotikus faktorok	Bcl-2	
	Bcl-x _L	BH4 BH3 BH1 BH2
Pro-apoptotikus faktorok (több doménből álló)	Bax	
	Bak	BH3 BH1 BH2
Pro-apoptotikus faktorok (csak BH3 domén)	Bid	
	Bad	BH3
	Noxa	
	Puma	
	Bim	

Az anti-apoptotikus tagok potenciális onkogének, állandó magas expressziójuk tumoros transzformációhoz vezet, míg a pro-apoptotikus tagok tumor szupresszorok, mutációjuk emiatt gyakori a daganatos betegségekben.

3.5.4. Kaszpáz-független utak

Az apoptózisnak vannak kaszpázoktól független útjai is, amelyek nagyrészt a mitokondriumokhoz kötődnek (van Loo et al., 2002). Az AIF (apoptosis-inducing factor) a nyugvó sejtekben a mitokondriumban a két membrán közötti térben tárolódik, és a Bak, Bax, Bid pro-apoptotikus faktorok hatására a magba vándorol és kaszpázoktól függetlenül beindítja a kromatin kondenzálódást és a DNS fragmentálódást (Cande et al., 2002; Cregan et al., 2004).

Az intrinsic út megindulásakor a citokró-m-c mellett AIF, valamint endonukleáz-G szabadul ki a mitokondriumból a citoplazmába, amelyek a kaszpáz-független utakban játszanak kulcsszerepet (Chiarugi, 2005). Ez utóbbi molekula szintén nukleáris elváltozásokat, DNS-fragmentációt idéz elő (Li et al., 2001).

A PARP enzim a DNS hibáinak kijavításában vesz részt, nagy mennyiségben azonban a mitokondriális AIF-kibocsátás serkentésével apoptózis beindulásához is vezethet (Yu et al., 2002; Alano et al., 2004; Cipriani et al., 2005). Az enzim egyúttal a kaszpázok egyik szubsztrátja is, tehát az kaszpázfüggő utakban is szerepet játszik (Scovassi et al., 2004).

3.5.5. Az apoptózis energiafüggése, átmenete nekrozisba

Az apoptózis számos ponton igényel energiát ATP formájában. Az apoptoszóma kialakulásakor ATP vagy dATP kapcsolódik az APAF-1-gyel, s így aktiválódik a kaszpáz-9 (Hu et al., 1999). Energiaigényes a citoplazmában lokalizálódó molekulák (pl. CAD), apoptotikus faktorok intranukleáris transzportja (Yasuhara et al., 1997), valamint az apoptózist szabályozó valamennyi proteáz-kináz aktiválása és működése szintén ATP-t igényel. A mitokondriumokban az intrinsic út kezdetén lejátszódó változások hasonlóképpen energiaigényes folyamatok (Eguchi et al., 1999).

Ha egy sejtnak nem áll rendelkezésére a szükséges ATP mennyiség, akkor az apoptózis helyett nekrotikusan pusztul el. Ezen hipotézis szerint tehát a rendelkezésre álló energia lehet a meghatározó az apoptózis és nekrozis közötti „döntésben” (Leist et al., 1997, Nicotera és Melino, 2004). Valószínű, hogy az apoptózis programja csak a kezdeti lépésekhez igényel ATP-t, mivel abban az esetben, ha csak mintegy 1,5-2 órával a kiváltó stimulus után vonják meg az ATP-t, akkor a folyamat már nem megy át nekrozisba (Chiarugi, 2005). Ha pedig a már éppen beindult apoptózis megy át nekrozisba, akkor az elhalásos folyamatok jóval lassabban mennek végbe, mint az önálló nekrozis során. Ez arra enged következtetni, hogy a nekrozis bizonyos történései szintén szabályozottak, és nem csupán a sejt passzív összeomlásáról van szó (Chiarugi, 2005).

Abban az esetben tehát, ha a szervezet energiaellátottsága nem kielégítő, a szöveti homeostasis fenntartása érdekében fiatalabbakra cserélődő sejtek nagyrészt nekrozissal pusztulnak el, ami patológias folyamatok kialakulását eredményezheti.

Ma már tudjuk, hogy az apoptózis és a nekrozis nem különül el élesen egymástól, egymásba is átalakulhatnak, emiatt célszerűbb tehát apoptózis-szerű és nekrozis-szerű sejthalálról beszélni (Kromer et al., 2009).

A korábban tárgyalt intrinsic apoptózis egyik gyakori kiváltója a DNS primer károsodását is eredményező szabad gyök képződés. A DNS károsodás növeli a PARP túlzott aktivitását. Az enzim a DNS szál szintéziséhez jelentős mennyiségű NAD^+ -ot használ, melyet ADP-ribózra és nikotinamidra hasítva ADP-ribóz polimereket épít fel. A NAD^+ reszintézise ATP igényes folyamat, ezért az apoptózisban lévő sejt ATP koncentrációja olyannyira lecsökkenhet, hogy a kaspáz kaspáz rendszer működése zavart szenved (de Murcia et al., 1994). Ha az apoptotikus út megszakad, akkor a károsodott sejt az energiát nem igénylő nekrozisban pusztul el. A poli-ADP-ribóz-polimeráz az apoptózis lezajlása során általában a kaspáz-3 szubsztrátjává válik, és egy 89 és 24 kDa darabra hasadva inaktiválódik, utat engedve az apoptózis zavartalan lefolyásának (Boulares et al., 1999). Azonban ha aktív marad, vagyis nem hasad el, nekrozis alakul ki.

3.5.6. A sejthalál szerepe a szöveti involúcióban

A szöveti struktúrák lebontásában és átépülésében fiziológias körülmények között is nagy jelentősége van a sejthalálnak. A szöveti involúció számos életszakaszban természetes velejárója a szervezet működésének, például a thymus, az emlők vagy a méh vemhesség utáni átalakulása. Ha egy szerv mérete és tömege jelentősen megkisebbedik, akkor a sejtek többsége fiziológias körülmények között apoptózissal pusztul el.

Amikor a thymus elveszti a T-lymphocyták érésében betöltött szerepét, jelentős átalakuláson megy keresztül, a szerv atrophizál és sejtjei apoptózissal pusztulnak el. A folyamatot a thymus involúciójának nevezzük, amelyet a glükokortikoidok hatása idéz elő (Cidlowski et al., 1996; Wyllie, 1980b). A folyamatot a Bak serkentő, és Bcl gátló faktorok, valamint rajtuk keresztül a citokróm-c mediálják, tehát alapvetően az intrinsic út aktiválása játssza benne a fő szerepet. Melatoninnal az apoptózis, és vele a thymus involúciója meggátolható (Hojman et al., 2004). A melatonin élettani hatását antioxidáns aktivitásán, illetve melatonin receptoron keresztül képes kifejteni. A glükokortikoid receptor egy 90 kDa-os heat shock proteinhez kapcsolódik, amely receptor kötődés esetén leválik és a magba vándorolva egy transzkripciós faktort aktivál. Ennek eredményeként fokozódik a proapoptotikus (Bax) fehérjék expressziója

és apoptózis jön létre. Feltételezzük, hogy a melatonin a heat shock protein glükokortikoid receptoroktól való leválását gátolja meg, így nem tud glükokortikoid hatás kialakulni (Asainz, 1999).

Hasonló involúciós folyamatok zajlanak le ellés után az uterusban is. A méretében és tömegében is megnövekedett vemhes méhnek ugyanis vissza kell nyernie vemhesség előtti állapotát. A folyamat során a frissen ellett tehén 9 kg-os méhe megközelítőleg 1 hónap alatt 1 kg-ra épül le, ami 90%-os tömegvesztést jelent. A sejtek nagyrészt apoptózissal pusztulnak el, a méh interstitialis állományának elbontásában pedig a kollagenáz és különböző proteázok vesznek részt. Az involúció során keletkezett szövettörmelék végül lochia formájában távozik a méhkontrakciók eredményeképpen (Youngquist et al., 2007).

Ismeretes, hogy a carunculák felszíni rétegei degeneratív változásokon mennek keresztül, és végül elhalva leválnak az endometrium felületéről (Noakes et al., 2001). A carunculák közti területeken egyidejűleg megkezdődik az endometrium regenerációja, mely során újjáépül az extracelluláris mátrix, valamint a sejtsztódás és az apoptózis együttes hatásaként megújul az endometrium, és visszatér a vemhesség előtti állapotába (Takamoto et al., 1998).

A tehének megfelelő energia-egyensúlya a puerperium időszakában központi kérdés. A tejtermelés beindulása komoly metabolikus terhet jelent, különösen a tejhasznosítású tehének számára. Az ellés utáni időszakban az állat energiaigényének fokozódása elsősorban a gyorsan növekvő tejtermelés szükségletével magyarázható, ugyanakkor a szárazanyag-felvétel nem növekszik ezzel arányos mértékben, így negatív energia-egyensúly (NEB) alakul ki. Energiahiány esetén az állat saját tartalékait olyan módon mozgósítja, hogy fokozódik a zsírmobilizáció, amelynek hatására nő a vérplazmában a NEFA (Non-esterified fatty acid, szabad zsírsav) koncentrációja. Súlyosan energiahiányos állapotban a megváltozott metabolikus folyamatok hatására ketontestek – β -hidroxi-butirát (BHB), acetecetsav, aceton – jelennek meg a vérben, és hyperketonaemia, majd ketózis alakulhat ki.

Az ellés utáni időszakban úgy a növekvő tejtermelés, mint a méh apoptotikus sejtelhalással kísért involúciója energiaigényes folyamat. A NEB létrejötté tehát részben e folyamatok rendellenes lezajlásához és/vagy számos egyéb klinikai és szubklinikai kórkép kialakulásához vezethet: ketózis, zsírmáj szindróma, szaporodásbiológiai

zavarok, puerperalis metritis (Kulcsár et al., 2005). A méh involúciója során zajló energiaigényes folyamatok azt valószínűsítik, hogy NEB esetén gyakrabban alakulhatnak ki e szövödmények, mivel kellő mennyiségű ATP hiányában az apoptózis átmehet nekrozisba (Chiarugi, 2005), amely nagy tömegű sejtelhalás esetén súlyos fokú gyulladás kialakulásához, vagyis puerperalis metritishez vezethet.

3.5.7. Az apoptózis kimutatásának néhány módszere

Napjainkban már számos módszer áll rendelkezésre az apoptózis kimutatására. Ezek között azonban még mindig kevés olyan akad, amely önmagában teljes specificitást biztosít. Az apoptózis kimutatásának nehézségei abban rejlenek, hogy eltérések vannak az apoptózis menetében a sejtek, sejtípusok között, valamint egyes reagensek a korai stádiumban, míg mások a késői szakaszban mutatnak ki bizonyos molekulákat. További probléma, hogy számos módszer alkalmazása során pozitív eredményt adnak a nekrotikus sejtek is. A bizonytalanságok azonban több kimutatási módszer párhuzamos alkalmazásával jól kivédhetők (Kromer et al., 2009).

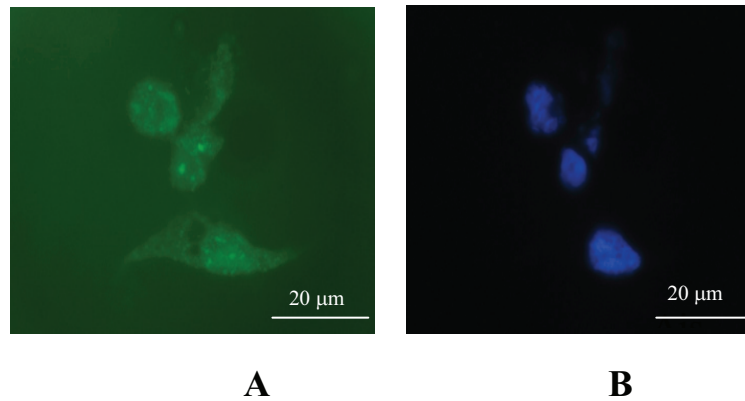
Különös nehézséget okoz továbbá a fixált szövetminták vizsgálata. A sejttenyészetekben alkalmazott kimutatási módszerek nem mindig alkalmasak intakt szövetek tanulmányozására, és különbségek lehetnek az apoptotikus program lefutásában is az eltérő szövetfélések között. A szöveti kimutatás további nehézsége, hogy az apoptotikus testeket a phagocyták gyorsan eltávolítják, így az apoptózis „nyomai” csak rövid ideig figyelhetők meg (Willingham, 1999).

3.5.7.1. Mikroszkópos megfigyelés

Az apoptotikus sejtek morfológiai változásai, mint amilyen a lekerekedés, elszakadás a környezettől, „blebbing”, sejt zsugorodás, sejttenyészetben fénymikroszkópos megfigyeléssel nagyon jól követhetők. Az apoptózis kimutatásának és vizsgálatának tehát ez az egyik legjobb módja (Willingham, 1999).

3.5.7.2. A transzlokálódott foszfatidil-szerin annexin V módszerrel való kimutatása

Az apoptózis során bekövetkező membránfoszfolipid-transzlokáció a foszfatidil-szerinhez (PS) kötődő, fluoreszcens festékkel jelölt annexin V molekulák segítségével lehetővé teszi az apoptózis kimutatását, úgy fluoreszcens mikroszkópia, mint áramlási cytometria segítségével. A foszfolipidek már az apoptózis korai szakaszában, még a DNS fragmentálódása előtt a külső membránfelszínre kerülnek, tehát a módszer alkalmas a kezdeti apoptózis kimutatására is (7. ábra). Nem minden esetben tekinthető azonban teljesen specifikusnak, hiszen nekrotikus sejtekből is kijuthat PS a cytolysis eredményeként (Zhang et al., 1997; van Engeland et al., 1998).



7. ábra: Caco-2 sejteken Annexin V és egyidejű DAPI festéssel kimutatott apoptózis. Az „A” képen a PS transzlokációt jelző Annexin V kötődés figyelhető meg mindegyik sejten. A „B” képen ugyanezen sejtek sejtmagja látható DAPI festéssel. Dr. Németh Edina felvétele.

3.5.7.3. A sejtmag kromatinjának specifikus festése

A sejtmag kromatinállományának festése ép sejtekben csak olyan, kis molekulatömegű, lipofil festékekkel (pl. Hoechst 33258) lehetséges, amelyek könnyen átjutnak a viszonylag kis permeabilitású sejtmembránon, és specifikusan a kromatin állományhoz kötődnek. Más festékek, mint például a 4,6-diamidino-2-indofenol (DAPI), vagy a propidium-jodid (PI) hidrofil karakterűek, ezért azok csak a már

károsodott sejthártyán juthatnak át. A kromatint ilyen módon megfestve, nyomon követhetővé válnak a morfológiai változások, így a DNS-fragmentáció is. Az apoptózis végső szakaszában a sejthártya átjárhatóvá válik, ezzel szemben a nekrotikus sejtek PIdal (vagy DAPI-val) már a nekrozis kezdetén is festődnek, így a módszer alkalmas arra, hogy elkülönítsük az apoptotikus és nekrotikus sejteket. A kromatinfestés sejttenyészetek és fixált szövetek esetén is viszonylag hatékonynak bizonyult (Willingham, 1999).

3.5.7.4. Gélelektroforézis

Az apoptózis egyik fő jellegzetessége a DNS szabályos fragmentálódása. A nukleinsav kivonása után gélelektroforézissel jellegzetes, létraszerű rajzolat jelzi az apoptózist, ez a DNS-létra. A módszer igen érzékeny: már néhány apoptotikus sejt jelenléte pozitív eredményt hoz (Willingham, 1999).

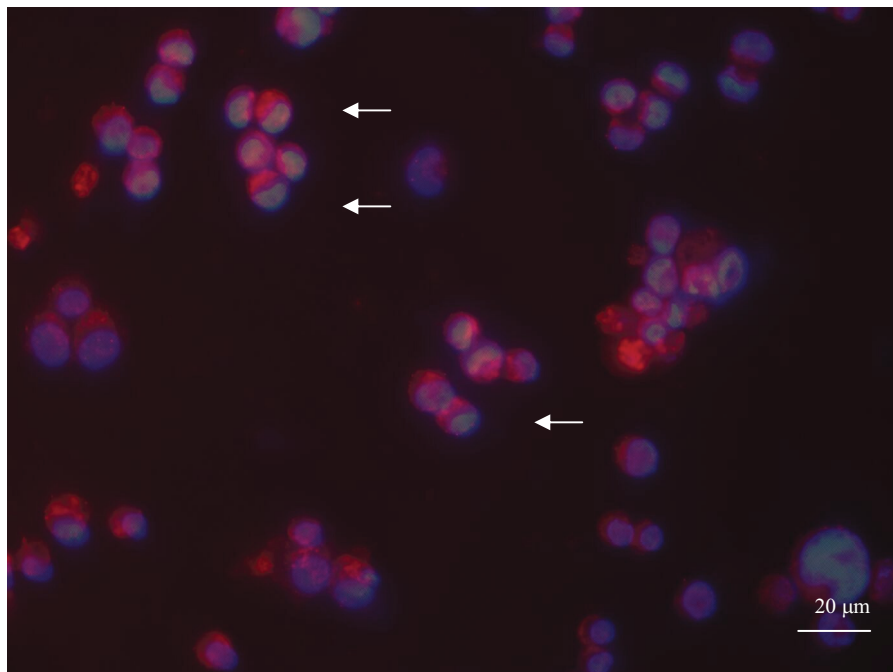
3.5.7.5. *In situ end-labeling (ISEL) módszerek*

Ezeknek a – fixált szöveteken is jól alkalmazható – módszereknek a lényege, hogy a feldarabolódott, szimpla szálú DNS-szakaszok 3'-OH végéhez jelzett szabad nukleotidokat (Frankfurt et al., 1996) kötnek. Ilyen módszer a TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end-labeling) és az ISNT (in situ nick-translation). Az előbbi során terminális-transzferázt adunk a rendszerhez, az utóbbinál pedig *E. coli* által termelt DNS-polimerázt (Gavrieli et al., 1992).

Ezeknek a módszereknek a hátránya viszont, hogy esetenként a nekrotikus sejtekre is jellemzőek a szabad 3'-OH nukleinsav-végek, így a pozitivitás nem tekinthető teljesen apoptózisra specifikusnak. Előfordul hamis festődés az alkalmazott sejt- és szövettartósítási módok, médiumok miatt is, amelyek szintén előidézhetik a DNS fragmentálódását, de akár hamis negatív eredményt is okozhatnak (Negoescu et al., 1996; Negoescu, 1998). Annak érdekében, hogy a szabad végek elérhetőek legyenek a jelzett nukleotidok számára, ajánlott előzőleg proteázos kezelésnek alávetni a mintát. Ez a művelet azonban szintén befolyásolhatja az eredményt.

3.5.7.6. Kaszpázok vizsgálata

Az apoptózis intracelluláris biokémiai folyamatainak megismerése számos új kimutatási elv kialakítását tette lehetővé. A kaszpázok szubsztrátjai – ellenük termeltetett ellenanyagok segítségével – kimutathatók. Az egyik legelterjedtebb ilyen módszer a kaszpáz-3 által elhasított PARP enzim 85 kDa fragmentumának kimutatása (Willingham, 1999) (8. ábra). A másik meghatározási lehetőség olyan ellenanyag használata, mely a kaszpáz egyik elhasított darabjához kapcsolódik (Srinivasan et al., 1998). Mindkét módszer jól alkalmazható fixált szöveti sejtek vizsgálatára is. Az aktiválódott kaszpázok specifikus szubsztrátjaik alkalmazásával, biokémiai módszerekkel is láthatóvá tehetők.



8. ábra: HT29R sejteken az elhasított PARP fragmentum (85 kDa) elleni antigénnel (piros) és egyidejű DAPI (kék) festéssel kimutatott apoptózis (nyíllal jelölve). Saját felvétel.

Kifejlesztettek olyan antitestet is, amely a „bleb” képződéshez és a sejtváz leépüléséhez vezető aktin kaszpáz-mediált lebontásának egyik termékére, az ún.

fraktinra specifikus (Yang et al., 1998). Bár ilyen „bleb”-ek apoptózistól függetlenül is létrejöhetnek, a módszer szintén ígéretesnek tűnik fixált szövetminták esetén.

Az apoptózis során keletkező termékek, szubsztrátok stb. ellen termelt antitestek mind-mind újabb módszereket jelenthetnek, és a biokémiai folyamatok pontosabb felderítése számos új kimutatási mód kidolgozását teszi lehetővé.

3.5.7.7. Mitokondriális módszerek

Az intrinsic út a mitokondriumok külső membránja permeabilitásának hirtelen megnövekedésével, és a citokróm-c citoplazmába jutásával kezdődik. A citokróm-c sejtbeli lokalizációjának meghatározása tehát már a folyamat kezdetének pillanatában alkalmas az apoptózis kimutatására. Bizonyos módszerek azon alapulnak, hogy a citokróm-c kiáramlás közben bekövetkező konformációváltozását mutatják ki (Jemmerson et al., 1999). Számos más mitokondriális antigén megjelenése a citoszolban szintén felhasználhatónak tűnik arra, hogy pl. áramlási cytometriával kimutassuk azokat (Koester et al., 1997). Mérhető továbbá a mitokondriumok polarizáltsága is.

Fixált szövetekben azonban ezek a módszerek egyelőre nehezen alkalmazhatók.

4. Kísérletek

4.1. A butirát által indukált sejthalál és differenciáció összefüggésben van a különböző ROS mintázatokkal HT29-eredetű humán vastagbélrák sejtekben

4.1.1. Bevezetés és célkitűzés az adenocarcinoma sejtvonalakkal végzett kísérletekhez

A humán eredetű colorectális adenocarcinoma differenciálatlan sejtjei jól modellezik a vastagbél daganatosan transzformált hámsejtjeinek tulajdonságait. Az általunk is használt szülői HT29 vonalból a tartós tenyésztés során további törzseket izoláltak: a HT29-12 és a HT29-21 metothrexátra és 5-fluorouracilra rezisztens szubklónokat (Lesuffleur et al., 1998). A HT29 vonalak különféle külső hatásra – például glükóz megvonás, butirát kezelés – differenciálódni képesek.

A butirát indukálta proliferációgátlás, sejtleválás és sejthalál területén végzett vizsgálataink során nekünk is sikerült egy stabil HT29 szubklónt izolálnunk, mely feltűnően különbözően viselkedett a szülői HT29 törzstől a butirát indukálta sejtdifferenciáció szempontjából, de igen érzékeny volt a butirát hatására kialakuló sejtleválásra és sejthalálra (Gálfí et al., 2002; Gálfí et al., 2005). Ezt a HT29R sejtvonalat modellként használtuk fel, hogy megvizsgáljuk a butirát hatására meginduló szabad gyök, illetve ROS termelést, összefüggésben a differenciációval és a sejthalállal. Számos tanulmány leírta már, hogy a daganatos sejtekben butirát, illetve más hiszton-deacetiláz inhibitorok által kiváltott sejthalál kapcsolatban van a ROS szint emelkedésével (Giardina és Inan, 1998; Ruefli et al., 2001; Rosato et al., 2003; Moreire et al., 2003; Ungerstedt et al., 2005). Mindazonáltal a ROS ezen folyamatokban betöltött szerepe máig tisztázatlan. A tenyésztett vastagbélhámsejtek millimoláris butirát koncentrációval való kezelése hiszton-acetilációt vált ki, ezáltal a génexpresszió megváltozása, a proliferáció gátlása, a sejtciklus leállása, valamint differenciáció és a sejthalál indukciója következik be (Csordás, 1995; Kruh et al., 1995; Burgess et al., 2004; Lindemann et al., 2004).

Kísérleteink célja az volt, hogy összefüggést találjunk a különböző redox paraméterek és a butirát által indukált differenciáció, sejtleválás, valamint sejthalál között azért, hogy összehasonlítsuk a differenciációra nem hajlamos, de erősen sejthalál-érzékeny HT29R sejtvonalat a differenciációra hajlamos és jóval kevésbé sejthalál-érzékeny HT29-12 és HT29-21 szubklónokkal. Ennek érdekében először meghatároztuk a butirát hatására kialakuló proliferációgátlást, differenciációt, sejtleválást és sejthalált a HT29R és HT29-21 sejteken. Meghatároztuk (i) a butirát koncentráció függvényében kialakuló intracelluláris szabad gyök szinteket ESR spektroszkópiával, (ii) a ROS kialakulást DCF (2,7-dichlorofluorescein-diacetate) oxidációval, (iii) a H₂O₂ termelést fenolvörös módszerrel, (iv) a GSH/GSSG arányt és (v) a redoxpotenciált. További célunk volt feltárni, hogy a differenciációra nem hajlamos HT29R sejtek jellemezhető-e redox tulajdonságaik alapján. Végül leírtuk, hogy HT29R sejteken miként alakul a butirát indukálta sejthalál az 1,5-dihidroxi-izokvinolin (DHQ), rezveratrol illetve ciklosporin-A (CsA) jelenlétében.

4.1.2. Anyag és módszer

4.1.2.1. Reagensek és törzsoldatok

Valamennyi vegyszert a Sigma-Aldrich (Darmstadt, Németország) cégtől szereztünk be, egyéb esetekben ezt külön jelzem. A 4,4 g nátrium-n-butirátot (BDH Chemicals Ltd, Poole, Anglia) 20 ml PBS-ben oldottuk, majd sterilre szűrtük, az így kapott törzsoldat koncentrációja 2M. A rezveratrolt (100 mM), az 1,5-dihidroxi-izokvinolint (31 mM) és a ciklosporin-A-t (100 µM) dimetil-szulfidban oldottuk majd -20°C-on tároltuk. Az Ellman-reagenst (5,5'-ditiobisz-2-nitrobenzoésav) (10 mM) 8,0-as pH-jú 0,1 M foszfát pufferben oldottuk.

4.1.2.2. Sejtvonalak és sejtenyésztés

A kísérletekben alkalmazott HT29-ből származó HT29R, HT29-12 és HT29-21 tenyészetek stabil sejtvonalak. A HT29 szülői sejtvonal tartós tenyésztése során Dr.

Gálfy Péter izolálta a HT29R vonalat, amely egy butirát-indukálta sejthalálra igen érzékeny, míg a butirát által előidézett differenciációval szemben ellenálló, stabil szubklón. A szülői HT29L sejtek Prof. Thékla Lesuffleur (Lille, Franciaország), a HT29-12 illetve a HT29-21 pedig Dr. Henno Hendriks (Utrecht, Hollandia) szíves ajándékként került laboratóriumunkba.

A sejteket DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) tápfolyadékban tenyésztettük 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú, párasított levegőjű tenyésztőkamrában. A tápfolyadékot a következő anyagokkal egészítettük ki: 1% MEM nem esszenciális aminosav oldat, 50 mg/L gentamicin-szulfát, 100 mg/L kanamycin-szulfát, 4 mM glutamin, 25 mM HEPES puffer, 1 mM nátrium-piruvát és 10% hővel inaktivált szarvasmarha magzati szérum (foetal bovine serum, FBS) (Invitrogen, Burlington, Kanada). A 24 órás tenyészetek megközelítőleg 20%-os fedettséget (szubkonfluens), a 72 órásk pedig 80%-os fedettséget (közel konfluens) mutatnak.

4.1.2.3. Sejtosztódás

A sejtosztódás mértékének meghatározásához az élő sejteket redukáló képességük alapján kimutató 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxifenil)-2-(4-szulfofenil)-2H-tetrazolium sót (MTS) alkalmaztunk. Az MTS-vizsgálatban a Promega cég „CellTiter AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” termékét használtuk az IC₅₀ érték meghatározásához. A 25 cm²-es tenyésztő edényekben (Corning Glass Works, New York, USA) exponenciális mértékben szaporodó 48-72 órás tenyészeteket tripszinezttük PBS-ben oldott 1%-os EDTA-val 10 percen keresztül, majd 96 lyukú tenyésztőlemezre (Corning Glass Works, New York, USA) vittük át úgy, hogy a 90 µl tápfolyadékban 5x10³ sejt/lyuk koncentrációt kapjunk. Ezután 10 µl különböző koncentrációjú butirát oldattal kezelve a lemezeket 72 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd 20 µl MTS reagenst adtunk a tápfolyadékhoz. Majd 2 órás 37°C-on történő inkubálást követően ELISA-leolvasóval meghatároztuk az abszorbancia mértékét 492 nm hullámhosszon. Kontrollként a nem kezelt tápfolyadékot, a sejtek nélküli tápfolyadékot, illetve a butiráttal azonos mennyiségű PBS-sel kezelt sejteket használtuk fel. Az IC₅₀ (50%-os gátló koncentráció) értékek kiszámítása regresszió-analízissel történt a dózis függvényében kapott abszorbancia adatok felhasználásával.

4.1.2.4. Sejtleválás

A vizsgálatokhoz a sejteket 25 cm²-es tenyésztőedényekben szaporítottuk. A különböző butirát koncentrációkkal való 48 órás kezelési idő elteltével a tenyésztőedény aljáról levált sejteket, illetve a letapadt, majd tripszinnel leemésztett sejteket tartalmazó tápfolyadékokat külön-külön centrifugáltuk 10 percig (200 g, 4°C) és PBS-ben mostuk, majd az üledéket 0,2 ml 0,25%-os nátrium-dezoxikolat oldatban vettük fel. A médiumban lévő fehérje meghatározására „DC protein Assay” tesztet alkalmaztunk (Bio-Rad, München, Németország). A tápfolyadékban lévő levált sejtek fehérjekoncentrációja összehasonlítva az összegyűjtött levált illetve a letapadt majd tripszinezett sejtek protein mennyiségével adja a levált sejtek százalékos arányát.

Szintén a 48 órás kezelési idő leteltével történt a Giemsa festés is, amelynek során a 96 lyukú lemezekről le nem vált, aljzatra letapadt sejteket fixáltuk 10 percig PBS-sel pufferolt formalinnal, majd 30 percig festettük vizes 10%-os Giemsa oldattal. A desztillált vizes öblítés és szárítás után a letapadt és festődött sejtek abszorbanciáját 630 nm hullámhosszon olvastuk le. A kezeletlen kontroll sejtek leválását tekintettük 0%-nak. Ehhez képest a növekvő butirát koncentrációval kezelt tenyészetek sejtleválását a kontrol százalékában adtuk meg.

4.1.2.4. Sejthalál vizsgálata

4.1.2.4.1. Propidium-jodid festett magok FACS analízise

A Nicoletti-féle módszer szerint (Nicoletti et al., 1991) propidium-jodiddal megfestett sejteket vetettük alá FACS analízisnek. Röviden összefoglalva, az apoptózis meghatározásához 1×10^6 számú sejtet centrifugáltunk (300g, 4°C, 7 perc), majd a felülúszó elöntésével nyert üledéket 750 µl frissen készített 2,5 µg/µl propidium-jodiddal festettük meg (50 µl 0,1% Triton X-100/0,1 % nátrium-citrát oldatban). Ezek után a sejtmagokat a propidium-jodid fluoreszcenciáját felhasználva a sejthalál meghatározása céljából FACScan készülékkel (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) vizsgáltuk.

4.1.2.4.2. Propidium-jodiddal illetve Hoechst 33285-tel festett magok mikroszkópos vizsgálata

A fedőlemezen tenyésztett sejteket 40 mM, illetve 20 mM butiráttal vagy anélkül tenyésztettük 24 órán keresztül. A felülúszó előntése után a sejteket 10 percig 2,5 µg/µl propidium-jodid és/vagy 2,5 µg/µl Hoechst 33258 festékekkel kezeltük, PBS-sel öblítettük majd 4%-os PBS-sel pufferolt formaldehid oldattal 30 percen keresztül fixáltuk. PBS-sel való öblítés után a mintákat AxioCam digitális kamerával (AxioCam HRc, Carl Zeiss AG, Jena, Németország) és színes szűrőkkel (Piros szűrő XF43, Omega Optical, Brattleboro, VT, USA; DAPI szűrő 487901, Carl Zeiss AG, Jena, Németország) kiegészített fluoreszcens mikroszkóppal (AxioPhot, Carl Zeiss AG, Jena, Németország) vizsgáltuk és fényképeztük.

4.1.2.4.3. Apoptózis meghatározása TUNEL próbával

A TUNEL próbához a „DEAD END Fluorometric TUNEL System” (Promega, Madison, WI, USA) terméket alkalmaztuk, mely az apoptózis során kialakuló DNS fragmentációt mutató sejtek jelzésére képes. A sejteket fedőlemezre vittük, majd 24 órán keresztül tenyésztettük őket. 10 mM butiráttal és/vagy más vizsgált anyaggal (100 µM DHQ, 100 µM rezveratrol vagy 0,5 µM CsA) való 48 órás inkubálás után a sejteket 4%-os formaldehidben fixáltuk 30 percen át, majd PBS-ben oldott 0,2% Triton X-100-zal permeabilizáltuk. Háromszori PBS öblítés után a festést a TUNEL-próbával kezdtük meg. A gyártó által készített kiegyenlítő pufferrel való 10 perces kezelés után a mintákat a nukleotid keveréket és a terminális transzferáz enzimet is tartalmazó kiegyenlítő pufferrel kezeltük és műanyag fedőlemezekkel borítva nedves kamrában 37°C-on 60 percig inkubáltuk, majd a reakciót leállítottuk a gyárilag biztosított 0,2 M Na-citrát és 1,5 M Na-klorid keverékével való 10 perces kezeléssel. Ennek eredményeként az apoptotikus sejtek DNS-e FITC-cel jelölődik, majd egy FITC specifikus ellenanyagot (MsX Fluorescein Alexa Fluor 488 Conjugate, Chemicon International, Temecula, Kanada) használtunk a fluoreszcencia intenzitásának

növelésére. Az ellenanyagot 30 percre adtuk a mintákhoz PBS/1% BSA-ban való hígításban. Háttérként valamennyi sejtet megfestettünk 4'-6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI). Az apoptózis láthatóvá tételére színes szűrőkkel kiegészített fluoreszcens mikroszkópot (Axiophot, Carl Zeiss AG, Jena, Németország) használtunk (FITC szűrő 487910 és DAPI szűrő 487901, Carl Zeiss AG, Jena, Németország).

4.1.2.4.4. Apoptózis és nekrozis meghatározása DAPI és tripánkék festékekkel

Az apoptózis meghatározása a DAPI festést követően a sejtmag morfológiai vizsgálatán, míg a nekrozis kimutatása a sejtek tripánkék felvételi tesztjén alapult (Qiao et al., 1998). A DAPI az élő és elpusztult sejtek membránján is képes átjutni, míg a hidrofíl tripánkék csak a már sérült membránon jut keresztül. Mind az apoptózis, mind a nekrozis kimutatását 24 órás sejtenyészetek 48 órán át tartó butiráttal való való kezelése után végeztük el. A kezelési idő leteltével a sejteket tripszinezttük, majd az így kapott sejtsuszpenziót a tápfolyadékkal együtt centrifugáltuk 10 percig (200 g, 4°C). A centrifugálást követően a felülúszó leöntésével nyert üledéket 0,2 ml jéghideg PBS-ben vettük fel és két részre osztottuk: 0,1 ml-t használtunk fel a tripánkék felvételi teszthez, a másik adagot pedig -20°C-os ecetsav/metanol (1:3) keverékében fixáltuk 20 percig. A 0,5 %-os tripánkék oldattal 10 percig szobahőmérsékleten történt a festés. Az apoptózis meghatározáshoz a fixált sejtsuszpenziót centrifugáltuk 10 percig (200 g, 4°C), majd a kapott üledéket ecetsav/metanol keverékében (-20°C) átmosva ismételt centrifugálás után üveg fedőlemezre osztottuk szét. Szárítást követően a sejteket PBS-ben oldott 1µg/ml DAPI oldattal megfestettük. Többszöri PBS-sel való mosás után a mintákat glicerin/PBS (3:1) keverékével lefedtük és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Az apoptózis morfológiai jegyeit mutató sejteket úgy határoztuk meg, hogy 500 véletlenszerűen kiválasztott sejtmagot megszámlolva meghatároztuk a magtöredezettséget mutató sejtek számát. A nekrozis meghatározására pedig 100 véletlenszerűen kiválasztott sejt közül számoltuk meg a tripánkéekkel festődő sejtek számát.

4.1.2.5. Sejtdifferenciáció

A sejtdifferenciáció indikátoraként az alkalikus-foszfátáz aktivitást vettük figyelembe (Carethers, 1998). A vizsgálatok során 24 órás sejttenyészeteket kezeltünk különböző butirát koncentrációkkal, majd a sejtek lizálása után meghatároztuk az alkalikus-foszfátáz aktivitást (mU/mg fehérjében kifejezve). A 48 órás kezelési időszak leteltével külön centrifugáltuk 10 percig (200 g, 4°C) a levált sejteket tartalmazó felülúszót, illetve a letapadt majd tripszinezett sejteket tartalmazó sejtuszpenziót. Az üledékeket PBS-ben mosva szobahőmérsékleten 30 percig 0,25%-os nátrium-dezoxikoláttal lizáltuk. Az enzimaktivitás meghatározására foszfát szubsztrátként p-nitrofenil-foszfátot alkalmazó ALP tesztet (Reanal, Budapest, Magyarország) használtunk. A lizált üledék 20 µl-jét adtuk a 0,5 ml p-nitrofenil-foszfát oldathoz. 37°C-os vízfürdőben történt 15 perces inkubáció után 5 ml 0,02 M nátrium-hidroxid oldattal leállítottuk a reakciót, és így 405 nm hullámhosszon mérhetővé vált az oldat extinkciója.

4.1.2.6. Szabad gyökök és reaktív oxigén vegyületek meghatározása

4.1.2.6.1. Szabad gyök meghatározás ESR spektroszkópiával

A sejttenyészeteket 72 órán keresztül 25 cm^2 tenyésztőedényekben növesztettük, majd 48 órás nátrium-butirát kezelésnek vetettük alá. A kontroll és a kezelt sejtek szuszpenzióját egyaránt folyékony nitrogénben tároltuk a szabad gyök illetve a GSH/GSSG meghatározásig. A szabad gyökök koncentrációjának mérése egy X-sávós ESR spektrométerrel történt a MTA Kémiai Kutatóintézetében (Magnettech GmbH, Berlin, Németország) egy korábban leírt módszer szerint (Shulyakowskaya et al., 1993).

4.1.2.6.2. Reaktív oxigén vegyületek mérése

A reaktív oxigén vegyületek méréséhez a sejteket 100 mm átmérőjű petricsészékben növesztettük 24 óráig, majd az adott butirát koncentrációval kezeltük

48 órán keresztül. Ezután a tápfolyadékhoz diklorofluoresceint (DCF) adtunk. A fluoreszcens próbához a még nem fluoreszkáló 2,7-diklorofluorescein-diacetátot 20 mM koncentrációban etanolban oldottuk, majd kétszeres mennyiségű 0,01M NaOH hozzáadásával 20 percen át hidrolizáltuk. Az így kapott DCF-et steril PBS-ben 20 μ M koncentrációra hígítva 1 ml-t adtunk minden egyes edényhez. A 30 perces inkubáció leteltével a felülúszót eltávolítottuk a további fluoreszcenciás mérésekhez. A reaktív oxigén vegyületek képesek átalakítani a DCF-et annak egy fluoreszcens származékává, melynek 502 nm hullámhosszon való gerjesztését követően 523 nm-en mérhető a fluoreszcenciája. A visszamaradt sejtekből összfehérje koncentráció meghatározást végeztünk DC fehérje teszttel.

4.1.2.6.3. H₂O₂ termelődésének meghatározása

A H₂O₂ termelés kimutatása kisebb módosításokkal Baud módszere szerint történt (Baud et al., 1986). A sejteket 37°C-on 30 percig inkubáltuk a 0,29 mM fenolvörös nátrium-sóját valamint 5 egység/ml mieloperoxidázt (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Németország) tartalmazó 1 ml PBS oldatban. A felülúszó összegyűjtése után 3 M NaOH hozzáadásával annak pH értékét 12,5-re állítottuk be, majd 610 nm hullámhosszon leolvastuk az oldat abszorbanciáját.

4.1.2.7. A GSH/GSSG arány mérése valamint a redoxpotenciál számítása

A redukált glutation meghatározása a lúgos környezetben (10 mM Tris/HCl, pH 8,9) szulfhidril-csoportokkal reakcióba lépő Ellman-reagenssel történt, amely egy 412 nm hullámhosszon maximális abszorbanciával rendelkező vízdékony komplexet alakít ki a glutationnal. (Sedlak és Lindsay, 1968). A redukált glutation meghatározása előtt TCA-val kicsapattuk az oldat fehérje tartalmát. A GSSG koncentrációjának meghatározásához először a GSH mennyiségét mértük, majd feleslegben glutation-reduktázt és NADPH-t adtunk hozzá, amelyek segítségével az oxidált szulfhidril csoportok redukálódnak (Kosower et al., 1969). Az összes GSH koncentrációt a második alkalommal mértük, ahol az összes és a korábban mért GSH mennyiségének

különbségét tekintettük a GSSG koncentrációjának. A GSH/GSSG arányhoz tartozó redoxpotenciál kiszámításához a Nernst egyenletet használtuk a Kirlin et al. (1999) által leírtak szerint: $E_h = E_0 + RT/nF \cdot \ln[GSSG]/[GSH][GSH]$, ahol az E_0 az intracelluláris pH-hoz igazított standard potenciál, az R a moláris gázállandó (Planck-állandó), a T az abszolút hőmérséklet, az n az átadott elektronok száma (jelen esetben 2), az F a Faraday-állandó. A standard potenciál értéke pH=7,0 esetén -240 mV, így a redox potenciál értékét elsősorban az oxidált és redukált glutation koncentrációja határozta meg.

4.1.2.8. Statisztikai számítások

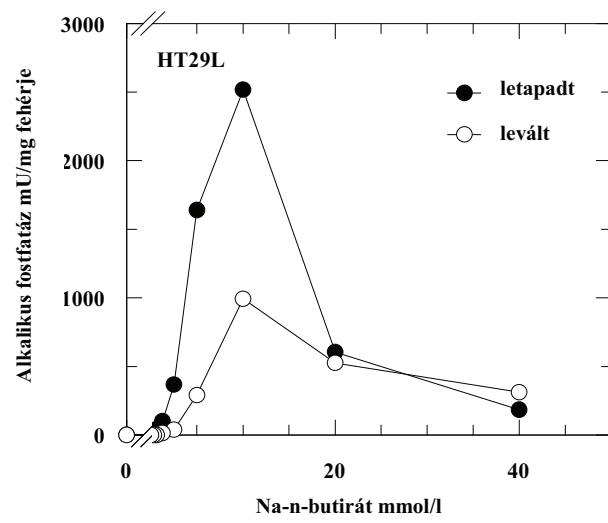
Valamennyi sejtkeszlet három párhuzamos mintán folytattunk le. Elvégeztük a varianciánálizist, meghatároztuk a korrelációs együtthatókat, illetve a Student-féle t-próbát használtuk a szignifikáns eltérések meghatározásához. A statisztikai vizsgálatokhoz MNITAB (Minitab Inc, State College, PA, USA) programot használtunk. Az eredményeket átlag \pm SEM alapján ábráztuk, a különbségeket pedig $p < 0,05$ szinten tekintettük szignifikánsnak.

4.1.3. Eredmények

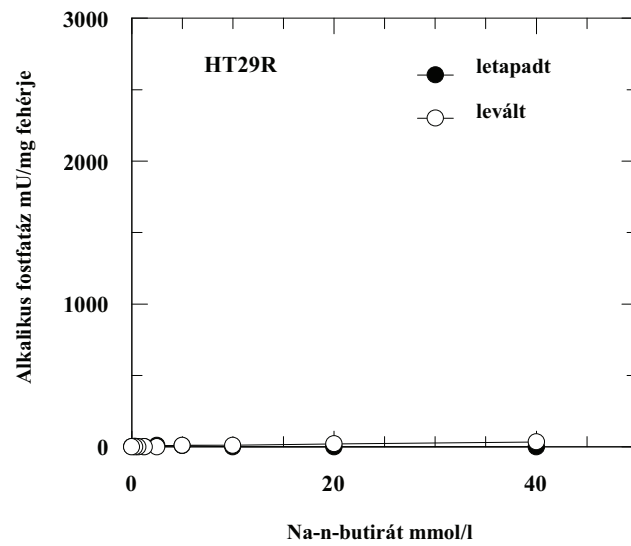
4.1.3.1. A butirát által kiváltott sejt differenciáció a letapadt és levált sejtekben

A vastagbélhámsejtekben lezajló differenciáció egyik legfontosabb markere az alkalikus-foszfataz aktivitás. Az enzim aktivitását megvizsgáltuk a szülői HT29L, a differenciációra kevésbé hajlamos HT29R és a differenciációra érzékeny HT29-21 sejtvonalon, mind a letapadt, mind a levált sejtekben külön-külön is. Az alkalikus-foszfataz aktivitás mindkét differenciációra hajlamos sejtvonal, a HT29L és a HT29-21, esetében is szoros koncentrációfüggést mutatott a kezeléshez alkalmazott butirát mennyiségével az 1-10 mM közötti tartományban (9. ábra). Érthető módon a letapadt sejtekben nagyobb aktivitást mértünk, hiszen az alaptól levált sejtek már károsodtak, sok esetben el is pusztultak. Azaz minél inkább sértetlenek a sejtek, annál nagyobb

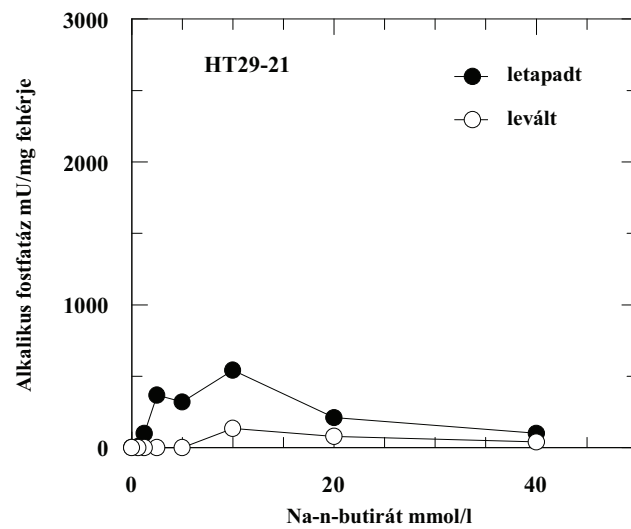
enzimaktivitást várhatunk. A különböző sejtvonalak különböző alkalikus foszfatáz aktivitásának háttérében a sejtvonalak különböző differenciáltsági állapota áll.



A



B

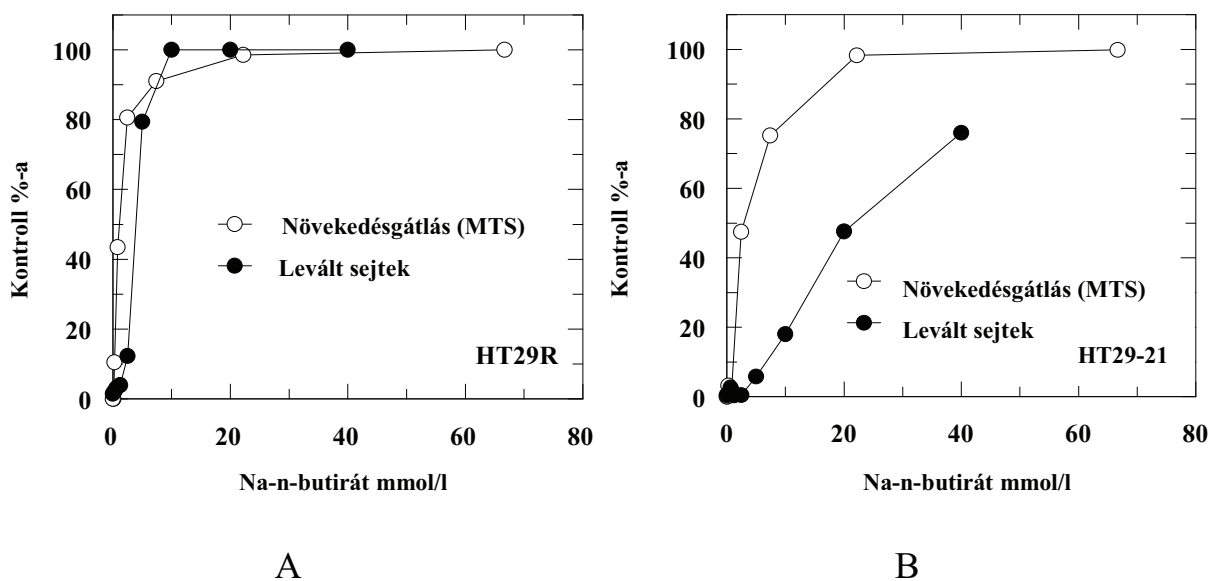


C

9. ábra: Butirát koncentráció függvényében kialakult alkalikus-foszfataz aktivitás a letapadt és levált HT29L (A), HT29R (B) és HT29-21 (C) sejteken. A sejteket 25 cm^2 -es tenyésztőedényekben tenyésztettük 24 órán keresztül, majd 48 órás különböző koncentrációval való butirát kezelés után tripszinezttük és meghatároztuk az alkalikus-foszfataz aktivitást. Az enzimaktivitást a letapadt és a levált sejtek mg fehérje tartalmára vonatkoztatva adtuk meg. A letapadt sejtek aktivitása „●” jellel, a levált sejteké pedig „○” jellel ábrázolva.

4.1.3.2. Butirát által előidézett proliferációgátlás és sejtleválás

A következőkben összehasonlítottuk a butirát koncentráció függvényében előidézett proliferációgátlást és sejtleválást HT29R („A”) és HT29-21 („B”) sejteken. A 10. ábra „A” képen jól látható, hogy a HT29R sejtek fokozottan érzékenyek a butirát által előidézett növekedésgátlásra és sejtleválásra egyaránt. A proliferációgátlás meghatározására alkalmas MTS teszt eredményei alapján a butirát 50%-os gátló koncentrációjának értéke $1,42 \pm 0,33\text{ mmol/l}$. A sejtleválás mértékét a tenyésztőedény aljzatára letapadt sejtek Giemsa festésével mutattuk ki, amelynek alapján a butirát IC_{50} értéke $4,72 \pm 1,96\text{ mmol/l}$ volt. Bár a HT29-21 sejtek érzékenysége a butirát által indukált növekedésgátlásra az MTS-teszt alapján alacsonyabb, az $IC_{50}=2,64 \pm 0,59\text{ mmol/l}$ -nak adódott, de nagyságrendjét tekintve HT29R sejtekéhez hasonló volt. Ugyanakkor, ha a Giemsa-festés eredményeit tekintjük, akkor nyilvánvaló, hogy a HT29-21 sejtek sokkal ellenállóbbak voltak a butirát hatására kialakuló sejtleválással szemben, hiszen az IC_{50} értéke $23,40 \pm 5,23\text{ mmol/l}$ volt. Alacsony, 10 mM butirát koncentráció esetén például az MTS-teszt 70-80%-os proliferációgátlást és mindössze 10-20%-os leválást mutatott ki HT29-21 sejtek esetében. A sejtpusztulást jelző csökkent redukáló képesség, illetve a sejtleválás tehát nem párhuzamosan zajlik. Meg kell azonban jegyezni, hogy mindkét sejtvonal esetében alacsonyabb butirát koncentráció is elegendő volt a proliferációgátláshoz, mint a sejtleválás kiváltásához, ami azt valószínűsíti, hogy a növekedésgátlás megelőzi a leválást, és a két folyamat egymástól eltérő mértékben megy végbe.



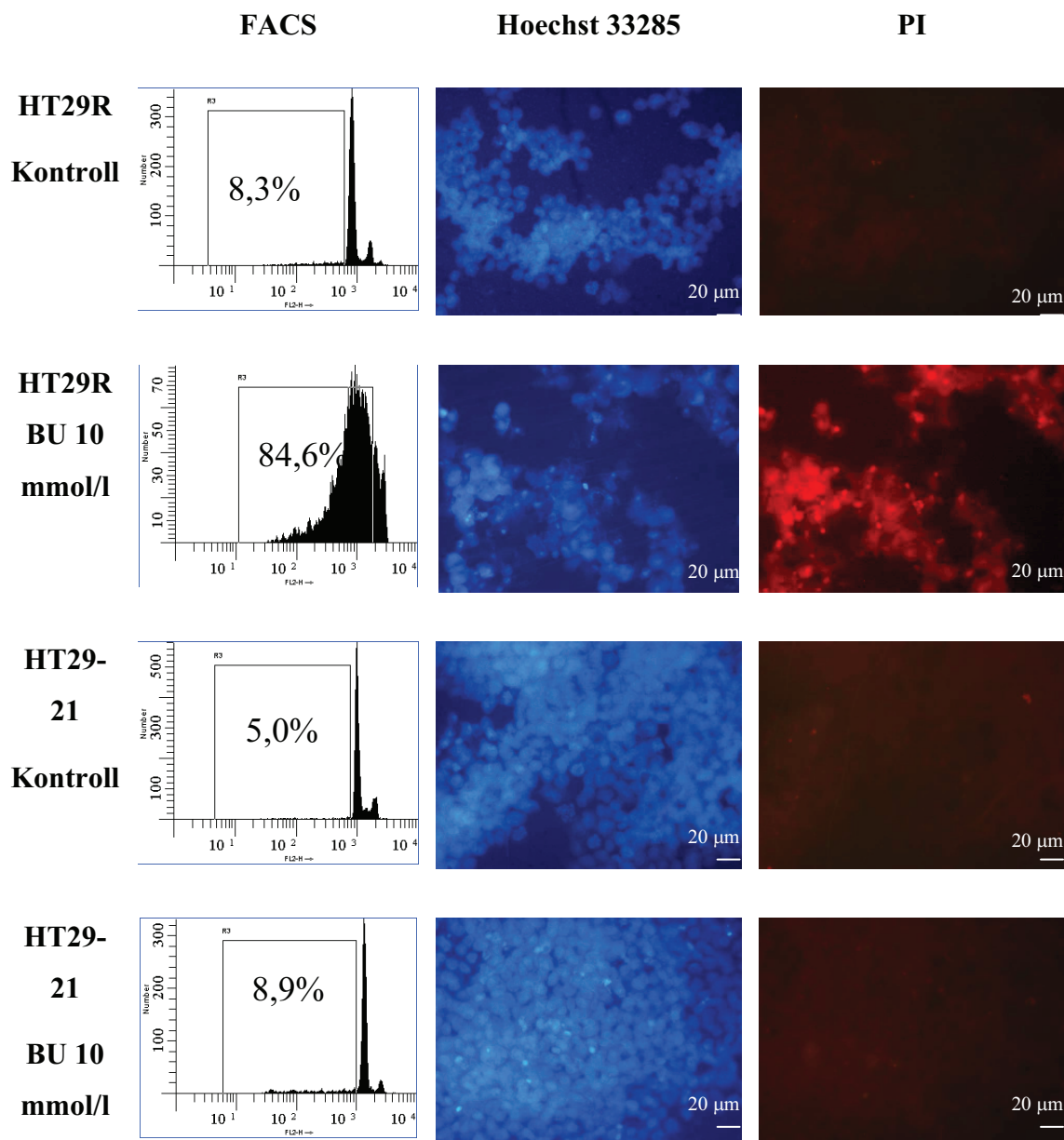
10. ábra: A butirát koncentráció függvényében előidézett proliferációgátlás MTS teszttel meghatározva, valamint a sejtleválás Giemsa-festéssel kimutatva HT29R (A) és HT29-21 (B) sejteken. A levált sejtek „●” jellel jelezve, az MTS-teszttel vizsgált sejtek pedig „○” jellel a kezeletlen kontroll %-ában kifejezve.

4.1.3.3. A butirát által kiváltott sejthalál HT29R és HT29-21 sejteken

A következő lépésben megvizsgáltuk a HT29R és HT29-21 sejtek érzékenységét a butirát által kiváltott sejthalállal szemben, valamint felmértük az így kialakuló sejthalál típusát is. Elsőként Nicoletti et al. (1991) módszere szerint elvégeztük a propidium-jodiddal festett sejtmagok FACS analízisét. A vizsgálat során a sub-G1 fázisban lévő sejtek arányát határoztuk meg, amely a diploid kromatin mennyiségénél kevesebb DNS-t tartalmazó elpusztult sejtekre jellemző. Mivel azonban az apoptózisra a szabályos fragmentálódás, a végső állapotú nekrozisra pedig a DNS szabálytalan szétválasztása jellemző, ezért ezzel a módszerrel nem tudunk különbséget tenni az egyes sejthalál típusok között. A 48 órás tenyészetek 24 órás 10 mM butirát kezelését követően a HT29R sejtek 84,6%-a volt a sub-G1 fázisban, míg ugyanez a HT29-21 sejtek esetében csak 8,9%-nak adódott (11. ábra „FACS” oszlopában). Ezek az értékek a kezeletlen kontroll mintákban a HT29R sejteknél 8,3%-nak, a HT29-21 sejteknél

pedig 5%-nak adódtak. Az eredmények szerint tehát a butirát által előidézett differenciációnak ellenálló HT29R sejtek erősen érzékenyek a butirát indukálta sejthalálra, míg hasonló körülmények között a HT29-21 sejtek annak gyakorlatilag ellenállnak.

A 11. ábra a középső és jobb oldali oszlopaiban a Hoechst 33285 festékkel, illetve a propidium-jodiddal festett sejtek mikroszkópos képeit hasonlítottuk össze. A lipofil Hoechst 33285 festék képes az ép plazmamembránon is áthatolni, így kékre festi az élő és elpusztult sejtek magját is. A hidrofil propidium-jodid viszont kizárólag a már sérült membránon képes átjutni, tehát csak a már késői apoptózisban/nekrózisban lévő sejteket festi pirosra. A 11. ábrán látható kettős Hoechst 33285 és propidium-jodid festéseket 48 órás tenyészetek 48 órás 10 mM butirát kezelését követően végeztük el. Látható, hogy míg a butiráttal kezelt HT29R sejteken kiterjedt volt a propidium-jodid pozitivitás, addig ez a HT29-21 sejteknél közel a kontroll szintjén maradt. Eredményeinkből az következik, hogy a HT29R sejtek leválásra való fokozott érzékenysége a sejthalállal szembeni nagyobb érzékenységgel párosul. A két sejtvonal összehasonlítása azt sugallja, – hogy miként a HT29R esetében, fordított arányosság áll fenn a sejthalál és a differenciáció között, vagyis a butirát által kiváltott differenciáció hiánya a butirát által indukált fokozott sejthalállal szembeni érzékenységgel párosul –, ennek értelmében tehát a differenciációra érzékeny HT29-21 sejtek tulajdonképpen rezisztensek a butirát kiváltotta sejthalállal szemben.



11. ábra: A butirát hatására kialakuló sejthalál HT29R és HT29-21 sejteken FACS analízissel és fluoreszcens mikroszkóppal. A bal oldali oszlop diagramjai a Nicoletti módszere szerint végzett propidium-jodid festett sejtmagok FACS analízisének eredményeit mutatják 48 órás 10 mM butiráttal való kezelést követően. A kezelt tenyészetek levált és letapadt sejtjeit együtt vizsgáltuk. Az ábrán feltüntetett százalékos értékek a sub-G1 csúcsokat jelzik. A Hoechst 33285 festék (középső oszlop) képes a plazmamembránon átjutva megfesteni valamennyi sejtmagot, míg a propidium-jodid (jobb oldali oszlop) kizárólag a már sérült membránon képes átjutni, tehát csak a már késői apoptózisban/nekrózisban lévő sejteket festi.

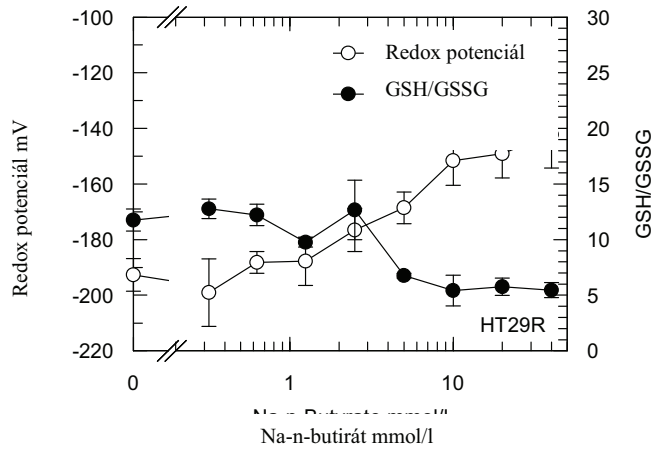
4.1.3.4. A butirát hatására szelektíven kialakuló különböző redox tulajdonságok vizsgálata HT29R, HT29-12 és HT29-21 sejteken

A következőkben azt szeretnénk volna feltárni, hogy az eddig vizsgált, butirát által kiváltott hatások összefüggésben állnak-e a sejtekre jellemző redox állapot változásaival. Ennek érdekében számos redox paramétert mértünk fel a HT29R, HT29-21 és a HT29-12 tenyészeteken. Elsőként a sejtek egyik legfontosabb antioxidáns markereként ismert GSH/GSSG arányt, és az ebből számolható redoxpotenciál értékét határoztuk meg. A 12. ábrán ábrázoltuk a butirát koncentráció függvényében kialakuló GSH/GSSG arányt, valamint a redoxpotenciál értékeket. A HT29-12 és a HT29-21 sejtek esetében a GSH/GSSG arányban csupán nem szignifikáns mértékű változásokat tapasztaltunk, annak értéke megközelítőleg azonos szinten maradt a teljes koncentrációtartományban. A HT29R vonal esetében azonban egy butirát koncentrációfüggő GSH/GSSG csökkenést tapasztaltunk. Hasonló eredményeket kaptunk a redoxpotenciál értékében is, ahol a HT29R sejtek esetében a 2-3 mM butirát koncentrációnál szignifikáns visszaesés történt.

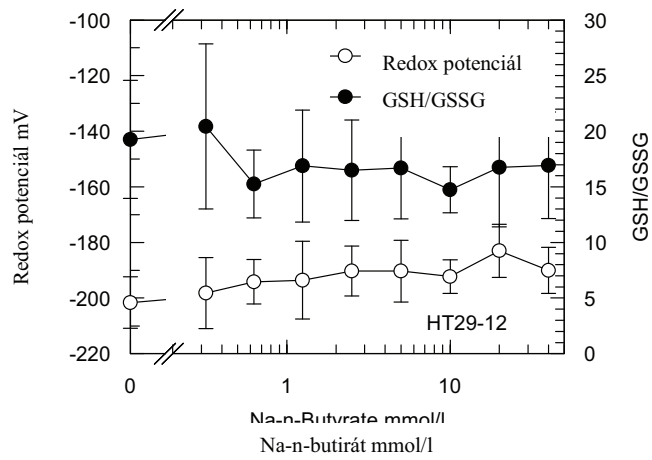
A 13. ábra a butirát koncentráció függvényében kialakuló ESR spektroszkóppal meghatározott, intracelluláris szabad gyök szintet ábrázolja mg sejtfehérje mennyiségre vonatkoztatva. Határozott különbség mutatkozik a butirát hatására kialakuló szabad gyök koncentráció mértékében, ha összehasonlítjuk a differenciációra nem hajlamos HT29R sejteket a két differenciációra hajlamos sejt vonallal. A butirát koncentráció függvényében jelentős mértékű szabad gyök szintnövekedés volt tapasztalható a HT29R sejteken, míg a HT29-12 és HT29-21 vonalakon egyáltalán nem mértünk szabad gyök szintváltozást a teljes vizsgált butirát koncentráció tartományában.

Az 14. ábrán a DCF-teszttel meghatározott extracelluláris ROS/RNOS koncentrációt adtuk meg. A módszer beállításánál kataláz-próbával ellenőriztük, hogy a teszt alkalmas-e az egyik legjelentősebb reaktív oxigén vegyület a H_2O_2 kimutatására is. A próba során azt vizsgáltuk, hogy a hidrogén-peroxidot bontó kataláz enzim hozzáadásának hatására miként változik a DCF jelintenzitás. Miután nem tapasztaltunk fluoreszcencia csökkenést, ebből arra következtettünk, hogy a teszt segítségével a H_2O_2 nem mutatható ki. A korábbi eredményekhez hasonlóan itt is jelentős mértékben

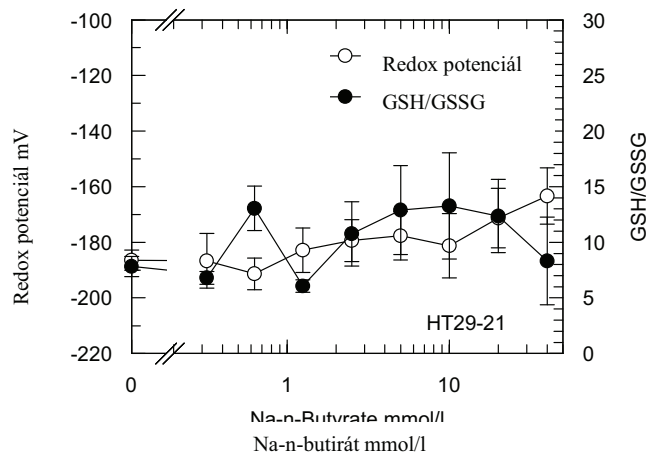
különböző értékeket kaptunk az eltérően viselkedő sejtvonalaknál. HT29R sejteken a butirát koncentráció függvényében jelentős mértékű ROS/RNOS képződés indult meg, míg a HT29-12 és a HT29-21 sejtek esetében csak minimális emelkedést tapasztaltunk.



A

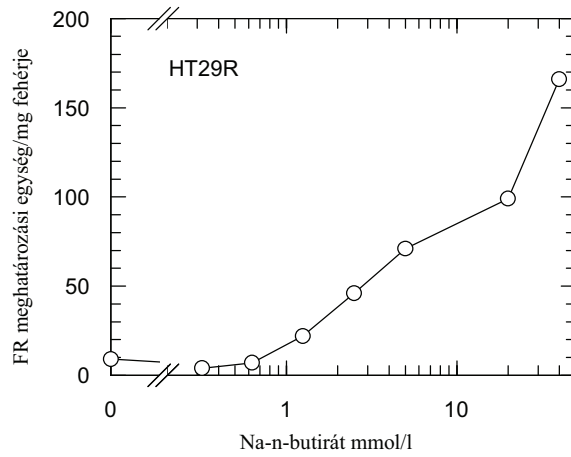


B

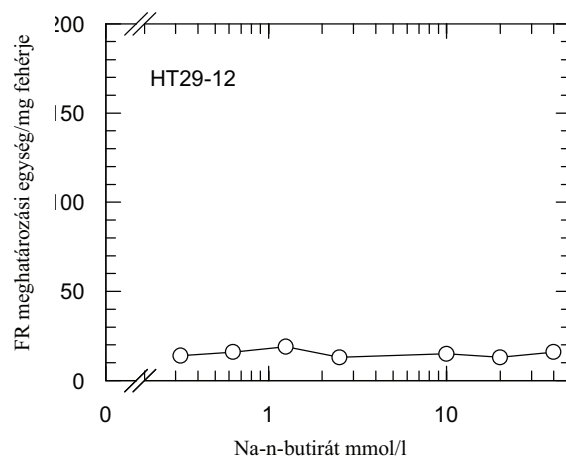


C

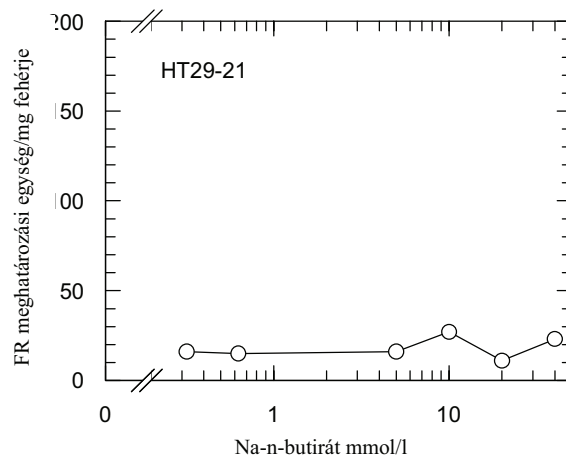
12. ábra: A GSH/GSSG arány, valamint a redox potenciál értékének változása a butirátkoncentráció függvényében HT29R („A”), HT29-12 („B”) és HT29-21 („C”) sejteken. A redox potenciál értékeit „●” jellel, a GSH/GSSG arány eredményeit pedig „○” jellel ábrázoltuk. Valamennyi meghatározást az adott butirátkoncentrációval való 48 órás kezelés után végeztük.



A

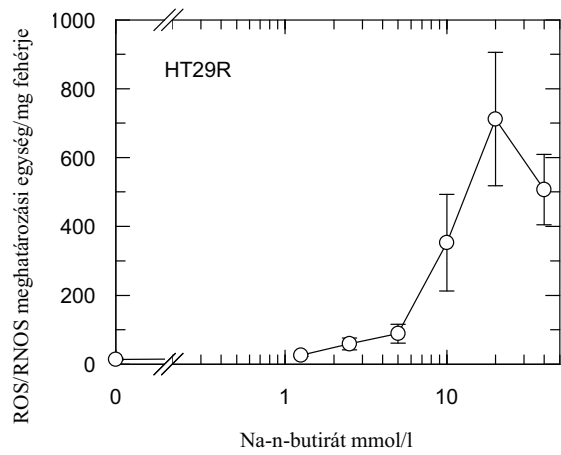


B

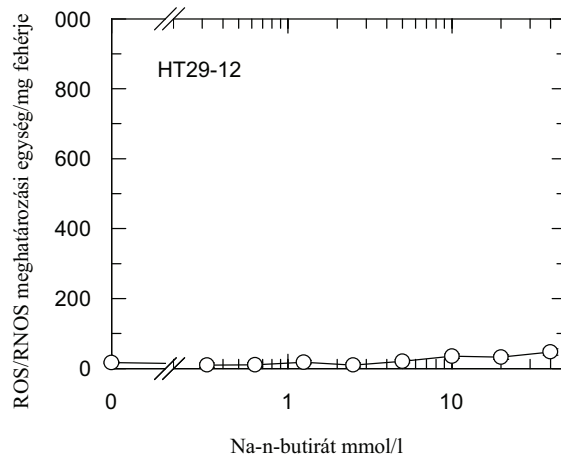


C

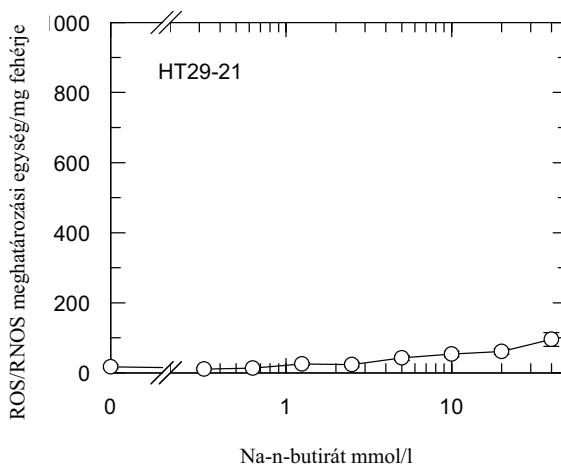
13. ábra: A szabad gyök koncentráció értékének alakulása a butirát koncentráció függvényében HT29R („A”), HT29-12 („B”) és HT29-21 („C”) sejteken. Valamennyi meghatározást az adott butirát koncentrációval való 48 órás kezelés után végeztük.



A

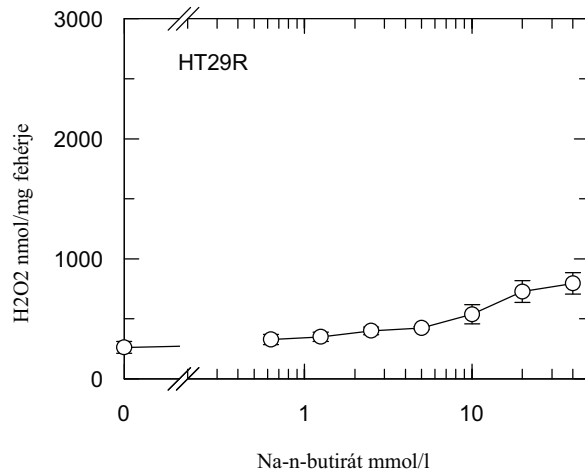


B

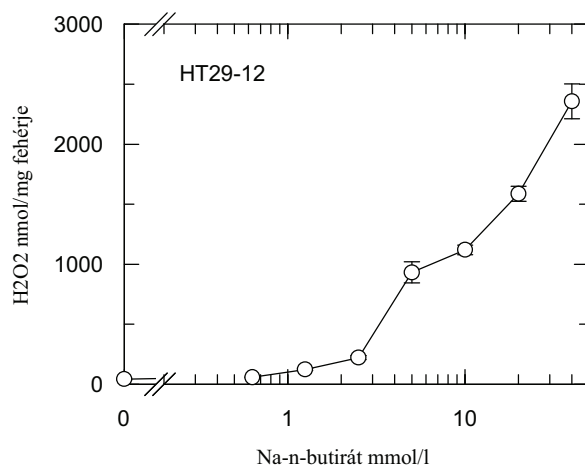


C

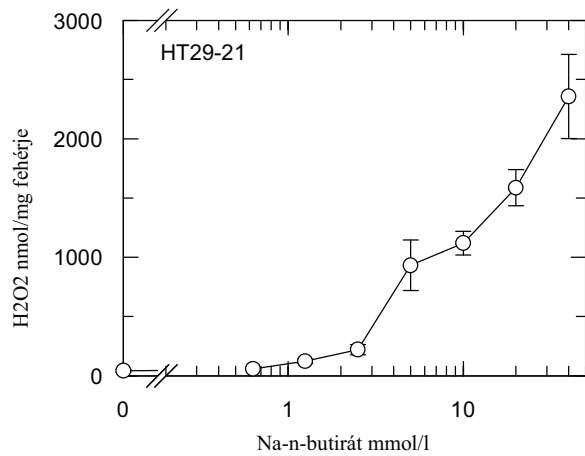
14. ábra: A ROS/RNOS produkció mértékének változása a butirát koncentráció függvényében HT29R („A”), HT29-12 („B”) és HT29-21 („C”) sejteken. Valamennyi meghatározást az adott butirát koncentrációval való 48 órás kezelés után végeztük.



A



B



C

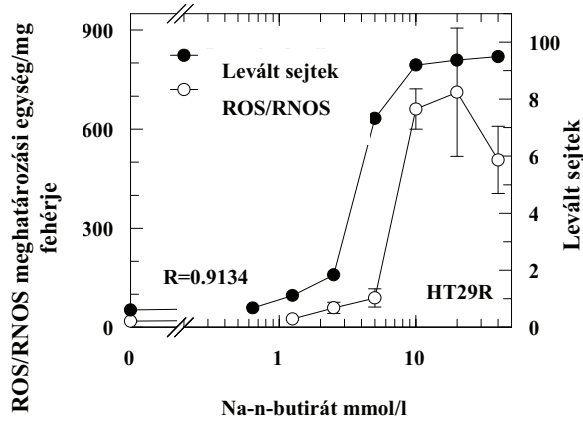
15. ábra: A H₂O₂ termelés változása a butirát koncentráció függvényében HT29R („A”), HT29-12 („B”) és HT29-21 („C”) sejteken. Valamennyi meghatározást az adott butirát koncentrációval való 48 órás kezelés után végeztük.

Ezután fenolvörös-tesztel meghatároztuk a butirát hatására kialakuló H_2O_2 képződést. A módszert ismét kataláz próbával ellenőrizve kimutattuk, hogy az valóban alkalmas a hidrogén-peroxid meghatározására. A 15. ábrán látszik, hogy jelentős különbség volt tapasztalható a butirát hatására kialakuló H_2O_2 képződés mértékében a HT29R és a két differenciációra érzékeny HT29-12 és a HT29-21 sejtvonal között. Egy, a 2 mM butirát koncentrációtól kezdődő, jelentős mértékű koncentrációfüggő H_2O_2 képződés volt mérhető a HT29-12 és HT29-21 sejteken, ugyanakkor nem volt statisztikailag értékelhető változás a H_2O_2 szintjében a HT29R sejteken a teljes butirát koncentráció tartományt tekintve.

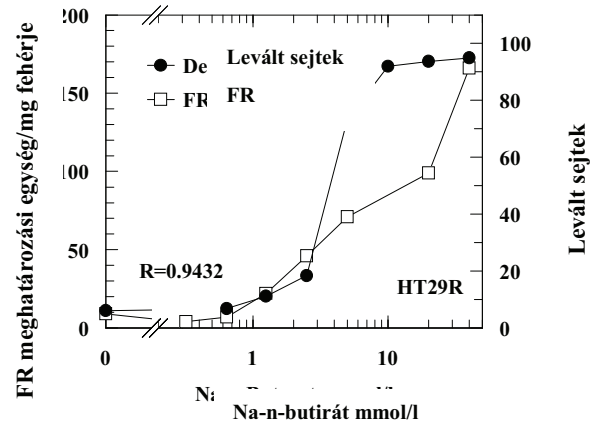
4.1.3.5. ROS indukció és sejtleválás

Az előzőekben kapott eredmények felvetik a kérdést, hogy vajon a butirát hatására kialakuló szabad gyök és/vagy ROS/RNOS képződés kapcsolatba hozható-e a sejtleválással. Ennek feltárása érdekében a 16. ábrán együtt ábrázoltuk a HT29R és HT29-21 sejteken butirát koncentráció függvényében kialakuló ROS/RNOS illetve szabad gyök koncentrációkat a butirát hatására kialakuló sejtleválás mértékével.

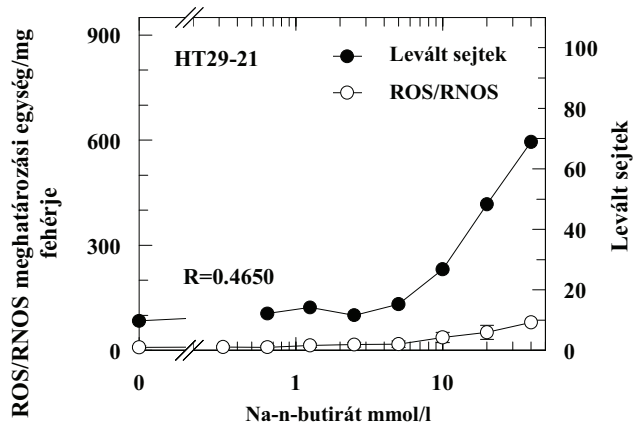
A HT29-21 sejtvonalból származó sejteknél érdemi ROS/RNOS és szabad gyök termelődés nélkül megy végbe a sejtleválás („C” és „D”). Mindez egyértelműen azt mutatja, hogy nincs kapcsolat a ROS/RNOS és a szabad gyök termelődés, valamint a sejtleválás mértéke között. A HT29R sejteken a butirát koncentráció függvényében kialakuló sejtleválás, valamint a ROS/RNOS termelés hasonló mintázatot mutat ugyan („A”), a leválás azonban már alacsonyabb butirát koncentrációnál megkezdődik, mint a ROS/RNOS termelés. A szabad gyök képződés és a sejtleválás viszont azonos butirát koncentrációnál indul meg, a korrelációt itt tehát nem lehet kizárni. A korábban bemutatott 15. ábráról leolvasható, hogy a HT29-12 és HT29-21 sejtvonalakkal ellentétben a HT29R esetében a butirát hatására nem képződik H_2O_2 . Összegezve tehát kijelenthető, hogy a butirát hatására kialakuló ROS/RNOS és/vagy H_2O_2 képződés nem mutat egyértelmű összefüggést a HT29R sejtek fokozott érzékenységevel a butirát hatására kialakuló sejtleválással illetve a sejthalállal szemben.



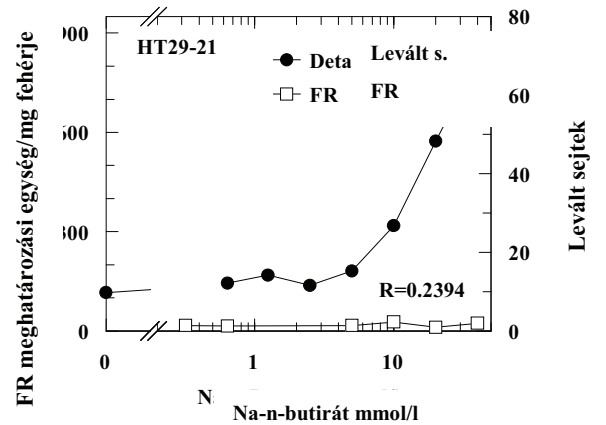
A



B



C



D

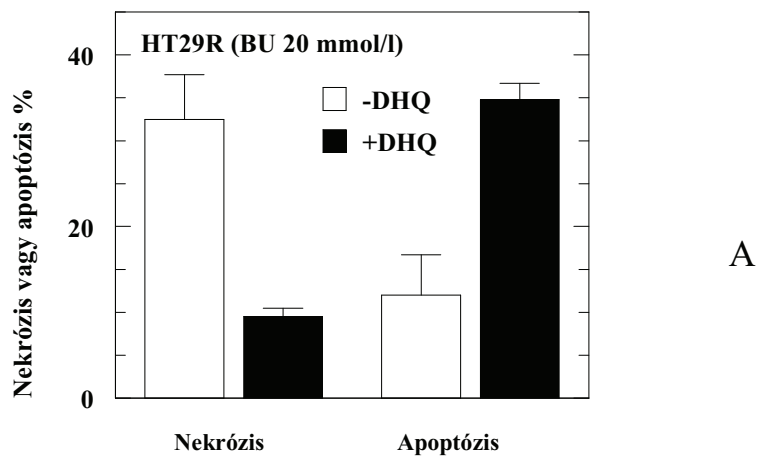
16. ábra: A butirát koncentráció függvényében kialakuló ROS/RNOS („A” és „C”) illetve szabad gyök (FR) képződés („B” és „D”), valamint a sejtleválás mértékének alakulása HT29R és HT29-21 sejteken. A 24 órás sejtenyészeteket további 24 órán át kezeltük az adott butirát koncentrációval. Levált sejteket „●” jellel, a ROS/RNOS értékeket „○” jellel, a szabad gyök (FR) koncentrációkat pedig „□” jellel ábrázoltuk. (R=korrelációs együttható, a változók szignifikánsan eltérnek 0-tól 95%-os szinten)

4.1.3.6. *A dihidrokinon, rezveratrol és ciklosporin-A hatása a butirát által kiváltott sejthalálra*

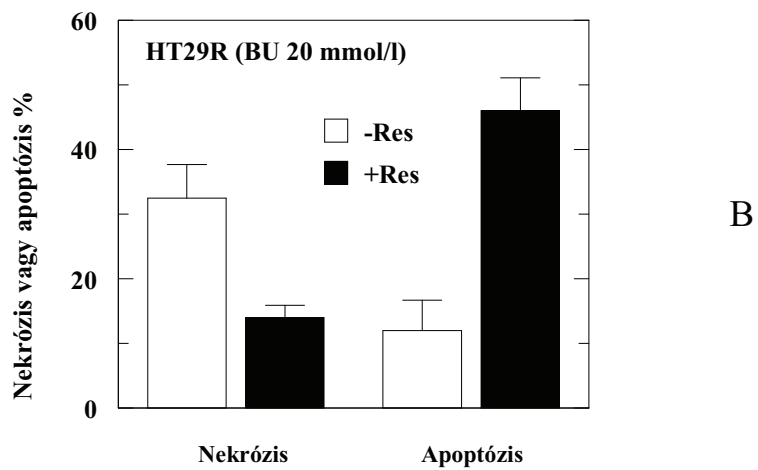
További vizsgálataink során felmértük a HT29R sejteken a butirát hatására kialakuló sejthalált különböző vegyületek jelenlétében. Felvetettük a kérdést, hogy miként alakul az apoptózis és/vagy a nekrozis mértéke dihidroizokvinolin (DHQ), rezveratrol, valamint ciklosporin-A (CsA) alkalmazásakor. A DHQ a poli-ADP-ribóz-polimeráz gátlójaként, a rezveratrol antioxidáns tulajdonságú polifenolos fitostilbénként, míg a CsA a mitokondriális membrán „transition pore” nyitását gátlójaként képes befolyásolni a sejthalált. A 17. ábrán összehasonlítjuk, hogy miként alakul a sejthalál a HT29R sejteken csak butirát valamint butirát és DHQ, butirát és rezveratrol, illetve butirát és CsA jelenlétében. Az „A” ábrán jól látszik, hogy a HT29R sejteken 20 mM butirát hatására főként nekrozis alakul ki. Ugyanakkor mindhárom vizsgált vegyület, a DHQ, a rezveratrol vagy a CsA jelenléte esetén a sejthalál típusa túlnyomóan apoptotikussá válik. Mivel a poli-ADP-ribóz-polimeráz kimeríti a sejt ATP készletét, kézenfekvő, hogy az enzim gátlásával a nekrozis helyett az ATP-függő, energiaigényes apoptózis kerül előtérbe (Zamareva et al., 2005). Érthető tehát, hogy a PARP-gátló DHQ jelenlétében a sejtek túlnyomó többsége apoptózison megy keresztül. Hasonló hatást mutat a rezveratrol is, amelynek már számos jellemzőjét leírták, a sejtek apoptózis irányába való elmozdításának hátterében valószínűleg antioxidáns gyökfogó tulajdonságai állnak. Meg kell azonban jegyezni, hogy a kémiai szerkezete alapján a DHQ is képes antioxidánsként funkcionálni, ami alapja lehet a két vegyület hasonló hatásmechanizmusának.

A „transition pore” nyitását gátló CsA is hasonlóan hat, mint a DHQ vagy a rezveratrol, vagyis jelenlétében a butirát okozta sejthalál főként apoptózisban nyilvánul meg. A CsA ilyen hatásának hátterében az a tulajdonsága áll, hogy képes gátolni a mitokondriális membrán „transition pore” kinyílását, ezáltal a mitokondrium depolarizálódását. Így, a „transition pore” gátlásával, a CsA képes a mitokondrium gyors összeomlását megakadályozni, ezáltal késlelteti az ATP-készlet kimerülését, vagyis lehetőséget teremt az apoptózis lezajlására. Összességében elmondható, hogy az ATP-elfogyásának megakadályozása jelenti a közös nevezőt a sejthalál apoptotikus útja felé. A DHQ ezt a PARP enzim gátlásával éri el, a rezveratrol szabad gyök fogó

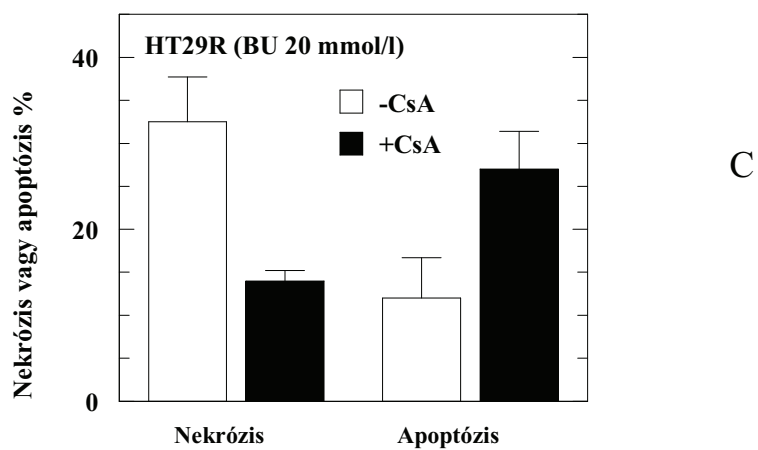
antioxidáns tulajdonságával védi a mitokondriumot, a CsA pedig a „transition pore” nyitásának gátlásával teszi ugyanezt.



A



B

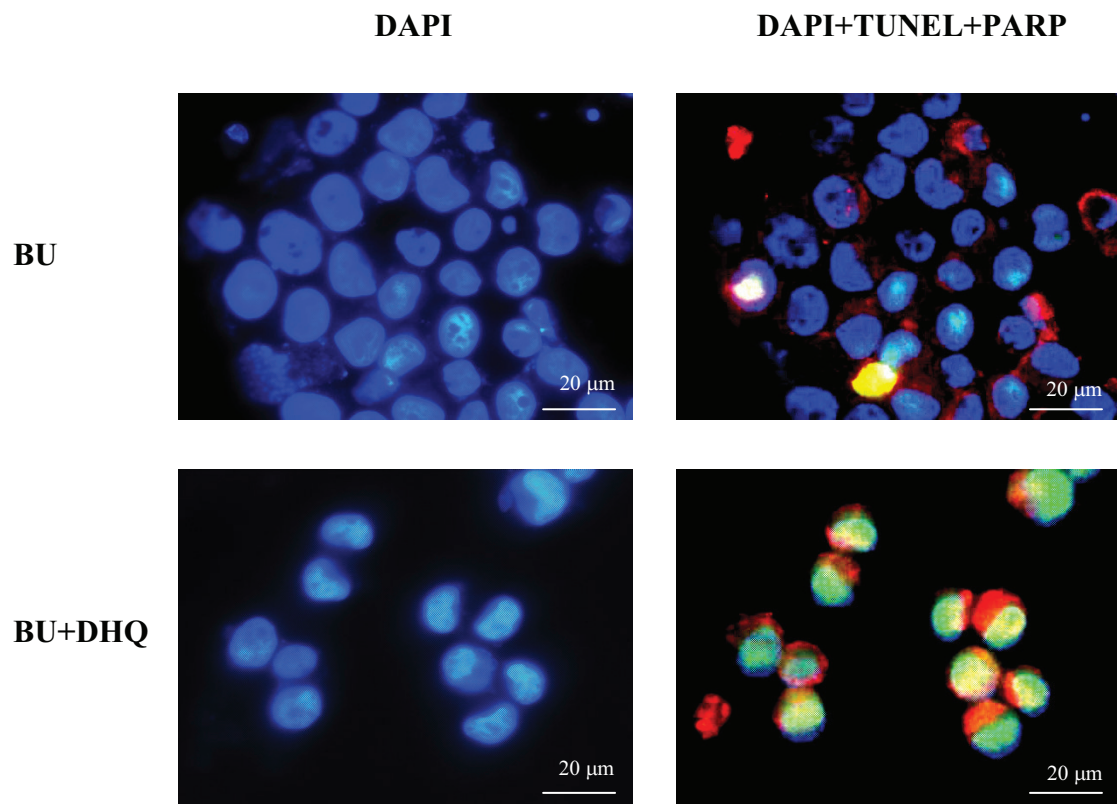


C

17. ábra: A DHQ, a rezveratrol illetve a CsA hatása a butirát által kiváltott sejthalálra HT29R sejteken. A sejthalál mikroszkóppal való meghatározása a sejtek tripánkék felvételén (nekrózis/késői apoptózis) valamint a DAPI-val festődött sejtmagok

fragmentációján alapszik (apoptózis). A HT29R sejtek 24 órás kezelése 20 mM butiráttal, illetve hozzáadott DHQ, rezveratrol és CsA vegyületekkel történt. Az „A” ábra az apoptotikus és nekrotikus sejtek százalékos arányát mutatja butirát illetve butirát és 100 μ M DHQ együttes adagolásának hatására, a „B” ábra a butirát, valamint a butirát és 100 μ M rezveratrol, míg a „C” ábra a butirát, illetve a butirát és 0,5 μ M CsA együttes hatását mutatja.

Az apoptózis másik technikával való kimutatásához a TUNEL módszert alkalmaztuk a butirát és DHQ-val kezelt HT29R sejteken. A 18. ábra bal oldali oszlopai („DAPI”) mutatják a DAPI-val festett sejtmagokat, a jobb oldali oszlopok („DAPI+TUNEL+PARP”) pedig a TUNEL módszerrel illetve anti-PARP ellenanyaggal egyidejűleg festett sejtmagok képeit. A felső két sorban látható az önállóan butiráttal kiváltott sejthalál, az alsókban pedig az egyidejűleg alkalmazott DHQ kezelés eredményei. A képeken zöld színnel festődött területek mutatják a TUNEL módszerrel megfestett száltöredezettséget, míg a piros festődés a hasított PARP enzim előfordulását. A TUNEL pozitivitás és a PARP hasítása az apoptózis jellemző bélyege. Az önálló butirát kezelés hatására a DAPI-val festődő kék sejtmagok megnagyobbodtak, jelezve ezzel a nekrozist, míg csupán a sejtek egy kis részére volt jellemző az apoptózisra utaló zsugorodott és töredezett sejtmag. A butirát mellett alkalmazott DHQ jelenlétében azonban a sejtek nagy része apoptózisban pusztul el, vagyis zöld festődést mutatnak, jelezve ezzel a száltöredezettséget, illetve egyidejű piros festődés esetén a hasított PARP enzim jelenlétét. A TUNEL-próba tehát megerősítette a mikroszkópos elemzés során nyert eredményeket.



18. ábra: TUNEL-módszerrel történő sejthalál meghatározás HT29R sejteken önálló 10 mM butirát („BU” sor), valamint 10 mM butirát és 100 μ M DHQ 24 órás kezelés hatására („BU+DHQ” sor). A bal oldali oszlopok mutatják a DAPI-val festett sejtmagokat, a jobb oldali oszlopok pedig a TUNEL módszerrel (a zöldre festődő töredezett DNS-szálak apoptózist jeleznek) illetve anti-PARP ellenanyaggal festett (pirosra festődő PARP alegység apoptózist jelez) sejtmagok képeit. Figyelemreméltó a DHQ jelenlétében tapasztalható erős PARP pozitivitás, amely együtt jelentkezett a butirát hatásra kialakuló apoptotikus láncfragmentumokkal, így az apoptózist mutatja.

4.1.4. Megbeszélés

Annak ellenére, hogy számos vizsgálati eredmény szerint a butirát, vagy más hiszton-deacetiláz inhibitor, hatására létrejövő sejtbeli ROS-szint emelkedés következtében alakul ki a sejthalál, a ROS szerepe ezekben a folyamatokban máig tisztázatlan.

Hiányos ismeretekkel rendelkezünk továbbá a rákos vastagbélhámsejtek differenciációjának sejtes szabályozó mechanizmusairól is. A hámsejteknek a kripták mélyéről a felszín felé haladó migrációja során olyan differenciáció zajlik le, amely végül lényeges morfológiai és funkcionális különbségekhez vezet. A daganatos elváltozást mutató colorectális sejtek differenciációja együtt jár a tumornövekedés leállításával és a daganat visszafejlődésével. Mindazonáltal a daganatsejtek ilyen típusú differenciációjának mechanizmusa még nem tisztázott. Nem differenciálódott, gyorsan osztódó adenocarcinoma sejtekben a butirát jelentősen gátolta a sejtosztódást, miközben a differenciációt és az apoptózist fokozta. Más rövidszénláncú zsírsavak esetében azonban nem tapasztaltak hasonló hatást. A butiráttal való kezelés normál sejtek, illetve más differenciálódott kultúrák esetében is befolyásolja a sejtosztódást (Comalada et al., 2006). Célunk volt a fentiek alapján megvizsgálni, hogy a butirát hatására kialakuló sejthalál és/vagy differenciáció kapcsolatba hozható-e a szabadgyökök, ROS, H_2O_2 koncentráció, illetve egyéb redox paraméterek változásával. Ennek érdekében összehasonlítottuk a butirát hatására kialakuló differenciációnak ellenálló, de a sejthalálra érzékeny HT29R vonalat a differenciációra hajlamos, de a butirát által kiváltott sejthalálra kevésbé érzékeny HT29-21 sejtekkel.

Korábbi vizsgálatainkban egy spontán differenciációra képes humán vastagbél adenocarcinoma sejtvonalon, Caco-2 sejteken, vizsgáltuk a hidrogén-peroxid hatását (Németh et al., 2007). Eredményeink szerint a vegyület koncentrációfüggő módon képes az intracelluláris jelátviteli utakat szabályozni vagy oxidatív stresszt kiváltó ágensként hatni. Irodalmi adatok szerint 0,1 mM H_2O_2 már gyulladásszerű folyamatokat indított meg a sejten belül és károsította a sejtmembránt (Yamamoto et al., 2003). A korábbi eredmények alapján saját kísérleteinkben 1 mM hidrogén-peroxiddal kezeltük a tenyészeteket 1 órán keresztül, majd 24 óra elteltével vizsgáltuk azokat. A sejtek DAPI festése, illetve a kaszpáz-3 enzim kimutatása eredményeképpen azt tapasztaltuk, hogy a sejtek döntő többsége nekrotizált. A jelentős mennyiségű H_2O_2 hatására feltehetően már

olyan mértékű lipid-peroxidáció és redox állapotváltozás alakul ki, amely a sejt belső egyensúlyának teljes összeomlásához, ezáltal nekrozishoz vezet (Németh et al., 2007). HT29 vonalakon végzett kísérleteinkben viszont a H_2O_2 és egyéb reaktív vegyületek intracelluláris jelként való hatásait vizsgáltuk a differenciációra és a sejthalálra.

A sejtek differenciációja alternatív utat jelent a folytonos sejtosztódással vagy a sejthalállal szemben. Ez arra utal, hogy a proliferáció, a differenciáció és a sejthalál folyamataiban van egy közös pont, amelyen keresztül az egyik folyamatból át lehet térni a másikba. Ennek felismerése és szabályozási mechanizmusainak leírása komoly kihívást jelent. A bélhámsejtek differenciációja és proliferációja közötti átkapcsolás legfontosabb szabályozó útjának jelenleg a β -katenin/Tcf-4 útvonalat tartják. A HT29 sejtek butirát hatására kialakuló differenciációja esetén a sejtnövekedést gátló és a differenciáció irányába ható p21 és p53 fehérjék fokozott termelődését figyelték meg (Liu et al., 2006). Egy másik tanulmányban a butirát hatására kialakuló differenciáció és növekedésgátlás folyamatát vizsgálták számos adenoma eredetű sejtvonalon. Kimutatták, hogy a butirát hatására kialakuló apoptózis együtt jelentkezik a differenciációs markerként ismert E-kadherin és alkalikus-foszfataz fokozott expressziójával (Butt et al., 1997). Saját vizsgálatunkban a butirát koncentráció függvényében kialakuló fokozott H_2O_2 termelődést tapasztaltunk a differenciációra érzékeny HT29-12 és HT29-21 sejteken, de érdekes módon emellett a szabad gyökök vagy ROS/RNOS vegyületek szintjének emelkedése nem volt detektálható. Ezzel ellentétben a differenciációnak ellenálló HT29R sejtek éppen ellenkezőleg viselkedtek: a butirát koncentráció függvényében fokozott szabad gyök és ROS/RNOS képződés indult meg bennük, de jelentősebb mértékű H_2O_2 termelődés nélkül. Ennek alapján szelektív módon társíthatjuk a különböző ROS vegyületeket a következményesen kialakuló sejthalálhoz vagy differenciációhoz, feltételezve ezzel, hogy azok szignál molekulaként működnek a sejthalál és differenciáció közötti válaszüton.

Egy, a butirát hatására kialakuló differenciációt vizsgáló tanulmány kimutatta, hogy Caco-2 és HT29 sejteknél nagy koncentrációban alkalmazott nátrium-butirát apoptózist igen, de a bélhámsejtek differenciációját nem váltotta ki. Ebből arra következtettek, hogy a butirát különböző intracelluláris mechanizmusokon keresztül apoptózist indukál, vagyis a programozott sejthalál nem lehet a bélhámsejtek terminális differenciációjának következménye (Orchel et al., 2005). A differenciációs markerként ismert alkalikus-foszfataz általunk tapasztalt változatlan mértékű expressziójának

egyszerű magyarázata lehet, hogy a HT29R sejtek butirát által kiváltott sejthalála olyan gyors folyamatként zajlik le, hogy nincs esély a sejtdifferenciáció kialakulására. Bár a sejthalállal szembeni fokozott érzékenység nyilvánvalóan nem kedvez a differenciációnak, de ezen túl más tényezők is befolyásolhatják a differenciáció lezajlását. HT29R sejteken alacsonyabb butirát koncentráció esetén – amely ezáltal csupán kisebb mértékű sejthalált vált ki – bizonyos mértékű differenciáció ugyan elvileg kialakulhatna, de az eredmények alapján nem ez történik. Ezek szerint a HT29R sejtekben tehát léteznie kell valamilyen, ma még nem ismert, molekuláris gátnak a butirát által kiváltott differenciációval szemben, hiszen a teljes butirát koncentráció tartományban közel azonos alkalikus-foszfátáz aktivitást tapasztaltunk.

Feltehetően lényegesen különböző típusú ROS vegyületek közvetítik a HT29R és a HT29-21 sejtekben a butirát által kiváltott differenciáció beindulását, illetve a sejthalált. Ki kell azonban emelnünk, hogy vizsgálatunkban az intracelluláris állandó állapotú szabad gyök koncentrációt határoztunk meg ESR spektrométerrel, spincsapda használata nélkül, folyékony nitrogénben tárolt mintákban. Ilyen körülmények között nem valószínű, hogy az alig néhány másodperc életidejű, instabil szuperoxid-anion lett volna az ESR jelek hátterében. HT29R sejteken a butirát koncentráció függvényében kialakuló egyéb szabad gyökök viszont stabil állapotban fennmaradnak folyékony nitrogénben tárolva az ESR mérésekig. Pontos kémiai szerkezetük meghatározása azonban még további vizsgálatokat igényel.

Az a tény, hogy HT29R sejtekben a teljes butirát koncentráció tartományban csekély szinten maradt a H_2O_2 képződés, míg a butirát kiváltotta sejthalálra kevésbé érzékeny HT29-12 és HT29-21 esetében koncentrációfüggő mértékben termelődött, azt feltételezi, hogy a H_2O_2 nem játszik meghatározó szerepet a sejthalál jelátvitelében. Sőt, a HT29-12 és HT29-21 sejtek H_2O_2 termelése paradoxnak tekinthető, mivel egy már elfogadott hipotézis (Pervaiz et Clement, 2007) szerint a szuperoxid-anion a túlélést fokozza, míg a H_2O_2 inkább a sejthalál szignáljaként működik. Mivel az instabil szuperoxid-anion egy igen gyors, enzimatikusan katalizált reakcióban H_2O_2 molekulává alakulhat, lehetséges, hogy az általunk mért H_2O_2 a butirát által közvetlenül kiváltott szuperoxid-anion dizmutációjának eredményeképpen jelenik meg. Mindezek mellett meg kell említeni, hogy a H_2O_2 fiziológias folyamatokban betöltött szerepét – oxidatív stressz kiváltása vagy szignál molekula – annak sejtbeli lokalizációja és koncentrációja is befolyásolja (Burdon, 1995; Suzuki et al., 1997; Dröge, 2002). A 12. ábrán (57. old.)

látható, hogy HT29-12 és HT29-21 sejtekben a termelődő H_2O_2 koncentráció teljes tartományában a GSH/GSSG arány és a hozzá tartozó redoxpotenciál értékek nem változtak, jelezve ezzel, hogy a H_2O_2 képződés, a vizsgált idő intervallumon belül, nem vált ki oxidatív stresszt, de kapcsolatba hozható a sejthalállal szembeni ellenállással és a differenciáció-érzékenységgel.

A HT29R sejtekben azonban az 1 mM, illetve az 5 mM butirát koncentráció felett kiváltott szabad gyök és ROS/RNOS termelődés összefüggést mutat a sejtbéli GSH/GSSG arány csökkenésével és a redoxpotenciál változásával. Vizsgálatainkban tehát a HT29R sejtekben mért, butirát által kiváltott FR és ROS szintek oxidatív stresszt és egyidejűleg sejthalál-érzékenységet is kiváltottak.

Kísérleteink eredményei alapján tehát kijelenthető, hogy ideiglenes kapcsolat van csupán a butirát kiváltotta sejthalál és a megnövekedett szabad gyök és ROS/RNOS szintek között. Az eredmények ugyanakkor arra is rámutatnak, hogy az egyes ROS/RNOS vegyületek különböző hatást képesek előidézni. A kísérletekben alkalmazott DCF-próba a H_2O_2 -t nem tartalmazó ROS/RNOS koncentrációt mérte, miképpen azt a kataláz-próba is jelezte. A HT29-12 és HT29-21 sejtekben termelődött FR és ROS vegyületek pontos molekuláris tulajdonságai ugyanakkor jelenleg még nem ismertek. A butirát által kiváltott FR és ROS termékek jellemzése, sejthalált kiváltó mechanizmusuk megismerése az eljövendő kutatások témája lesz. Szintén megválaszolásra vár az a kérdés, hogy milyen mechanizmusokon keresztül hat a butirát a HT29-12 és HT29-21 sejtekben a H_2O_2 képződés növekedésére, amikor a differenciáció és a túlélés határozza meg a sejt sorsát.

A butirát által kiváltott sejthalált tekintve csak a HT29R vonalon figyeltünk meg nekrozist/késői apoptózist, de a DHQ, a rezveratrol vagy a CsA jelenlétében ez túlnyomórészt apoptózisba ment át. Összetett humán rákos sejtvonalakon figyelték meg, hogy butirát hatására aktiválódott a kaspáz-3, majd a mitokondriumon/citokróm-c kiáramlással megindult a sejthalál folyamata (Shao et al., 2004; Cai et al., 2004). Egy másik vizsgálatban, HT29 szülővonalon, hasonló kaspáz-3 szinteket mértek, de a sejtek alkalikus-foszfatáz aktivitása, vagyis differenciáltságuk mértéke különbözött (Storková et al., 2006). Ez a tanulmány azt is kimutatta, hogy a differenciálatlan vastagbélhámsejtek modelljeként használt HT29 sejtek a normál kripták mélyén fellelhető őssejtekhez hasonló multipotens tulajdonságokkal bírnak. A kaspázok gátlása vizsgálataik alapján a differenciációs markerek expresszióját is akadályozza, ami

azt feltételezi, hogy a terminális differenciáció szoros kapcsolatban áll a kaspáz-rendszerrel, az anti-apoptotikus fehérjék pedig a rák fennmaradása irányában hatnak (Cai et al., 2004). A három általunk vizsgált vegyület – DHQ, rezveratrol és CsA – bár szerkezetükben nagyon különbözőek, mégis hasonlóképpen az apoptózis irányába viszik a sejteket. A DHQ, mint PARP-gátló, védi a sejtet ATP készletének kimerülésétől. A rezveratrol antioxidáns tulajdonságai révén a mitokondriumot védi az oxidatív stressztől, míg a CsA a mitokondriális membrán „transition pore” nyitásának gátlásával szintén a mitokondrium élettartamát képes meghosszabbítani. Jelen vizsgálatainkban a butirát hatására megnövekedett ROS/RNOS szintek megerősítik azt a tényt, hogy az oxidatív stressz központi szerepet játszik a butirát által kiváltott sejthalálban. Az azonban még tisztázatlan maradt, hogy mely ROS/RNOS vegyületek termelődnek butirát hatására, és ezek háttérében milyen mechanizmus(ok) áll(nak).

4.2. Az endometrium apoptotikus sejtjeinek aránya csökken az involúció korai időszakában hyperketonaemiás tehenekben

Korábbi kísérleteink azt mutatták, hogy butirát hatására HT29R sejtekben nagy mennyiségű szabad gyök termelődik, a sejthalál folyamatában a PARP enzim nem inaktiválódik, és a sejtek nagy arányban nekrozist mutatnak. Ugyanakkor abban az esetben, ha gátoltuk a szabad gyökök képződését, vagy a PARP aktivitását, akkor a nekrozis mértéke csökkent, az apoptózis kialakulása viszont fokozódott. Ezek alapján feltételezhető, hogy a PARP fokozott aktivitása által előidézett negatív energiamérleg nem tette lehetővé az energiaigényes apoptózis kialakulását, és ez az állapot a sejtek nekrozisához vezetett. Számos korábbi megfigyelés igazolta, hogy az ellést követően kialakuló negatív energiamérleg (NEB) a szarvasmarhák involúciós folyamatát hátrányosan befolyásolja. Mivel az involúció szövetlebontással jár, ami annak apoptotikus jellege miatt energiaigényes folyamat, a HT29R sejteken tapasztaltak alapján érdekesnek találtuk megvizsgálni, hogy az involúció során a méh endometrium sejtjeinek apoptotikus és nekrotikus folyamatait a NEB hogyan befolyásolja. Feltételezésünk szerint a szervezet egészét érintő NEB sejtszinten ATP-hiányt idéz elő, és annak tartós fennállása nekrozis irányába tolja el sejthalált, ami egyik magyarázata lehet az ilyen esetekben fellépő kóros elváltozásoknak.

4.3.1. Bevezetés és célkitűzés az endometrium mintákon végzett kísérletekhez

Az ellés utáni időszakban, a puerperiumban, a gyorsan növekvő tejtermelés komoly metabolikus terhelést jelent, különösen a tejhasznosítású tehenek számára. A genetikai szelekció hatására bőtejelő fajták esetében a szervezet által előnyben részesített laktáció és az életfenntartás energiaszükségletét a puerperium időszakában az állat még az aktuális szükségletet teljes mértékben kielégítő táplálóanyag ellátás mellett is csak saját zsírraktárainak lebontásával, azaz fokozott lipidmobilizáció révén képes fedezni. Az aktuális szükségletnél kisebb mértékű szárazanyag-felvétel és a szervezet energiaigénye közötti különbség következtében negatív energia-egyensúly alakul ki. Energiahiány esetén, mivel nem áll a szervezet rendelkezésére elegendő mennyiségű glükóz, ezért az állat saját tartalékait mozgósítva fokozott zsírmobilizációba kezd, és

erőteljes zsírsav oxidációt indít be sejtjeiben. A keletkező nagy mennyiségű acetyl-CoA azonban a megfelelő reakciópartner, vagyis az oxálacetát, hiányában nem képes belépni a citrátkörbe, így a felhalmozódó acetyl-CoA molekulákból acetoacetyl-CoA, majd a májban ketontestek képződnek. A ketonanyagok közé az azok 80%-át adó β -hidroxi-butyrát (BHB), valamint az acetecetsav és az acetone tartoznak. Ezek a vegyületek először csak a vérben jelennek meg, így ha a BHB vérszintje eléri az 1 mmol/l-t akkor hyperketonaemiáról, abban az esetben pedig, ha a BHB vérbeli koncentrációja tovább nő, és a ketonanyagok már a tejjel és a vizelettel is ürülnek, akkor ketózisról beszélünk. A ketonanyagok megjelenésével egyidejűleg csökken a vérben fellelhető glükóz koncentráció, és nő a szabad zsírsavak mennyisége. A folyamatosan fennálló NEB hatására csökken a tejtermelés, állategészségügyi és szaporodásbiológiai problémák jelennek meg. A méh involúciója lelassul, amelynek háttérében feltételezhető a szöveti átépülésben jelentős szereppel bíró energiaigényes apoptózis zavara is. Mindezekből következik, hogy a fiziológiás szintet meghaladó mértékű és tartamú NEB esetén gyakrabban alakulhatnak ki involúciós szövödmények.

A szövetek át- vagy leépülésében mindenkor jelentős szerepe van a programozott sejthalálnak. A méh involúciójakor a méhcarunculák leválásával, a kollagén és fehérje természetű anyagok lebontásával mintegy 90%-os tömegveszteségen megy át a szerv (Youngquist et al., 2007). Az involúcióban három fő folyamatot különítünk el: a megnövekedett kollagenáz és proteáz aktivitást, az endometrium sejtjeinek apoptózissal való pusztulását, és az így keletkezett lochia külvilág felé való távozását (Noakes et al., 2001). Az inetrarunculáris területeken ezzel egyidőben megindul a regeneráció és nagyjából 1-1,5 hónap alatt újjáépül az endometrium. (Takamoto et al., 1998).

Optimális körülmények között a vemhes méh leépülése programozott sejthalállal, azon belül is apoptózissal zajlik le, amely a sejtmembrán integritásának megőrzésével megakadályozza, hogy a citoplazma összetevői a környező szövetekbe jutva gyulladást indukáljanak. Okano és munkatársai 2007-ben azt vizsgálták, hogy sertés endometriumában hogyan alakul a programozott sejthalál előfordulása a teljes szaporodási ciklus során. Vizsgálataik alapján az ellés utáni 13. napon a felszíni hámban a sejtek mintegy fele mutatott pozitívítást apoptózisra TUNEL teszttel vizsgálva (Okano et al., 2007). Szarvasmarhánál hasonló kutatásokat eddig még nem végeztek.

Egy korábbi, patkányon végzett, kísérletben pedig a fialás utáni 22. napon a méh simaizom és fibroblast sejtjeiben vizsgálták az apoptózis előfordulását. Eredményeik szerint a simaizom sejtek 43%-a, a kötőszöveti sejteknek pedig 39%-a mutatott pozitivitást (Leppert, 1998).

Az apoptózis folyamatához több ponton szükséges az energia: az apoptozóma kialakulásakor (Hu et al., 1999), a citoplazmában fellelhető faktorok intranukleáris transzportjához (Yasuhara et al., 1997), valamint a proteáz-kinázok aktiválása és működése is ATP-t igényel (Eguchi et al., 1999). A nekrozis ezzel szemben nem igényel energiát, viszont a folyamat során károsodott sejthártyán keresztül a sejt anyagai az extracelluláris térbe jutva gyulladást váltanak ki.

Ha a sejtben nincs elegendő intracelluláris ATP, akkor a szervezet számára előnyösebb apoptózis helyett nekrozis zajlik le. Az apoptózis és nekrozis közötti választáson tehát az energiának van döntő szerepe (Charugi et al., 2005). Ma már azonban tudjuk, hogy az apoptózis és a nekrozis nem különül el ilyen élesen egymástól, ezért sokszor célszerűbb apoptózis-szerű és nekrozis-szerű sejthalálról beszélni.

Vizsgálataink célja az volt, hogy a puerperium korai időszakában lévő tehenek endometrium biopsziás mintáiban meghatározzuk az apoptózis mértékét megfelelő energiaellátottságú, illetve a fiziológiás szintet meghaladó mértékű negatív energia-egyensúlyban lévő állatokban.

4.3.2. Anyag és módszer

4.3.2.1. Kísérleti állatok és mintagyűjtés

Magyarország keleti részén található 7 nagyüzem összesen 49 állata vett részt a vizsgálatokban. A 2-8 éves Holstein-fríz teheneket közvetlenül az ellés után, majd a 3-4., 6-8. és 21. napon klinikai vizsgálatnak vetettük alá, amelynek során a testhőmérsékletet, az állat általános állapotát és a hüvelyváladék minőségét mértük fel, majd rektális, illetve vaginoszkópiás vizsgálatot végeztünk. Az így kapott eredmények alapján az egyedeket puerperalis metritis-szel terheltnek vagy egészségesnek minősítettük. A vizsgálat napján a *vena jugularisból* vért vettünk heparinos csövekbe,

majd a vérplazmát centrifugálás után a feldolgozásig -18°C -on tároltuk. Ezekből a mintákból határoztuk meg a vér ketonanyag koncentrációját. Az állatokból az ellés utáni 4-14. napon endometrium biopsziát vettünk, a mintákat azonnal glutáraldehidre és formaldehidre nézve egyaránt 4%-os oldatban fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk.

A blokkokból a metszeteket a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal, Állategészségügyi Diagnosztikai Főigazgatóság Kórszövettani Osztályán készítették.

4.3.2.2. A vér biokémiai vizsgálata

A vérplazma β -hidroxibutirát koncentrációját a 3-HBDH-NAD (3-hidroxibutirát-dehidrogenáz-NAD) módszerrel határoztuk meg (D-3-Hydroxybutyrate kit, Randox Laboratories Ltd, Ardmore, Nagy-Britannia). Minden egyes mérés alkalmával három párhuzamos mintát használtunk, kontrollként pedig ismert BHB koncentrációjú mintákat alkalmaztunk.

4.3.2.3. Vizsgálati csoportok

A méh klinikai vizsgálata alapján az állatokat egészségesnek ($n = 13$) vagy puerperalis metritissel (PM) terheltnek ($n = 36$) ítéltük. A vérbeli BHB koncentráció alapján a 1 mmol/l alatti értéket mutató állatokat normoketonaemiásnak, az e feletti értékek esetén hyperketonaemiásnak ítéltük. E két paraméter alapján négy csoport alakult ki: (1) kontroll; (2) PM, normoketonaemia; (3) egészséges méh, hyperketonaemia; (4) PM, hyperketonaemia.

Minden biopsziás mintából egy-egy metszetet hematoxilin-eozinnal festettünk meg, és hagyományos fénymikroszkópos vizsgálatnak vetettünk alá. Felmértük a kóros elváltozásokat, és a mintákat Dr. Glávits Róbert (Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Főigazgatóság) módszere szerint háromfokozatú skálán osztályoztuk az egyes tulajdonságokra: ennek alapján a kóros elváltozásokat leginkább mutató metszeteket 3, a kóros elváltozásokat legkevésbé mutatókat pedig 1 osztályzattal jelöltük. A biopsziás minták szövettani értékelését követően számos

egyedet ki kellett zárni a további értékelésből a szövetminta kifejezett degenerációja vagy annak hámsiányos állapota miatt.

Emiatt a korábban 3. és 4. számmal jelölt csoportokat, a kis esetszám miatt össze kellett vonni. A végleges csoportbeosztás tehát a következő: (1) kontroll, (2) PM, normoketonaemia, (3) hyperketonaemia, egészséges vagy gyulladt méhvel.

4.3.2.4. Immunhisztokémia

A vizsgált mintákon kettős immunfestést alkalmaztunk: a leukocyták megfestése a közös leukocyta antigén alapján történt (common leukocyte antigen, CLA vagy CD45) (Mouse anti-bovine CD45, AbD Serotec, Kidlington, Nagy-Britannia) míg a töredezett DNS kimutatása a terminális dezoxinukleotid-transzferáz mediált dUTP jelöléssel (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick-End Labeling, TUNEL) (Dead End Fluorometric TUNEL System, Promega, Madison, WI, USA). Megvizsgáltuk tehát egyrészt az apoptózist mutató sejtek 180-200 bp nagyságú fragmentekre darabolódott DNS-ét TUNEL módszerrel, másrészt a sejtek DNS-ét DAPI-val is megfestettük, ami lehetővé tette valamennyi élő és elpusztult sejtmag megfigyelését. Apoptotikus sejteknek azokat fogadtuk el, amelyek együttes TUNEL és DAPI pozitivitást mutattak. Folyamatos metszéssel formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmintákból 4 µm-es metszetek készültek, melyeket poli-L-lizinnel kezelt lemezekre vittünk.

A mintákat a festés előtt paraffin mentesítettük és felszálló koncentrációjú alkoholsorban vízmentesítettük. Az antigén feltárás céljából a szövetmetszeteket citromsavas pufferben 5 percig főztük (Antigen Unmasking Solution, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Háromszori PBS-sel való öblítés után az immunfestést a TUNEL-próbával kezdtük meg. A kiegyenlítő pufferrel való 10 perces előkezelés után a metszeteket a nukleotid keveréket és enzimet is tartalmazó kiegyenlítő pufferrel kezeltük és műanyag fedőlemezekkel borítva nedves kamrában 37°C-on 60 percig inkubáltuk. Pozitív kontrollként DNáz I-gyel előkezelt lemezeket alkalmaztunk (RQ1 RNase-Free DNase, Promega, Madison, WI, USA), amelyet a TUNEL reagensek előtt 10 percre adtunk a mintákhoz. Negatív kontrollként a terminális dezoxinukleotid-transzferáz enzimet desztillált vízzel helyettesítettük az oldatban. A 60.

perc után a reakciót leállítottuk a gyárilag biztosított sóoldattal. Végül anti-fluorescein ellenanyagot (MsX Fluorescein Alexa Fluor 488 Conjugate, Chemicon International, Temecula, CA, USA) adtunk a mintákhoz 30 percre 1:100 PBS/1% borjú szérumban (bovine serum albumin, BSA) való hígításban a fluoreszcens jel intenzitásának erősítése érdekében.

A minták PBS-mosását követően a sejtfelszíni közös leukocita antigén kimutatásával folytattuk az immunhisztokémiai vizsgálatot. A lemezeket a PBS/1% BSA-ban 1:5 arányban hígított anti-CD45 ellenanyaggal kezeltük 60 percig. Ezt követte egy biotinnal konjugált, kecskében termelt anti-egér másodlagos ellenanyag (Biotinylated Anti-Mouse IgG, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) a jelölt sejtek kimutatására. A metszeteket 45 percig inkubáltuk az ellenanyag 1:200-as PBS/1% BSA-ban való hígításával, és végül az Alexa 594 festékkel konjugált streptavidin reagens (Streptavidin Alexa Fluor 594 conjugate, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) tette láthatóvá a már jelölt sejteket. Ezt a reagenst 1:200-as hígításban alkalmaztuk PBS/1% BSA-ban oldva 30 percen keresztül. Háttérfestésként valamennyi sejtmagot a fluoreszcens DAPI-való 5 perces festéssel tettünk láthatóvá (DAPI, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) és a metszeteket fedőanyaggal (Mowiol), illetve üveg fedőlemezzel fedtük le.

Az így kapott mintákat száradás után vizsgáltuk, majd AxioCam digitális kamerával (AxioCam HRc, Carl Zeiss AG, Jena, Germany) és színszűrőkkel (Piros szűrő, XF43 Omega Optical, Brattleboro, VT, USA; FITC filter, 487910 és DAPI szűrő 487901, Carl Zeiss AG, Jena, Németország) kiegészített fluoreszcens mikroszkóppal (AxioPhot, Carl Zeiss AG, Jena, Germany) lefényképeztük. Valamennyi metszeten öt, átfedést nem mutató, összefüggő mezőről készült felvétel 40x nagyításban, mindhárom színszűrő használatával.

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézetének laboratóriumában végeztük.

4.3.2.5. Az eredmények kiértékelése

A formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintákból 4 μ m-es metszetek készültek az immunfestés megkezdése előtt. Minden mintából legalább egy metszetet hematoxin-eozinnal festettünk előzetes szövettani elemzés céljából. A szövettani értékelés alapján a gyulladáson erősen elfajult vagy a hiányos endometriummal rendelkező (hámréteg hiánya) mintákat kizártuk a további vizsgálatokból. Azokat a metszeteket vizsgáltuk tovább, melyeken az endometrium hám és kötőszöveti része egyaránt fellelhető volt.

A fényképeket Adobe Photoshop 7.0 program segítségével értékeltük. Az endometrium összes sejtszámát megkaptuk (hám és kötőszöveti sejteket figyelembe véve), ha a mezőnként számolt DAPI-val festődött sejtek számából kivontuk a CD45 pozitivitást mutató leukocyták számát. TUNEL-pozitív sejtek egyidejű DAPI festődéssel adják meg az apoptotikus sejtek számát. Az apoptotikus index kiszámításakor a teljes sejtszámot osztottuk az apoptózist mutató sejtek számával, és az eredményt szoroztuk 100-zal.

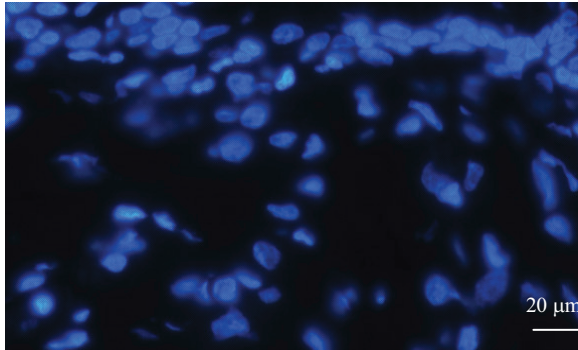
4.3.2.6. Statisztikai számítások

A statisztikai vizsgálatokhoz a MINITAB (Minitab Inc, State College, PA, USA) programot alkalmaztuk. Az eredményeket átlag \pm SEM értékkel adtuk meg, a különbségeket pedig $p < 0,05$ szinten tekintettük szignifikánsnak. Az adatokat ANOVA-val vetettük össze.

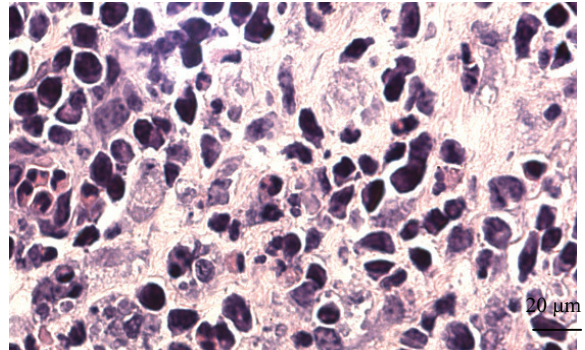
4.3.3. Eredmények

Munkánk során figyelemmel kísért 49 állat méhéből nyert előzetes szövettani értékelés során biopsziás minták szövettani értékelését követően számos egyed (n = 25) ki kellett zárni a további értékelésből. Így az eredeti csoportbeosztást át kellett alakítani, és csak három vizsgálati csoport maradt benn a további értékelésben: (1)

kontroll (n=10), (2) PM, normoketonaemia (n=9), (3), hyperketonaemia egészséges vagy gyulladt méhvel (n=5).



DAPI

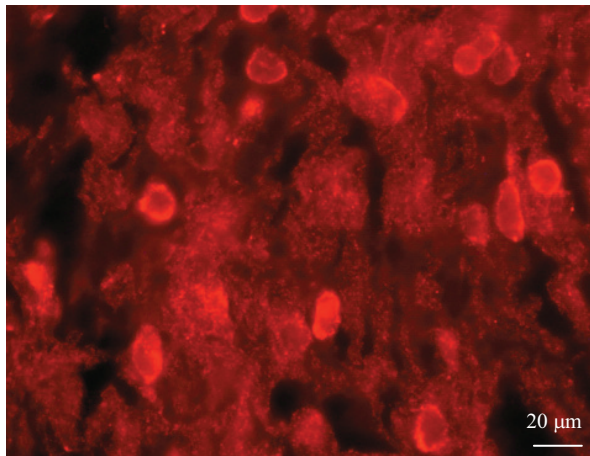


Heamatoxin-eozin

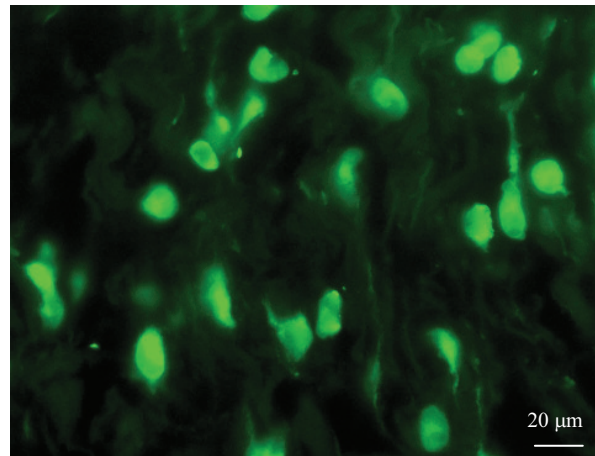
19. ábra. Szarvasmarha uterus bioptátumból készült metszeten erős gyulladással besűrűsödés látható, úgy a DAPI-val készült magfestés utáni fluoreszcens mikroszkóppal készült felvételen, mint a hematoxin-eozinnal történt festést követően készült fénymikroszkópos felvételen. A két kép ugyanazon bioptátumnak két különböző területéről készített festését mutatja.

A sejthalál értékelés során figyelembe vett mintákon (n = 24) az apoptózist immunhisztokémiai módszerrel mutattuk ki. Vizsgálatainkban a puerperium korai időszakában lévő tehének endometrium biopsziás mintáiban meghatároztuk az apoptózis mértékét a vérplazma BHB koncentrációja alapján megfelelő energia ellátottságú, illetve a fiziológiás szintet meghaladó mértékben negatív energia-egyensúlyban lévő állatokban.

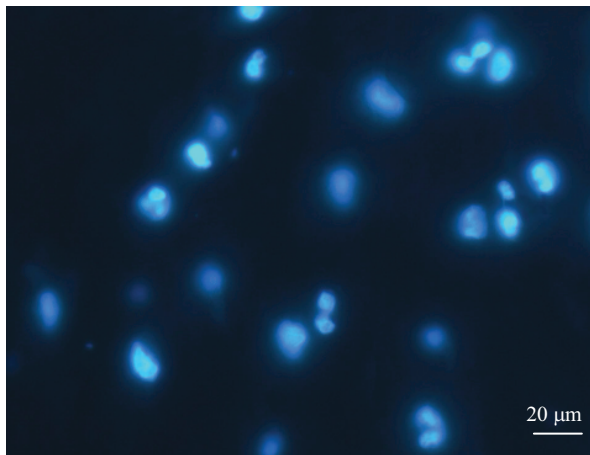
A TUNEL festéssel párhuzamosan végzett anti-CD45 ellenanyaggal a szöveten belül elkülöníthető volt a leukocyták jelenléte (20. ábra). Bár a leukocytákkal erősen beszűrt mintákat kizártuk a kísérletből, de különösen a puerperalis metritis-szel terhelt egyedek bioptátumaiban így is nagyszámú gyulladással sejt volt felfedezhető. Továbbá a phagocyták fiziológiás körülmények között is fellelhetők az egészséges méh szövetében, hiszen az apoptózissal elhalt sejtek eltakarításában részt vesznek.



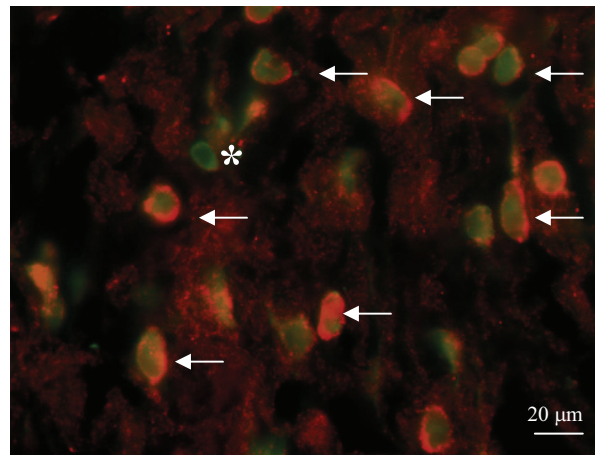
A



B



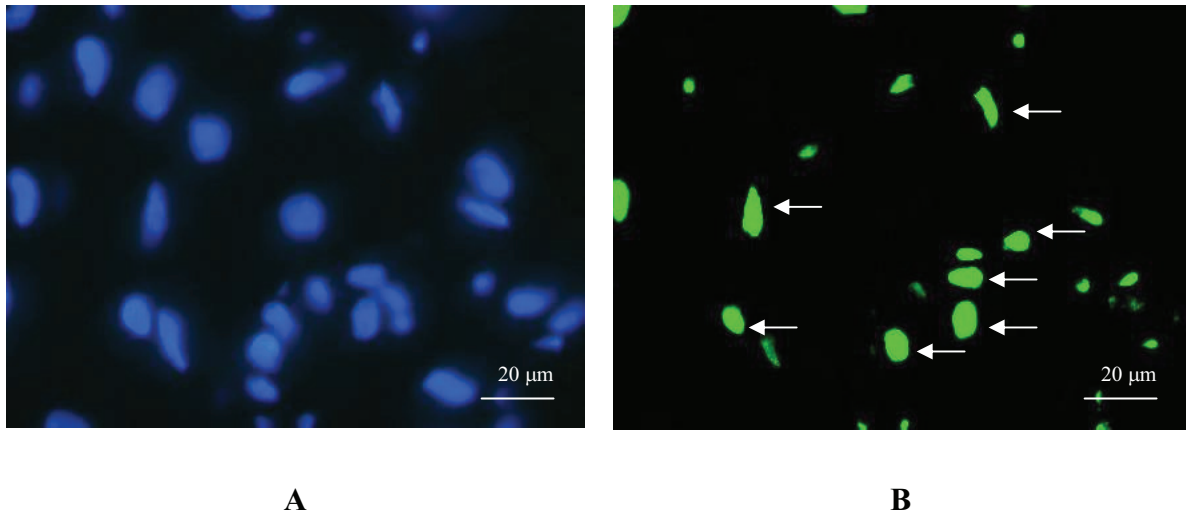
C



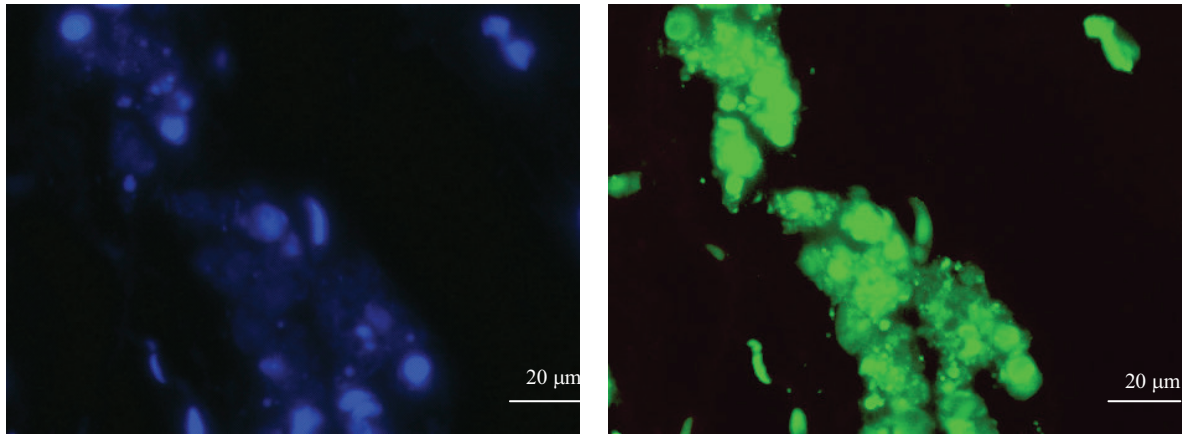
D

20. ábra: Egy normoketonaemiás egyed (696) uterus mintájában megfigyelhető egyidejű CD45 és TUNEL pozitivitást mutató sejtek, vagyis leukocyták. Mivel a CD45 egy felületi antigén, ezért pozitív esetben piros kör alakú szineződés látható a sejt körül. A CD45 piros („A”), a TUNEL zöld („B”), a DAPI pozitívítás pedig kék („C”) színnel látható. A „D” képen a sejtek egyidejű anti-CD45 és TUNEL festésével láthatóvá tehetők az apoptózist mutató phagocyták (nyíllal jelölve). A csak TUNEL pozitívítást mutató sejtek, amelyek nem festődnek pirosra az endometrium egyéb apoptotikus sejtjeit jelzik (csilaggal jelölve).

A megfelelő energiaellátású egyedek biopsziás mintáiból készült metszeteken számos TUNEL pozitív sejt festődik (21. ábra), köztük néhányban az apoptózisra jellemző apoptotikus testek is jól megfigyelhetők (22. ábra). Az energiahiányos állapotban lévő, hyperketonaemiás tehenek mintáiban azonban kevesebb TUNEL pozitívitás mutatkozik (23. ábra).



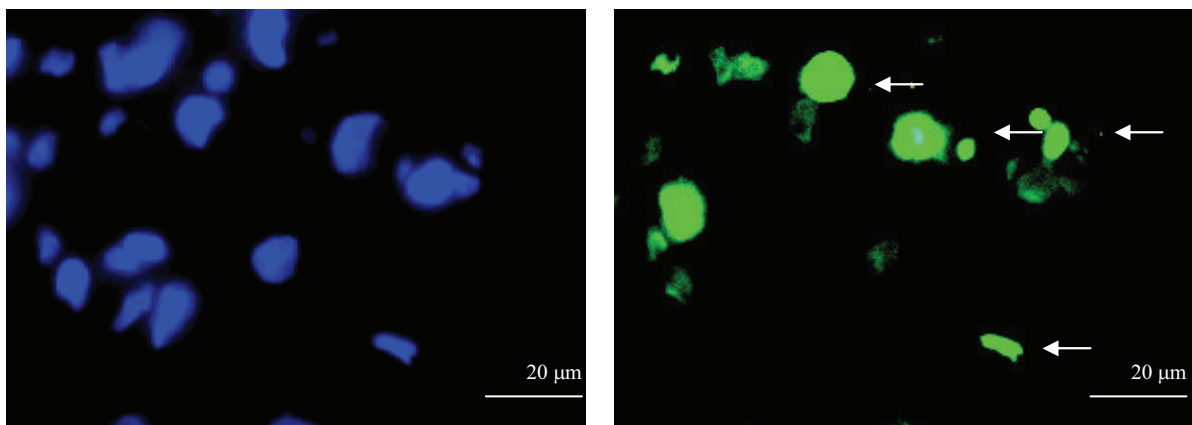
21. ábra: Kontroll állat (818) endometrium biopsziás mintájában előforduló egyidejűleg DAPI-val festődő, illetve TUNEL pozitív sejtek . A bal oldali képen az összes sejtszámot megadó, kék színű DAPI festés („A”), a jobb oldali képen pedig a zöld színű TUNEL-reakcióval kimutatott apoptózis („B”) látható (nyíllal jelölve).



A

B

22. ábra: Apoptotikus testek kontroll állat (818) endometrium biopsziás mintájában DAPI, és egyidejű TUNEL pozitív festődéssel. A bal oldali képen az összes sejtszámot megadó, kék színű DAPI festés („A”), a jobb oldali képen pedig a zöld színű TUNEL-reakcióval kimutatott apoptózis („B”) látható. Mindkét képen jól láthatóan a nagyobb méretű ép sejtmagokhoz képest a kisebb DNS fragmentumok is festődnek, amelyek az apoptotikus testeket adják.



A

B

23. ábra Hyperketonaemiás állat (1424) endometrium biopsziás mintájában előforduló DAPI pozitív, illetve TUNEL pozitív sejtek. A bal oldali képen az összes sejtszámot megadó, kék színű DAPI festés („A”), a jobb oldali képen pedig a zöld színű TUNEL-

reakcióval kimutatott apoptózis („B”) látható. Pozitívnak a zöld színnel erőteljesen fluoreszkáló sejtek tekinthetők (nyíllal jelölve).

A megvizsgált 24 egyed további csoportokba osztása az involúciós méh egészségi állapota alapján történt. Ez alapján elkülönítettünk kontroll csoportot, valamint puerperális metritis-szel (PM) terhelt normoketonaemiás, illetve hyperketonaemiás állatokat.

A kontroll csoportba 10 tehenet soroltunk, a vérükben mért BHB koncentráció $0,45 \pm 0,12$ mmol/l volt. Ezekből az állatokból nyert biopsziás mintákban az összes sejt $49,97 \pm 6,18\%$ -a mutatott apoptózist. A pontos értékeket részletezve a 3. táblázatban tüntettük fel.

3. táblázat: A kontroll csoport egyedeinek BHB vérkoncentrációja, valamint az apoptózis előfordulási aránya biopsziás mintákban

azonosító szám	818	826	927	1337	2034	2610	2625	3236	3263	5833
BHB (mmol/l)	0,53	0,5	0,39	0,5	0,39	0,45	0,59	0,45	0,17	0,59
apoptózis %	63,4	45,28	49,1	46,72	50,71	51,76	47,6	48,88	55,62	40,6

A PM, normoketonaemiás csoport vérmintáiban mért átlagos BHB koncentráció $0,42 \pm 0,15$ mmol/l volt. Az apoptózis előfordulási aránya $51,67 \pm 0,15\%$ volt az endometrium mintákból készített metszeteken. A pontos értékeket a 4. táblázatban tüntettük fel.

4. táblázat: A PM, normoketonaemiás csoport egyedeinek BHB vérkoncentrációja, valamint az apoptózis előfordulási aránya biopsziás mintákban.

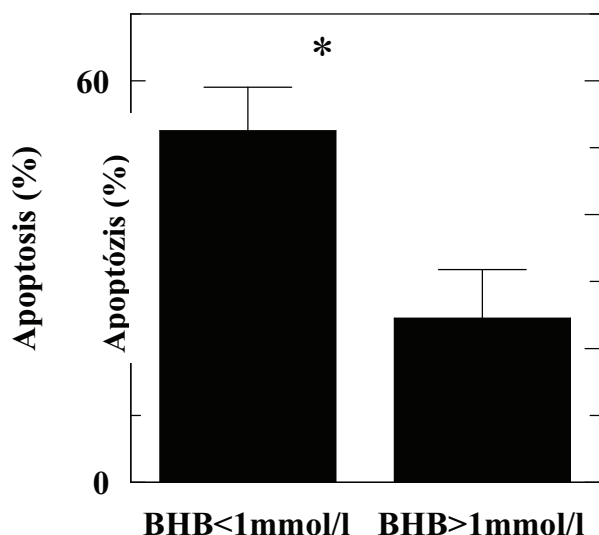
azonosító szám	696	725	1527	2062	2711	4827	4899	5879	7437
BHB (mmol/l)	0,7	0,37	0,5	0,38	0,63	0,31	0,26	0,34	0,31
apoptózis %	53,32	50,07	50,58	51,27	48,73	52,8	48,19	55,04	55,08

A hyperketonaemiás csoport egyedeiben az átlagos BHB koncentráció $1,47 \pm 0,32$ mmol/l volt. Az apoptózis mértéke a vizsgált állatokban $23,83 \pm 6,44\%$ -nak adódott. Az egyes egyedek konkrét értékeit az 5. táblázatban tüntettük fel

5. táblázat: A hyperketonaemiás csoport egyedeinek BHB vérkoncentrációja, valamint az apoptózis előfordulási aránya biopsziás mintáikban.

azonosító szám	1424	2143	2181	5429	5869
BHB (mmol/l)	1,72	1,65	1,76	1,04	1,22
apoptózis %	14,38	24,02	29,63	29,87	21,27

Ha az állatokat a vérplazma BHB koncentrációja alapján normo- illetve hyperketonaemiás csoportokra osztjuk, akkor az egyes csoportokhoz tartozó apoptózis indexek alapján, amelyek $50,82 \pm 4,76\%$ -nak illetve $23,83 \pm 6,44\%$ -nak adódtak, szignifikáns különbség látható ($p < 0,05$) a két csoport értékei között (24. ábra).



24. ábra: A normoketonaemiás (BHB<1mmol/l) és a hyperketonaemiás (BHB>1mmol/l) tehenek endometrium biopsziás mintáiban előforduló apoptózis mértéke. n=24+/-SD. A két érték egymáshoz viszonyítva szignifikáns különbséget mutat, p<0.05.

Vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy a kontroll egyedekhez viszonyítva a fiziológias normál értéktartomány felső határértékét meghaladó BHB szinttel rendelkező állatok méhbiopsztátumaiban az össz-sejtszámhoz viszonyítva százalékosan kevesebb az apoptotikus sejtek aránya.

4.3.4. *Megbeszélés*

Ellés után az involúció folyamatában a vemhes méh tömegének mintegy 90%-át elvesztve alakul vissza vemhesség előtti állapotába. Az endometrium le- és átépülésében a megnövekedett kollagenáz és proteáz enzim aktivitása, valamint a sejtek apoptózissal való pusztulása játszik szerepet. Az apoptózis előnye a nekrozissal szemben, hogy a sejtek szétesése nélkül történik meg a sejtek pusztulása, mely így nem indukál gyulladást a környezetében. Az ellés utáni időszak, a puerperium, kritikus időszak a bőtejelő tehenek számára: az állat energiaigényének fokozódása elsősorban a gyorsan növekvő tejtermelés szükségletével magyarázható, ugyanakkor a szárazanyag-felvétel nem növekszik azzal arányos mértékben, emiatt negatív energia-egyensúly (NEB) alakul ki. Ehhez adódhat még az involúció energiaigénye, amely tovább súlyosbíthatja ezt az állapotot. A méhinvolúció során lezajló folyamatok egy része, így

az apoptózis is, szintén energiaigényes folyamat. Klinikai tapasztalatok szerint, ha a NEB olyan mértéket ölt, hogy ketonanyagok halmozódnak fel a vérben, akkor egyéb egészségügyi problémákkal együtt gyakrabban lépnek fel involúciós szövődmények is.

Az involúció folyamatában fiziológiásnak tekinthető, hogy az apoptózissal elpusztult sejtek eltávolításában phagocyták vesznek részt. Az involúciós szövődményeket mutató egyedekben, ahol puerperalis metritis diagnosztizálásra került, nagymértékű fehérvérsejtes infiltráció figyelhető meg. Mind a fiziológiás, mind a patológiás mértékű beszűrődés jelentősen megnehezíti az endometrium apoptotikus sejtarányának meghatározását. A súlyos fokú puerperalis metritis-szel terhelt egyedekben a beszűrődött fehérvérsejtek oly mértékben megnövekedtek az összes sejtszámot, hogy így értékelhetetlen apoptotikus indexet adtak az adott mintára nézve.

Szükség volt tehát az endometrium sejtjeinek és a phagocytáknak az egyértelmű elkülönítésére. Ezért alkalmaztuk a valamennyi leukocyta felületén meglévő közös leukocyta antigén, vagy CD45 antigén egyidejű kimutatását. Az anti-CD45 festéssel lehetőségünk volt úgy meghatározni az adott bioptátum összes sejtszámát, hogy azok kizárólag az endometrium sejtjeit jelentsék.

A közös leukocyta antigén kimutatására azért is szükség volt, mert a szöveti struktúrák ellés utáni lebomlásakor fiziológiás mértékű helyi gyulladás mindenképpen kialakul, hiszen az apoptózissal elhalt sejtek is kemotaktikus ingert jelentenek a phagocyták számára, így azok nagy számban jelenhetnek meg a méh állományában. Az enyhe gyulladás hatására akut fázis proteinek termelődnek, amelyek egyik típusa a méh által szintetizált uterocalin. Ennek a fehérjének hatására a neutrophil-granulocytákban és más leukocytáknál apoptózis indukálódik, így akadályozva meg a túlzott mértékű lokális gyulladással kapcsolatos reakció kialakulását (Nilsen-Hamilton et al., 2003). A CD45 pozitívást mutató sejteket kizárva az apoptózis értékelésből egyértelműen csak az endometrium sejtjeit vettük figyelembe a meghatározásnál.

Immunhisztokémiai vizsgálataink során háromszoros festést alkalmaztunk: anti-CD45 festést a leukocyták kimutatására, TUNEL-reakciót az apoptózis meghatározására, valamint DAPI festést valamennyi sejtmag láthatóvá tételére.

Egy, patkányokon végzett, vizsgálat során korábban már meghatározták, hogy milyen mértékű apoptózis figyelhető meg az állatok méhében a fialás után. Ebben a kísérletben különbséget tettek az endometrium egyes sejtípusai között, és külön

vizsgálták a simaizom, illetve a fibroblast sejteket. Az apoptotikus sejthalál kimutatására a DNS fragmentációját jelző TUNEL-reakciót alkalmazták. Eredményeik szerint a simaizom sejtek 43%-a, míg a fibroblast sejtek 39%-a mutatott pozitívítást az ellés utáni 22. napon (Lepper, 1998). Saját vizsgálatunkban az endometrium valamennyi sejtípusát figyelembe vettük és az ellés utáni 4-14. napon vizsgáltuk az apoptózis mértékét ugyanezzel a módszerrel. Az általunk vizsgált energetikailag megfelelő állapotban lévő állatokban kapott $50,82 \pm 4,76\%$ -os apoptotikus index összhangban van a patkányban kapott értékekkel, hiszen abban a kísérletben 1-2 héttel későbbi időpontban vettek biopsziát az egyedek méhéből.

Egy másik kísérletben sertés endometriumában vizsgálták az apoptózis alakulását a TUNEL-módszer segítségével (Okano et al., 2007). Eredményeik szerint a fiálás utáni 13. napon vett biopsziás mintákban a sejteknek nagyjából a fele mutatott pozitív eredményt a TUNEL-próbára. A vizsgálat során a felületi hámot, illetve a kötőszövetes területeket külön-külön értékelték, de mindkét részen hasonló eredményeket kaptak. Szarvasmarhánál az általunk ismert irodalmi adatok szerint még nem végeztek hasonló vizsgálatokat, de a patkányban és a sertésben is hasonló fiziológiai folyamatok szerint zajló involúció eredményei összhangban állnak saját mintáink értékeivel. A szarvasmarha endometrium biopsziáiban a sejtek átlagosan $50,82 \pm 4,76\%$ -a mutatott apoptózist. Eszerint a fiziológias involúció során a sejtek mintegy fele apoptózissal hal el. Az elpusztult sejteket a phagocyták eltávolítják, így jóval kisebb az esélye egy jelentősebb gyulladásos reakciónak és egyéb következményes szaporodásbiológiai zavarok kialakulásának.

Azoknál az egyedeknél azonban, ahol a szervezet energia-egyensúlya tartósan meghaladta a még fiziológiásnak tekinthető hiány mértékét, a számos energiaigényes folyamat között az involúció is zavart szenved. Mivel az involúció egyik fontos eleme az energiaigényes apoptózis, ezért feltételezhetően a programozott sejthalál sem játszódhat le akadálymentesen. Feltételezéseinknek megfelelően azt az eredményt kaptuk, hogy energiaellátás zavara, vagyis ketonaemia esetén csökken az apoptózissal elpusztuló endometrium sejtek száma. Ez az érték vizsgálatainkban $23,83 \pm 6,44\%$ -nak adódott.

A vemhesség során még steril méhben az ellést követően a szülőcsatornán keresztül baktériumok telepedhetnek meg. A baktériumok jelenléte azonban nem feltétlenül jelenti gyulladásos méhbetegségek létrejöttét, hiszen egy kórfolyamat

kialakulását nagyban befolyásolja az állat immunválasza. Negatív energia-egyensúly esetén azonban gyengülnek a szervezet önvédelmi mechanizmusai, így jóval nagyobb a lehetősége annak, hogy különböző fertőzőes megbetegedések alakuljanak ki a méhben (Kulcsár et al., 2005). Ha ezzel párhuzamosan a nem megfelelő energiaellátás következtében a méhinvolúció is zavart szenved, az tovább növeli a szaporodásbiológiai problémák kockázatát.

Vizsgálataink eredményei azt mutatták, hogy az egészséges kontroll állatokhoz viszonyítva a hyperketonaemiás egyedek méhbioptátumaiban az össz-sejtszámhoz viszonyítva százalékosan kevesebb az apoptotikus sejtek aránya. Az energiaigényes apoptózis tehát tartósan fennálló és jelentős mértékű negatív energia-egyensúly kialakulásakor zavart szenved. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy NEB esetén az endometrium sejtjei kisebb arányban pusztulnak el apoptózissal, ami fokozhatja a nekrozis veszélyét és a gyulladásos folyamatok kialakulását.

A tehének megfelelő energiaellátása a puerperium időszakában tehát nemcsak az elégséges tejtermelés miatt fontos tényező, hanem a méh fiziológiásan lezajló involúciója szempontjából is. Ha ugyanis elegendő energia áll a szervezet rendelkezésére, akkor az endometrium le- és átépülése során megfelelően fel tudnak szívódni, illetve el tudnak távozni a külvilág felé az elhalt szövetek. A gyorsan és szabályosan végbemenő involúció ugyanis a legfőbb biztosíték arra, hogy a méh ne jelentsen táptalajt a baktériumok túlzott elszaporodásához, vagy esetleg patogén fajok megtelepedéséhez, vagyis a puerperalis metritis kialakulásához.

5. Új tudományos eredmények

Kísérleteimben számos HT29 sejtvonalon *in vitro* vizsgáltam a butirát hatását, egyes szabadgyökök és a ROS vegyületek keletkezését, valamint az ezek között fennálló esetleges ok-okozati összefüggést a sejtek osztódására, differenciációjára, apoptózisára és nekrozisára vonatkozólag. Vizsgáltam továbbá egy involválódó szerv, a méh, esetében *in situ* a szervezet energetikai állapotának hatását a sejtek apoptózisára.

Megállapítottam:

- (1) A butirát által indukált sejthalál és differenciáció összefüggésben van a különböző ROS mintázatokkal HT29-eredetű humán vastagbélrák sejtekben.
- (2) A HT29R sejtekben a butirát hatására képződő szabad gyökök és reaktív oxigén vegyületek a sejthalál termékei, míg a HT29-12 és HT29-21 sejtekben képződő H₂O₂ funkcionálisan a sejtdifferenciációhoz kötődik.
- (3) Meghatároztam a méh involúció korai időszakában az endometrium apoptotikus sejteinek arányát megfelelő energiaellátottságú, valamint negatív energia egyensúlyban lévő hyperketonaemiás tehenekben. Kimutattam, hogy az endometrium apoptózissal elhaló sejteinek száma a megfelelő energiaellátottságú egyedekhez képest a hyperketonaemiás tehenekben mintegy felére csökken.

6. Irodalomjegyzék

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., Akey, C. W.: Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding and activation. *Mol. Cell.*, 2002., 9., 423–432.
- Alano, C. C., Ying, W., Swanson, R. A.: Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD-depletion and mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.*, 2004., 279., 18895–18902.
- Ancarkrona, M., Dypbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, Z., Orrenius, O., Nicotera, P.: Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 1995., 15., 961-973.
- Asainz, R. M., Mayo, J. C., Reiter, R. J., Antolín, I., Esteban, M. M., Rodriguez, C.: Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus. *FASEB Journal*, 1999., 13., 1547-1556.
- Baldwin, R. L.: Use of isolated ruminal epithelial cells in the study of rumen metabolism. *J. Nutr.*, 1998., 128., 293-296.
- Batty, E., Jensen, K., Freemont, P.: PML nuclear bodies and their spatial relationships in the mammalian cell nucleus. *Front. Biosci.*, 2009., 14., 1182-1196.
- Beg, A. A., Baltimore, D.: An essential role for NF-kappa B in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, 1996., 274., 784-786.
- Bergman, F. N.: Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.*, 1990., 70., 567-590.
- Blaineau, S. V., Aouacheria, A.: BCL2DB: moving 'helix-bundled' BCL-2 family members to their database. *Apoptosis*, 2009., 7., 923-925.
- Boulares, A. H., Yakovlev, A. G., Ivanova, V., Stoica, B. A., Wang, G., Iyer, S., Smulson, M.: Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1999., 274., 22932-22940.
- Bronner-Faser, M.: Cell differentiation. *Curr. Op. Cell Biol.*, 2006., 18., 690-691.
- Burdon, R. H.: Control of cell proliferation by reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995., 18., 775-794.
- Burgess, A., Ruefli, A., Beamish, H., Warrenner, R., Saunders, N., Johnstone, R., Gabrielli, B.: Histone deacetylase inhibitors specifically kill nonproliferating tumour cells. *Oncogene*, 2004., 23., 6693-6701.

- Butt, A. J., Hague, A., Paraskeva, C.: Butyrate – but not TGF β 1 – induced apoptosis of colorectal adenoma cells is associated with increased expression of the differentiation markers E-cadherin and alkaline phosphatase. *Cell Death Diff.*, 1997., 4., 725-732.
- Cai, J., Chen, Y., Murphy, T. J., Jones, D. P., Sartorelli, A.C.: Role of caspase activation in butyrate-induced terminal differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004., 424., 119-127.
- Cande, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., Kroemer, G.: Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*, 2002., 84., 215-222.
- Carethers, J. M.: Cell checkpoints and enterocyte differentiation: a recipe for sequential stages Focus on "Caco-2 intestinal cell differentiation is associated with G₁ arrest and suppression of CDK2 and CDK4". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 1998., 275., 1191-C1192.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 1979., 59., 527-606.
- Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S.: Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000., 29., 323-333.
- Chen, G., Goeddel, D. V.: TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 2002., 296., 5573.
- Chiarugi, A.: "Simple but not simpler": toward a unified picture of energy requirements in cell death. *FASEB J.*, 2005., 19., 1783–1788.
- Chou, J. Y., Takahashi, S.: Control of placental alkaline phosphatase gene expression in HeLa cells: induction of synthesis by prednisolone and sodium butyrate. *Biochemistry*, 1987., 26., 3596-3602.
- Cidlowski, J. A., King, K. L., Evans-Storms, R. B., Montague, J. W., Bortner, C. D., Hughes Jr, F. M.: The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system. *Rec. Progr. Horm. Res.*, 1996., 51., 457–491.
- Cipriani, G., Rapizzi, E., Vannacci, A., Rizzuto, R., Moroni, F. and Chiarugi, A.: Nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-1 rapidly triggers mitochondrial dysfunction. *J. Biol. Chem.*, 2005., 280., 17227–17234.

- Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., Olson, M. F.: Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biol.*, 2001., 4., 339-345.
- Comalada, M., Bailón, E., de Haro, O., Lara-Villoslada, F., Xaus, J., Zazuelo, A., Gálvez, J.: The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial cell proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2006., 132., 487-497.
- Cregan, S. P., Dawson, V. L., Slack, R. S.: Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent apoptosis. *Oncogene*, 2004., 23., 2785-2796.
- Cuisset, L., Tichonicky, L., Jaffray, P., Delpech, M.: The effects of sodium butyrate on transcription are mediated through activation of a protein phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 1997., 272., 24148-24153.
- Csordas A.: Toxicology of butyrate and short-chain fatty acids. In: Hill, M. J. (Ed.), *Role of gut bacteria in human toxicology and pharmacology*, Taylor and Francis, London, 1995. pp. 105-127.
- Dejean, L. M., Martinez-Caballero, S., Manon, S., Kinnally, K. W.: Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006., 1762., 191–201.
- de Murcia, G., Menissier de Murcia, J.: Poly(ADP-ribose) Polymerase: a Molecular Nick-Sensor. *Trends Biochem. Sci.*, 1994., 19., 172-176.
- Dröge, W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 2002., 82., 47-95.
- Eguchi, Y., Srinivasan, A., Tomaselli, K. J., Shimizu, S., Tsujimoto, Y.: ATP-dependent steps in apoptotic signal transduction. *Cancer Res.*, 1999., 59., 2174–2181.
- Emoto, K., Toyama–Sorimachi, N., Karasuyama, H., Inoue, K., Umeda, M.: Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.*, 1997., 232., 430-434.
- Ferrari, D., Stepzynska, A., Los, M., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K.: Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation. *J. Exp. Med.*, 1998., 188., 979-984.

- Finkel, T., Holbrook, N.: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000., 408., 239-247.
- Fogh, J., Trempe, G.: *Human tumor cells in vitro*. Plenum Press, New York, 1975., 115-141
- Fink, S. L., Cookson, B.T.: Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.*, 2005., 74., 1907-1916.
- Frankfurt, O. S., Robb, J. A., Sugarbaker, E. V., Villa, L.: Monoclonal antibody to a single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 1996., 226., 387-397.
- Galfi P., Gäbel, G., Vogler, S., Martens, H.: Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von Epithelzellen des Pansens. *Deutsche veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.*, 10 Jahrestagung der Fachgruppe Physiologie und Biochemie, Gießen, 1992. Március 13-14.
- Galfi P., Neogrady S.: The pH-dependent inhibitory action of n-butyrate on gastrointestinal epithelial cell division. *Food Res. Internat.*, 2001., 34., 581-586.
- Galfi P., Neogrady S., Csordas A.: Apoptosis sensitivity is not correlated with sensitivity to proliferation inhibition by the histone deacetylase inhibitors butyrate and TSA. *Cancer Lett.*, 2002., 188., 141-152.
- Galfi P., Neogrady Zs., Amberger, A., Margreiter, R., Csordas A.: Sensitization of colon cancer cell lines to butyrate-mediated proliferation inhibition by combined application of indomethacin and nordihydroguaiaretic acid. *Cancer Det. Prev.*, 2005., 29., 276-285.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 1992., 119., 493-501.
- Giardina, M. S.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, short-chain fatty acids, and reactive oxygen metabolism in human colorectal cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998., 1401., 277-288.
- Galluzzi, L., Kroemer, G.: Necroptosis: A specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 2008., 135., 1161-1163.
- Gozuacik, D., Kimchi, A.: Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogen*, 2004., 23., 2891–2906.

- Grant, P. A.: A tale of histone modifications. *Genome Biol.*, 2001., 2., 31-36.
- Grant, P. A., Workman, J. L.: Transcription: A lesson in sharing? *Nature*, 1998., 396., 410-411.
- Ha, H. C., Solomon H. S.: Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1999., 96., 13978-13982.
- Häcker, G.: The morphology of apoptosis. *Cell and tissue research*, Springer Verlag, Berlin, 2000.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., Oxford University Press, 2008.
- Hancock, J. T., Desikan, R., Neill S. J.: Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.*, 2001., 29., Part 2. 345-350.
- Hojjman, E., Viegas, L. R., Sarmiento, M. I. K., Rosenstein, R. E., Pecci, A.: Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. *Endocrinology*, 2004., 145., 418-425.
- Holmgren, A.: Thioredoxin reductase. In: Motagner, L. (Ed.): *Oxidative stress in cancer, AIDS and neuroregeneration diseases*. Marcel Dekker, New York, 1998. pp. 256-267.
- Hu, Y., Benedict, M. A., Ding, L., Nunez, G.: Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.*, 1999., 18., 3586-3595.
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., Porter, A. G.: Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1998., 273., 9357-9360.
- Kameji, M., Obinata, Y., Natori, Y., Ikawa, J.: Induction of globin gene expression in cultured erythroleukemia cells by butyric acid. *J. Biochem.*, 1977., 81., 1901-1910.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 1972., 26., 239-257.
- Kirlin, W. G., Thomson, S. A., Kavanagh, T. J., Jones, D. P.: Glutathione redox potential in response to differentiation and enzymes inducers, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999., 27., 1208-1218.

- Koester, S. K., Roth, P., Mikulka, W. R., Schlossman, S. F., Zhang, C., Bolton, W. E.: Monitoring early cellular responses in apoptosis is aided by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7. *Cytometry*, 1997., 29., 306-312.
- Kosower, N., Song, K., Kosower, E., Correa, W.: Glutathione II. Chemical aspects of azoester procedure for oxidation to disulfide. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969., 192., 8-14.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Koths, K., Kwiatkowski, D. J., Williams, L. T.: Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, 1997., 278., 294-298.
- Kristensen, N. B., Hansen, O., Clausen, T.: Measurement of the total concentration of functional Na⁺, K⁺-pumps in rumen epithelium. *Acta Physiol. Scand.*, 1995., 155., 67-76.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G.: Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.*, 2009., 16., 3–11.
- Kruh J., Defer L., Tichonicky L.: Effects of butyrate on cell proliferation and gene expression. In: J.H. Cummings, J.L. Rombeau, T. Sakata (Eds.) *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids*, Cambridge University Press, Cambridge, 1995., 275-288.
- Kulcsár M., Kátai L., Balogh O., Pécsi A., Dalevaud C., Földi J., Hirvonen, J., Faigl V., Chilliard, Y., Huszenicza Gy.: Metabolic and endocrine changes, inflammatory proteins and ovarian activity in dairy cows with acute puerperal metritis. *Reprod. Dom. Anim.*, 2005., 40., 407.
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S., Nicotera, P.: Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.*, 1997., 185., 1481–1486.

- Leppert, P. C.: Proliferation and apoptosis of fibroblasts and smooth muscle cells in rat uterine cervix throughout gestation and the effect of the antiprogestosterone onapristone. *Am. J. Obst. Gynecol.*, 1998., 178., 713-725.
- Lesuffleur, T., Violette, S., Vasile-Pandrea, I., Dussaulx, E., Barbat, A., Muleris, M., Zweibaum, A.: Resistance to high concentrations of methotrexate and 5-fluorouracil of differentiated HT-29 colon-cancer cells is restricted to cells of enterocytic phenotype. *Int. J. Cancer*, 1998., 76., 383-392.
- Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X.: Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 2001., 412., 95-99.
- Li, P., Nijhawan, D., Budinhardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X.: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997., 91., 479-489.
- Lindemann, R. K., Gabrielli, B., Johnstone, R. W.: Histone-deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Cell Cycle*, 2004., 3., 779-788.
- Lippens, S., Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., Declercq, W.: Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ.*, 2005., Suppl. 2., 1497-1508.
- Liu, J.-J., Huang, B. H., Zhang, J., Carson, D. D., Hooi, S. C.: Repression of HIP/RPL29 expression induces differentiation in colon cancer cells. *J. Cell. Physiol.*, 2006., 207., 287-292.
- Liu X., Kim N., Jang J., Jemmerson R., Wang X.: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 1996., 86., 147-157.
- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T., Wang, X.: The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1998., 95., 8461-8466.
- Liu, X., Zou, H., Jemmerson, R., Liu, J., Hausauer, D., Kong-Peng, L., Mondino, A., Nelson, R. D.: A conformational change in cytochrome c of apoptotic and necrotic cells is detected by monoclonal antibody binding and mimicked by association of the native antigen with synthetic phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 1999., 38., 3599-3609.

- Majno, G., Joris, I.: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 1995., 146., 3-15.
- Mannervik, B.: The enzymes of glutathione metabolism: an overview. *Biochem. Soc. Trans.*, 1987., 15., 717–718.
- Mills, J. C., Nelson, D., Erecinska, M., Pittman, R. N.: Metabolic and energetic changes during apoptosis in neural cells. *J. Neurochem.*, 1995., 65., 1721-1730.
- Mizushima, N., Kuma, A.: Autophagosomes in GFP-LC3 Transgenic Mice. *Meth. Mol. Biol.*, 2008., 445., 119-124.
- Moreira, J. M. A., Scheipers, P., Sørensen, P.: The histone deacetylase inhibitor trichostatin A modulates CD4+ T cell responses. *BMC Cancer*, 2003., 3., 30.
- Noda, T., Suzuki, K., Ohsumi, Y.: Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol.*, 2002., 12., 231–235.
- Negoescu, A., Lorimier, P., Labat–Moleur, F., Drouet, C., Robert, C., Guillermet, C., Brambilla, C., Brambilla, E.: In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J. Histochem. Cytochem.*, 1996., 44., 959-968.
- Negoescu, A.: TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J. Histochem. Cytochem.*, 1998., 46., 327-334.
- Németh E., Halász A., Baráth A., Domokos M., Gálfi P.: Effect of hydrogen peroxide on interleukin-8 synthesis and death of Caco-2 cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2007., 29., 297-310.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., Riccardi, C.: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 1991., 139., 271-279.
- Nicotera, P., Melino, G.: Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, 2004., 23., 2757–2765.
- Nilsen-Hamilton, M., Liu, Q., Ryan, J., Bendickson, L., Lepont, P., Chang, Q.: Tissue involution and acute phase response. *Ann. New York Acad. Sci.*, 2003., 995., 94-108.
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England G. C.: *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, W.B. Saunders, London, 2001., pp. 189-192.

- Okano, A., Ogawa, H., Takahashi, H., Geshi, M.: Apoptosis in the porcine uterine endometrium during the estrous cycle, early pregnancy and post partum. *J. Reprod. Develop.*, 2007., 53., 923-930.
- Orchel, A., Dzierżewicz, Z., Parfiniewicz, B., Węglarz, L., Wilczok, T.: Butyrate-induced differentiation of colon cancer cells is PKC and JNK dependent. *Dig. Dis. Sci.*, 2005., 50., 490-498.
- Pervaiz, S., Clement, M. V.: Superoxid anion: oncogenic reactive oxygen species? *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007., 39., 1297-1304.
- Qiao, L., Hanif, R., Sphicas, S. J., Shiff, B., Rigas, B.: Effect of aspirin on induction of apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, 1998., 55., 53-64.
- Riggs, M. G., Whittaker, R. G., Neuman, J. R., Ingram, V. M.: Modified histones in HeLa and Friend erythroleukemia cells treated with n-butyrate. *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.*, 1977., 42., 815-818.
- Rosato, R. R., Almenara, J. J., Grant, S.: The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21 CIP1/WAF1. *Cancer Res.*, 2003., 63., 3637-3645.
- Roth, S. Y., Denu, J. M., Allis, C. D.: Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, 2001., 70., 81-120.
- Ruefli, A. A., Ausserlechner, M. J., Bernhard, D., Sutton, V. R., Lampton, K. M., Kofler, R., Smyth, M. J., Johnstone, R. W.: The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001., 98., 10833-10838.
- Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R., Alnemri, E. S.: Cytochrome c and dATP-mediated oligomerisation of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J. Biol. Chem.*, 1997., 274., 17941-17945.
- Sarma, B.K., Mugesh, G.: Thiol cofactors for selenoenzymes and their synthetic mimics. *Org. Biomol. Chem.*, 2008., 6., 965-974.
- Scheppach, W.: Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*, 1994., 35., 35-38.

- Schuler, M., Green, D. R.: Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.*, 2001., 29., 684–688.
- Scovassi, I. A., Diederich, M.: Modulation of poly(ADP-ribosilation) in apoptotic cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2004., 68., 1041-1047.
- Sedlak, J., Lindsay, R.: Estimation of total-protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, 1968., 25., 191-205.
- Shao, L. Y., Gao, Z., Marks, P. A., Jiang, X.: Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2004., 101., 18030-18035.
- Shulyakowskaya, T., Sümegi L., Gál D.: In vivo experimental studies on the role of free radicals in photodynamic therapy. I. Measurement of the steady state concentration of free radicals in tumor tissues of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993., 195., 581-587.
- Slaughter, C., Wang, X.: DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 1997., 89., 175-184.
- Srinivasan, A., Roth, K. A., Sayers, R. O., Shindler, K. S., Wong, A. M., Fritz, L. C., Tomaselli, K. J.: In situ immunodetection of activated caspase-3 in apoptotic neurons in the developing nervous system. *Cell Death Differ.*, 1998., 5., 1004-1016.
- Storková, J., Slonková, E., Sovová, V., Kucerová, D., Zíla, V., Turecková, J., Vojtechová, M., Korb, J., Tuhácková, Z.: Characterization of four clones derived from human adenocarcinoma cell line, HT29, and analysis of their response to sodium butyrate. *Int. J. Oncol.*, 2006., 28., 559-565.
- Suzuki, Y. J., Forman, H. J., Sevanian, A.: Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.*, 1997., 22., 269-285.
- Takamoto, N., Leppert, P. C., Yu, S. Y.: Cell death and proliferation and its relation to collagen degradation in uterine involution of rat. *Connect. Tissue Res.*, 1998., 37., 163-175.
- Temkin, V., Huang, Q., Liu, H., Osada, H., Pope, R. M.: Inhibition of ADP/ATP Exchange in Receptor-Interacting Protein-Mediated Necrosis. *Mol. Cell. Biol.*, 2006., 26., 2215-2225

- Thompson, C. B.: Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*, 1997., 91., 627-637.
- Ungerstedt, J. S., Sowa, Y., Xu, W.-S., Shao, Y., Dokmanovic, M., Perez, G., Ngo, L., Holmgren, A., Jiang, X., Marks, P. A.: Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2005., 102., 673-678.
- Valentijn, A. J., Zouq, N., Gilmore, A. P.: Anoikis. *Biochem. Soc. Trans.*, 2004., 32., 421-425.
- van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., Reutelingsperger, C. P.: Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 1998., 31., 1-9.
- van Loo, G., Saelens, X., van Gurp, M., MacFarlane, M., Martin, S. J., Vandenabeele, P.: The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ.*, 2002., 9., 1031-1042.
- Vaux, D. L, Cory, S., Adams, J. M.: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 1988., 335., 440-442.
- Velcich, A., Palumbo, L., Jarry, A., Laboisse, A., Racevskis, J., Augenlicht, L.: Patterns of expression of lineage-specific markers during the in vitro-induced differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ.*, 1995., 6., 749-757.
- Vogt, C.: Untersuchungen über die Entwicklungsbiologie der Geburtshelferkröte. In: *Alytes obstetricians*, Jent und Gassman, Solothurn, 1842.
- Waldeck, W., Mueller, G., Wiessler, M., Brom, M., Tóth K., Braun, K.: Autofluorescent proteins as photosensitizer in eukaryotes. *Int. J. Med. Sci.*, 2009., 6., 365-373.
- Wajant, H.: The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 2002., 296., 5573.
- Willingham, M. C.: Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.*, 1999., 47., 1101-1110.

- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Currie, A. R.: Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 1980., 68., 251-306.
- Wyllie, A. H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 1980., 284., 555-556.
- Yang, F., Sun, X., Beech, W., Teter, B., Wu, S., Sigel, J., Vinters, H. V., Frautschy, S. A., Cole, G. M.: Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, 1998., 152., 379-389.
- Yasuhara, N., Eguchi, Y., Tachibana, T., Imamoto, N., Yoneda, Y., Tsujimoto, Y.: Essential role of active nuclear transport in apoptosis. *Genes Cells*, 1997., 2., 55-64.
- Yamamoto, K., Kushima, R., Kisaki, O., Fujiyama, Y., Okabe, H.: Combined effect of hydrogen peroxide-induced oxidative stress and IL-1 β on IL-8 production in Caco-2 cells (a human colon carcinoma cell line) and normal intestinal epithelial cells. *Inflamm.*, 2003., 27., 123-128.
- Youngquist, R. S., Threlfall, W. R.: *Current therapy in large animal theriogenology*, 2nd edition, Saunders Elsevier, St. Louis, 2007.
- Yu, S. W., Poitras, M. F., Coombs, C., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Poirier, G. G., Dawson, T. M., Dawson, V. L.: Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, 2002., 297., 259–263.
- Zamareva, M. V., Sabirov, R. Z., Maeno, E., Ando-Akatsuka, Y., Bessonova, S. V., Okada, Y.: Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death Diff.*, 2005., 12., 1390-1397.
- Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R., Yan, G.: Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques*, 1997., 23., 525-531.
- Zmijewski, J. W., Landar, A., Watanabe, N., Dickinson, D.A., Noguchi, N., Darley-Usmar, V. M.: Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem. Soc. Trans.*, 2005., 33., 1385–1389

7. Saját publikációk

7.1. Referált hazai vagy külföldön kiadott tudományos folyóiratokban megjelent (vagy közlésre elfogadott) publikációk

Domokos M., Jakus J., Szeker K., Csizinszky R., Csikó Gy., Neogrady Zs., Csordás Á., Gálfi P.: Butyrate-induced cell death and differentiation are associated with distinct patterns of ROS in HT29-derived human colon cancer cells. *Digestive diseases and sciences*, 2010., 55., 920-930.

Domokos M., Igyártó B., Mátis G., Pécsi A., Földi J., Kulcsár M., Huszenicza Gy. Neogrady Zs., Gálfi P.: Az endometrium apoptotikus sejt arányának csökkenése hyperketonaemiás teheneekben az involúció korai időszakában. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2010. Közésre elfogadva.

Domokos M., Igyártó B., Pécsi A., Földi J., Kulcsár M., Neogrady Zs., Huszenicza Gy.: Detection of apoptosis in bovine endometrium during early period of involution. *Reproduction of domestic animals*, 2008., 3., 153.

Gálfi P., Jakus J., Domokos M., Neogrady Zs., Csordás Á.: A butiráttal szemben kialakuló konfluencia dependens rezisztenciát HT29 colorectalis adenocarcinoma sejteknél a redox státusz megváltozása okozza. *Folia hepatologica*, 2007., 11., 16.

Németh E., Halász A., Baráth A., Domokos M., Gálfi P.: Effect of hydrogen peroxide on interleukin-8 synthesis and death of Caco-2 cells. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 2007., 29., 297-310.

7.2. Kongresszusi kiadványokban megjelent előadás vagy poszter összefoglalók

Domokos M., Igyártó B., Pécsi A., Földi J., Kulcsár M., Huszenicza Gy., Neogrady Zs., Gálfi P.: Detection of apoptosis in bovine endometrium during early period of involution. In: *16th International Congress of Animal Reproduction*, ICAR 2008. Budapest, Magyarország

- Domokos M., Ígyártó B., Pécsi A., Földi J., Kulcsár M., Huszenicza Gy., Neogrády Zs., Gálfi P.: Az endometrium apoptotízisos sejtjeinek és leukocytáknak az előfordulása az involúció korai időszakában az energiaellátás függvényében. Akadémiai beszámolók 2008. Budapest.
- Domokos M., , Neogrády Zs., Jakus J., Csordás Á., Gálfi P.: A Poli ADP-ribóz-polimeráz (PARP) szerepe az apoptózis/nekrózis arány alakulásában. Akadémiai beszámolók 2008. Budapest.
- Domokos M., Ígyártó B., Pécsi A., Földi J., Kulcsár M., Huszenicza Gy., Neogrády Zs., Gálfi P.: Az endometrium apoptotízisos sejtjeinek aránya az involúció korai időszakában normo- és hyperketonaemiás tehenekben. In: *18. Magyar Buiatrikus Kongresszus összefoglalója*, Siófok, Magyarország, 2007.Október 10.
- Domokos M., Jakus J., Neogrády Zs., Molnár T. ,Gálfi P.: A PARP szerepe a butirát kiváltotta sejthalál mechanizmusokban. Akadémiai beszámolók 2007. Budapest.
- Domokos M., Rimanóczy Á., Neogrády Zs., Mihalik R., Csordás Á., Amberger, A., Gálfi P.: Colorectális adenocarcinoma sejtvonalak differenciálódása. Akadémiai beszámolók 2006., Budapest.
- Szekér K., Csizinszky R., Domokos M., Neogrády Zs., Szabó B., Jakus J., Csordás Á., Gálfi P.: Drug specific changes of sensitivity to proliferation inhibition at confluence by the phytostilben resveratrol and other polyphenols in human colon cancer cells. In: *18th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Seefeld, Ausztria, 2008. Szeptember 18-21.
- Huszenicza Gy., Földi J., Pécsi A., Szabó J., Domokos M., Gálfi P., Kulcsár M.: Bacterial complications of uterine involution in cattle: clinical pathology, prevention, therapy. In: Früll, M. (Ed.) *Proceedings of the 13th International Conference on Production Diseases in Farm Animals*, 408-427., Lipcse, Németország, 2007. Június 29-Augusztus 4.

Huszenicza Gy., Földi J., Pécsi A., Domokos M., Szabó J., Kulcsár M., Gálfi P.:
Complicaciones bacterianas de la involución uterina en vacas de leche.
(Bacterial complications of uterine involution in dairy cows; translated from
English) In: Cavestani D (Ed.) *Proceedings of the XXXVth Uruguayan Buiatrics
Congress*, Paysandú, Uruguay, 2007. Június 7-11.

Gálfi P., Jakus J., Domokos M., Neogrády Zs., Csordás Á.: A butiráttal szemben
kialakuló konfluencia dependens rezisztenciát HT29 colorectalis
adenocarcinoma sejteknél a redox státusz megváltozása okozza. Abstract. In:
Magyar Szabad gyök Kutató Társaság IV. Kongresszusa, Pécs, 2007. Október
11-13.

Csordás Á., Gálfi P., Jakus J., Molnár T., Domokos M., Neogrády Zs.: Synergistic
effects of resveratrol on cell death induction by the histone deacetylase
inhibitors butyrate and trichostatin A in HT29-derived colon cancer cells. In:
Congress of Life Sciences. Salzburg, Ausztria, 2006. Szeptember 25-27.

8. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Gálfi Péternek, hogy lehetővé tette a témába való bekapcsolódásomat és az évekig tartó közös munka során sohasem hagyta lankadni figyelmemet. Köszönöm a segítséget és támogatást, amit munkám során nyújtott számomra.

Köszönet illeti Dr. Neogrády Zsuzsanna és Dr. Jakus Judit témabizottsági tagokat, a sokoldalú támogatásukért.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem I. sz. Pathológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetből Dr. Mihalik Rudolf és Dr. Imre Gergely FACS analízisben nyújtott közreműködését, Dr. Csordás Ádám az Innsbrucki Orvostudományi Egyetem munkatársának segítségét, és a sejttenyészeteken végzett feladatok kiértékelésében nyújtott támogatását.

Köszönöm a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Főigazgatóságán Dr. Glávits Róbertnek és Mészáros Ágnesnek a szövettani munkákban nyújtott segítségét, valamint a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet munkatársának, Ígyártó Botondnak a nélkülözhetetlen támogatását.

Szeretném még megköszönni a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karán az Élettani és Biokémiai Tanszék valamennyi munkatársának, hogy támogatták munkámat, különös tekintettel Dr. Veresegyházy Tamás osztályvezető docens úrnak a lelkesítő támogatását.

És a legfontosabbakat hátrahagyva végül férjemnek, családomnak és barátaimnak megköszönöm azt, hogy a legnehezebb pillanatokban is mellettem álltak.