

**A DOHÁNYZÁS OKOZTA DNS KÁROSODÁSOK ÉS
JAVÍTÁSUK VIZSGÁLATA EMBERI CUMULUS ÉS
GRANULOSA SEJTEKBEN**

Sinkó Ildikó

PH.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Témavezető: Dr. Raskó István

Az értekezés a Szegedi Tudományegyetem **Molekuláris és sejtbiológia Ph.D. programjának** keretében készült, a MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetének Humán Molekuláris Genetikai csoportjában.

2005

Szeged

Bevezető

A civilizáció fejlődésével az emberi genom egyre több új környezeti hatásnak van kitéve (élelmiszer adalékanyagok, növényvédő szerek, új kémiai anyagok, kipufogógázok stb.). A dohányzás az egyik legelterjedtebb károsító forrás, amelynek következtében kémiai anyagok komplex keveréke jut a szervezetbe, számos módosulást okozva a biológiai fontos makromolekulákban. A cigaretta füstjében és a kátrányban nagy mennyiségben található reaktív oxigén származékok (ROS) és egyéb olyan molekulák, amelyek a DNS-sel kémiai reakcióba lépve a bázisok módosítása (oxidáció, dezamináció, metiláció stb.) révén a genetikai információ elvesztését, megváltozását okozhatják (Halliwell és Gutteridge 1999). A ROS fajták a sejtekben más molekulákkal reagálva újabb elektronokat képesek befogni és így szabadgyök-képző láncreakciókat indukálhatnak, amelyek a gyökképződés helyétől távol is képesek károsodást okozni. A ROS és a sejtek védelmi mechanizmusainak (enzimatis és nem enzimatis antioxidánsok, reparációs rendszerek) egyensúlyi állapotának felborulása oxidatív stresszt eredményez. A károsodások következtében létrejövő mutációk az anyagcsere-folyamatok megváltozását, daganatok kialakulását, a sejtek pusztulását okozhatják. A cigarettában található anyagok komplex hatása gyakorlatilag a DNS károsodások minden típusát okozhatja, javításukban az összes reparációs mechanizmus szerepet játszik (DeMarini 2004, Christmann és mtsai 2003).

A dohányzás jól ismert, általános egészséget károsító hatásain kívül jelentős befolyással van a humán reprodukció szinte valamennyi területére (Schiverick és Kalifa 1999). A női reprodukcióban kiemelkedő fontosságú a normális fejlődési potenciállal rendelkező petesejtek termelése, illetve a megfelelő hormonális háttér kialakítása. Ezekben a folyamatokban a tüszőkben található szomatikus sejtek lényeges funkciót vállalnak (Kidder 2002, Vanderhyden 2002). Disszertációmban a petesejtek fejlődésében jelentős szerepet betöltő cumulus és granulosa sejteket érintő dohányzással összefüggésbe hozható DNS károsodások *in vitro* és *in vivo* vizsgálatával kapcsolatos munkánkat foglalom össze.

Célkitűzések

Számos közlemény igazolja a dohányzás direkt szerepét a DNS károsodások kialakulásában és a reprodukcióban. Az oxidatív stressz női reprodukcióban betöltött szerepét

néhány folyamatban már kimutatták, azonban a károsító hatás tényleges molekuláris mechanizmusairól még viszonylag keveset tudunk.

Az emberi petesejtek vizsgálata *in vitro* fertilizációs (IVF) kezelésben részt vevő asszonyok sejtjein történhet. Kísérleti célra csak a kezelés után fennmaradó, meg nem termékenyült illetve kóros petesejtek használatát engedélyezhetik, azonban ezek a sejtek már jó eséllyel tartalmaznak valamilyen károsodást. Fejlődő tüszőkben a petesejtek a cumulus és granulosa sejtekkel vannak körülvéve, amelyek „jóléte” nagyon fontos a petesejtek normális fejlődéséhez. Mindkét sejtcsoport az IVF kezelés „melléktermékeként” izolálható, ezért felhasználhatók a reprodukcióban szerepet játszó toxikus hatások vizsgálatára.

Mindezek alapján vizsgálni kívántuk:

- az IVF során izolált granulosa sejtekből készített sejtenyészetben cigarettafüst (CFE) és cigarettakátrány extraktum (CKE) hatására a sejtekben termelődő reaktív származékokat és párhuzamosan a DNS károsodások mértékét ESR-rel illetve Comet assay-vel,
- *in vitro* granulosa sejtenyészetben a cigarettafüst és cigarettakátrány extraktum okozta oxidatív DNS károsodások javító folyamatait,
- a dohányzás *in vivo* DNS károsító hatását emberi cumulus sejtekre és az IVF sikerességére,
- a dohányzás következtében kialakult metilált bázisok javításában szerepet játszó alkiltranszferáz enzim aktivitását.

Eredmények és következtetések

A ROS közvetlen kimutatására a párosítatlan elektront tartalmazó gyökök esetében az ESR spektroszkópia nyújt lehetőséget (Halliwell és Gutteridge 1999). A dohányzás következtében létrejövő DNS károsodások vizsgálatára az ún. egy sejt gélelektroforézis vagy comet assay gyakran alkalmazott, olcsó, gyors és egyszerű módszer (Moller és mtsai 2000). A módszert az oxidatív DNS károsodásokra specifikus endonukleázokkal kiegészítve alkalmaztuk a DNS reparációs kísérleteinkben. Az Fpg enzim az oxidált purinokat, az EndoIII enzim pedig az oxidált pirimidineket ismeri fel.

1. A CFE-vel 2 és 4 órán keresztül kezelt granulosa sejtek esetében a mérés során felhalmozódott DMPO-gyök adduktok ESR abszorpciós spektruma a hidroxil gyökökre

volt jellemző. A mért DMPO-OH adduktok a kezelés időtartamától függően egyre több reaktív $\cdot\text{OH}$ gyök termelődését jelzik, azonban kevésbé karakterisztikus, DMPO-val szintén reagáló egyéb gyökökre utaló szignálok is kimutathatók. A CFE kezelés következtében comet assay-vel az egyes szálú DNS törések mennyiségében szignifikáns mértékű növekedést mutattunk ki. A sejtekben gyakorlatilag nem találtunk eltérést az egyes szálú DNS törések mértékében a kezelés idejének függvényében.

2. A CKE-vel 2 és 4 órán keresztül kezelt granulosa sejtek esetében ESR-rel a kezelés idejének függvényében szintén egyre több $\cdot\text{OH}$ gyök termelődésére utaló DMPO-OH addukt mutatható ki. Az ESR görbe jellege több reaktív gyök komplex jelenlétére utal. Comet assay-ben a CFE kezelésnél mért értéknél szignifikánsan több DNS károsodást mutattunk ki. A 4 órás CKE kezelés a 2 óráshoz képest szignifikánsan több egyes szálú DNS törést okozott a granulosa sejtekben.
3. Összehasonlítottuk a CFE és CKE kezelés hatására kialakuló egyes szálú törések és oxidatív bázismódosulások reparációs képességét granulosa sejtekben. Kettő és négy óra CFE kezelés a kezdeti időpontban jelentős mértékű károsodást okozott, mind a száltörések, mind oxidatív károsodások tekintetében a kezeletlen kontrollhoz képest. A sejtekben mért comet csóva DNS-ek aránya egy óra elteltével a kezdeti stádiumhoz képest majdnem duplájára növekedett. A bázis excíziós hibajavító folyamatok kezdeti lépéseiben szerepet játszó glikozilázok elkezdik a DNS hasítását az oxidált bázisoknál, amit a comet assay újabb száltörésekként mutat ki. A DNS károsodások mértéke 4 óra elteltével a 2 órás CFE kezelésnél a kezdeti időpontban mért szintre esik vissza, azonban 4 óra CFE kezelés esetében a száltörések és az oxidált purin és pirimidin bázisok mennyisége tovább növekszik. Minden esetben az oxidált purinokat mutattuk ki legnagyobb arányban. Kettő és négy óra CKE kezelés hatására a mért DNS károsodások az idő függvényében egyre növekednek, szintén az oxidált purinok legmagasabb előfordulásával. A sejtek fluoreszcens mikroszkópban vizsgált képe súlyosan, apoptotikusnak is nevezhető mértékben töredezett DNS jelenlétét mutatja. Ez azt jelenti, hogy a cigarettakátrányban található anyagok által okozott károsodások javítását a sejt valószínűleg már nem képes kijavítani.
4. Rövidebb CFE kezelési (30 perc, 1 és 2 óra) és hosszabb reparációs időket (0, 4, 12, 24 óra) alkalmazva a comet assay kísérletek a granulosa sejtek esetében azt mutatták, hogy a kezelési idő függvényében a kezdeti időpontban mért DNS károsodás mértéke egyre növekszik. A reparációs idő függvényében a károsodások javítása a rövidebb (30 perc) kezelési idő esetében a legjelentősebb, de a megmaradó károsodások szintje nem csökken

a kezeletlen kontroll szintjére. Hosszabb kezelési idők (1 és 2 óra) alkalmazásával a hibajavítás kinetikája nagyjából hasonló, a javítás lassú és a javítatlanul maradó károsodások szintje 24 óra múltán is viszonylag magas szinten marad.

Kísérletünkben az oxidált purinokat mutattuk ki a legnagyobb arányban. A rövid (30 perc) CFE kezelés után az oxidált purin és pirimidin bázisok javítása hasonló gyorsasággal történik. Hosszabb kezelési idők (1 és 2 óra) esetében az oxidált purinok reparációja történt meg a leglassabban.

5. A granulosa sejtekben kísérleteinkben tapasztalt csökkent reparációs aktivitás összhangban van a véglegesen differenciált sejteknél sejt differenciációval kapcsolatosan megfigyelt gátolt DNS javító mechanizmusok jelenlétével (Nospikel és Hanawalt 2002). Tekintettel arra, hogy a granulosa sejtek az ovuláció során zajló hormonális változások hatására differenciálódnak és a sárgatest progeszteron termeléséért lesznek felelősek, a genomban maradó számos javítatlan károsodás következtében a granulosa sejtek progeszteron termelése csökkenhet, vagy teljesen megszűnhet. Ezt alátámasztja Gocze és munkatársainak vizsgálata, amelyben kimutatták, hogy a cigaretta füstjében található alkaloidok gátolják a progeszteron szintézist (Gocze és Freeman 2000). Ezek a hatások részben magyarázhatják a dohányosoknál gyakran előforduló korai vetéléseket, hiszen a sárgatest megfelelő szintű progeszteron termelése kritikus a méh beágyazódásra való felkészítésében.
6. A dohányzás *in vivo* DNS károsító hatását dohányzó és nem dohányzó asszonyoktól származó cumulus sejtekben vizsgáltuk comet assay-vel. A dohányzás szignifikáns növekedést okozott az egyes szálú DNS törések mennyiségében. Ez az eltérés megmaradt indukált oxidatív stressz (100 μ M H₂O₂ kezelés) hatására is. Azonban úgy tűnik, hogy a dohányosok cumulus sejtjei nem fizikailag érzékenyebbek az oxidatív stresszre, hanem a fennálló szignifikáns különbség a dohányzás miatt permanensen jelen van.
7. Annak ellenére, hogy a visszaültetett szedercsíra állapotú és legjobb minőségű préembriók százalékos megoszlása magasabb volt a dohányzók csoportjában, a terhességi ráta ezeknél az asszonyoknál szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult. A dohányosoknál fertilitásban szerepet játszó egyéb paraméterek tekintetében szignifikáns növekedést csak az FSH szintben tapasztaltunk.
8. A dohányzás következtében kialakuló metilált bázismódosulásokat javító alkiltranszferáz enzim eltérő szintű aktivitását mértük cumulus és granulosa sejtekben, ami jelzi a cumulus

és granulosa sejtek eltérő hibajavítási képességét a fejlődő tüszőn belül, amely biológiai funkciójukkal hozható összefüggésbe.

Vizsgálatunk során a dohányosok granulosa sejtjeiben az irodalmi adatokhoz hasonló mértékű szignifikáns aktivitás növekedést mértünk (Drin és mtsai 1994, Slupphaug és mtsai 1992), ami az enzimaktivitás indukálhatóságát jelzi genotoxikus stressz hatására.

Vizsgálataink szerint a kezelés időtartamának növekedésével tapasztalt egyre nagyobb mennyiségben megmaradó DNS károsodás magyarázatul szolgálhat az egész életükben dohányzóknál gyakrabban előforduló daganatos megbetegedésekre. Hosszú távon javíthatatlanul maradt károsodások felhalmozódhatnak, ami komoly következményekkel járhat, különösen az erős dohányosoknál. A granulosa és cumulus sejtek csökkent reparációs aktivitása magyarázatul szolgálhat arra, hogy vizsgálatunkban a dohányosok IVF kezelése során a nem dohányzókéhoz hasonló jó minőségű embriók visszaültetésével kevesebb terhességet sikerült elérni és a klinikumban tapasztaltakhoz hasonlóan magasabb volt a korai vetélések aránya.

Összegzésül megállapíthatjuk, hogy vizsgálatainkkal újabb adatokat szolgáltatunk a dohányzás és a ROS által okozott károsodásoknak a humán reprodukcióban betöltött szerepére vonatkozólag.