B 2166

Ehrlich ascites tumor sejtek lipid bioszintézisének és membrán szerkezetének vizsgálata

Egyetemi doktori dolgozat

Bartha Katalin

Országos Onkológiai Intézet

1982

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára
SZEGED
2166

Tartalom

	Oldal
Bevezetés	1
Irodalmi áttekintés	3
Ehrlich ascites tumor sejtek zsirsav metabolizmusa	5
Ehrlich ascites sejtek és membrán lipidek molekuláris szerkezetének jellemzői, és metabolizmusuk	10
A. Sejtek	11
I. Foszfolipidek	11
II. Neutrális lipidek	13
B. Membrán lipidok jellemzői és molekuláris szerkezetük	14
I. Foszfolipidek	14
II. Neutrális lipidek	15
C. Metabolizmus	15
Membrán fluiditás normális és transzformált sejtekben	18
I. Membrán dinamikai paraméterei - "membrán fluiditás" fogalma	18
II. Fluoreszcens polarizáció mérése	20
III. Mikroviszkozitás meghatározása	21
IV. Ideális fluorofórok követelményei	23
V. Mikroviszkozitás paraméterei	24
VI. Membrán szerkezet és a rotációs fluiditás összefüggése	24
Célkitüzés	27

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED

Oldal

Felhasznált anyagok és módszerek 28

Ehrlich ascites tumor transzplantálásának és fenntartásának körülményei 28

Jelzett prekurzorok turn-overének mérése 28

Foszfolipidek szétválasztása 29

Anorganikus foszfor meghatározás roncsolásos módszerrel 30

Zsirsavösszetétel meghatározása. 31

Plazma membrán izolálás 31

Fehérje mérés 32

C/PL moláris arány meghatározása 33

DPH-membrán fluoreszcens polarizációjának mérése 34

Felhasznált anyagok 35

Eredmények 36

I. ^{14}C palmitinsav és ^{14}C olajsav turn-overe a sejtek zsirsav észter frakcióiban 36

1. ^{14}C palmitinsav turn-overe a tumor sejtek összlipidjében és zsirsav észter frakcióiban 37

2. ^{14}C olajsav turn-overe a tumor sejtek összlipidjében és zsirsav észter frakcióiban 41

3. ^{14}C olajsav és ^{14}C palmitinsav együttes turn-overe összlipidekben és zsirsav észter frakciókban 43

4. ^{14}C palmitinsav turn-overe a tumor sejtek izolált foszfolipid frakcióiban 44

5. ^{14}C olajsav turn-overe a tumor sejtek izolált foszfolipid frakcióiban 49

Oldal

6. ^{14}C olajsav és ^{3}H palmitinsav együttes turnovere izolált foszfolipid frakciókban 53

7. ^{14}C palmitinsav és ^{14}C olajsav turn-overe a tumor sejtek neutrális lipidejiben 55

II. Ehrlich ascites tumor sejtek foszfolipidjeinek és neutrális lipidjeinek zsirsavösszetétele 59

III. ^{14}C acetát beépülése a tumor sejtek foszfolipidjeinek zsirsavláncába 62

IV. ^{14}C kolin turn-overe a sejtekből izolált foszfatidil-kolin, és szfingomielin frakciókban 63

V./ ^{14}C etanolamin turn-overe a sejtekből izolált PE frakciójában, ^{14}C foszfatidil-etanolamin-^{14}C foszfatidil-kolin, ill. ^{14}C szfingomielin átalakulás 67

VI. Ehrlich ascites tumor sejtek foszfolipid összetétele 71

VII. Tumor sejtekből izolált plazma membrán rotációs fluiditása 72

VIII. A rotációs fluiditás és a membrán koleszterin/foszfolipid moláris arányának összefüggése 74

Értékelés 76

Irodalom

Köszönetnyilvánitás

Bevezetés

Az utóbbi néhány évtizedben a daganatkutatás területén erősen megnövekedett az érdeklődés a tumor lipidek iránt. Ezt annak a ténynek a felismerése hozta létre, hogy a malignus transzformációt követően a daganat sejtfelszini tulajdonságai megváltoznak.
Mivel mind a sejt felszini membránnak, mind a szubcelluláris szervek membránjainak a fő alkotóelemei a lipidek, ezért nyilvánvaló volt, hogy a lipidek közvetve, vagy közvetlenül befolyásolják a daganatos elváltozás folyamatait a sejtben.

A probléma megközelitésénél először a tumoros és a "normál" sejtek bizonyos lipid csoportjainak százalékos összetételét határozták meg és hasonlitották össze, illetve egy olyan "tumor specifikus lipidet" kerestek, amelynek megjelenése általában jellemezhetné az összes daganatos sejtet.
Ennek a munkának az eredményeként sikerült egyes daganat szövetekben eltérést kimutatni a "normál" szövethez képest, de ezek az eltérések semmiképp sem bizonyultak általánosithatónak az összes tumorra, sőt bizonyitást nyert, hogy a különböző daganatok igen eltérőek az egyes lipid csoportok százalékos megoszlását illetően.

A lipid analizis összehasonlító adataiból megállapitható volt az is, hogy a különböző tumoros szövetekben tapasztalt pl. megváltozott foszfolipid összetétel a daganatos elváltozás következtében létrejött sejt-specifikus különbséget, illetve anyagcsere változások eredményét tükrözi.

Ezért a tumoros és "normál" szövetek lipidjei közti valódi különbség eldöntéséhez, illetve annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy ezek a különbségek hogyan függnek össze a malignus transzformáció folyamatával olyan vizsgálatok szükségesek, amelyek molekuláris szinten hasonlitják össze az egyes lipid csoportokat és igy ezek metabolizmusára /a metabolizmus mértékére-turnover/ és a metabolizmusban bekövetkezett eltérő folyamatok okára is rávilágitanak.

Irodalmi áttekintés

Az Ehrlich ascites tumor talán az egyik legszélesebb körben vizsgált és a leginkább leirt daganat rendszer, és egyike azon kevés állati tumoroknak, amelyben a glicerolipid szerkezetet és metabolizmust részletesen vizsgálták.

Ez a tumor alkalmas modellként szolgálhat a daganatsejtek anyagcserefolyamatainak tanulmányozásához. Előnyei:

1./ A daganat transzplantálással tartható fent

2./ Hosszu élettartammal rendelkezik /18-20 nap/

3./ A tumor gyorsan növekszik, nagy mennyiségben nyerhető belőle sejt

4./ Genetikailag stabil sejtek alkotják

5./ Nem törzsigényes

Hátrányai:

1./ Kétséges a tumor eredete /1/

2./ Igy kérdéses a normál kontrol, azaz, hogy milyen szövettel lehet összehasonlitani

3./ Sok vonala létezik a tumornak, ezért ugyanazon problémák megoldására teljesen eltérő eredmények vannak.

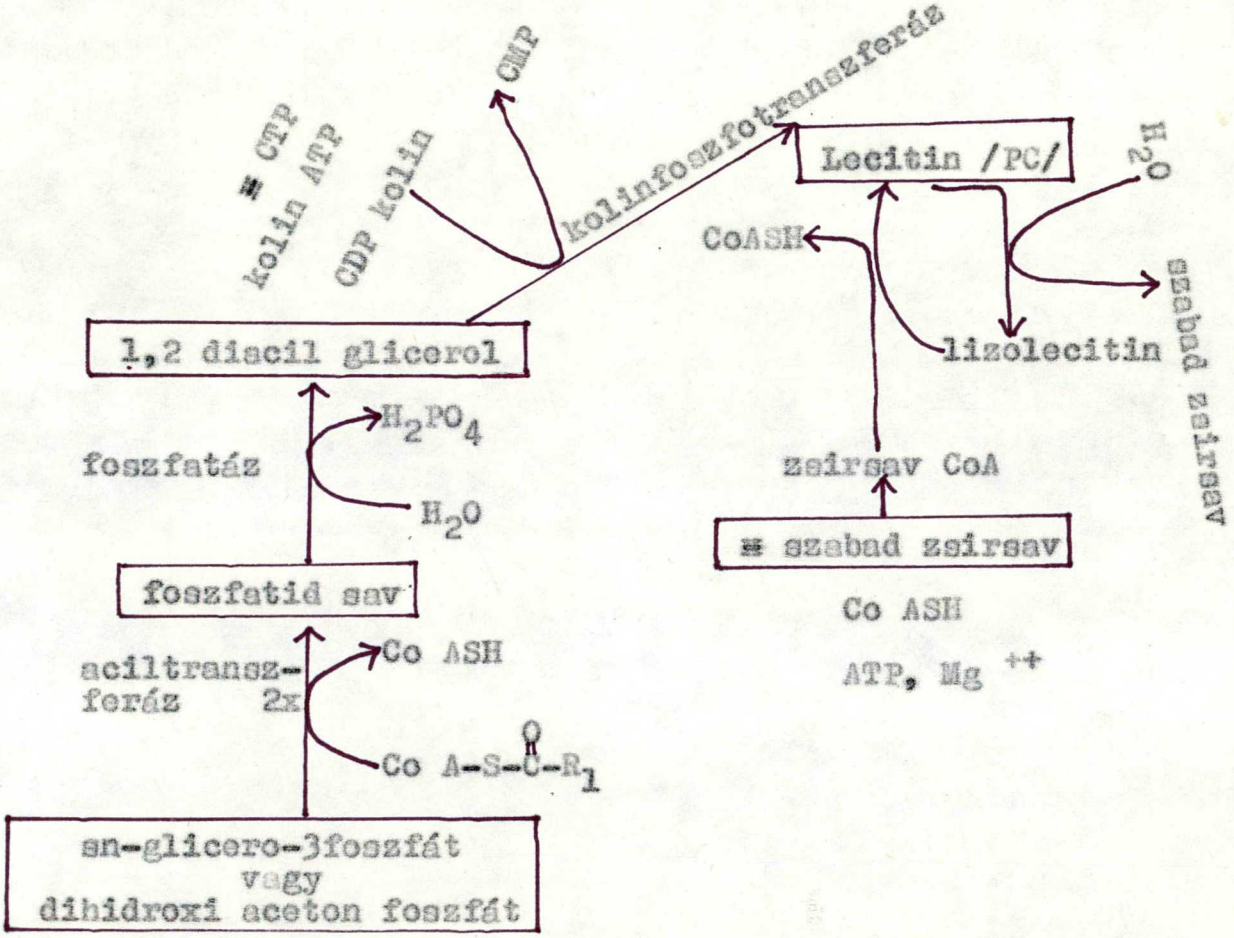
Az Ehrlich ascites sejtek a tumort hordozó gazdaszervezet peritoniális terében, az ascites plazma folyadékban szuszpendálva nőnek.

A tumor fejlődése, a sejtproliferáció tipusát és sebességét figyelembe véve több szakaszra osztható. A sejtszám alapján lényegében négy fázist különböztethetünk meg /2/. Az első /5-10 nap/ egy erősen proliferativ fázis, ahol a

sejtek nagy része ciklusban van, a második szakasz /10-14 nap/ egy stacioner fázis, ahol egyre több a cikluson kívüli sejtek száma. A harmadik és negyedik szakasz a tumor fejlődés legutolsó fázisai/14 nap után/ ahol előbb egy lineárisan osztódó, majd egy ujabb stacioner fázis következik.

A glicerolipidek szerkezete és metabolizmusa alapvetően nem különbözik a normális sejtekétől, azonban sok olyan eltérő vonást találhatunk az Ehrlich ascites tumor sejtek lipid molekuláinak szerkezetében amelyek eltérő bioszintetikus utakra utalnak.

A foszfolipid de novo bioszintézis alapvető és ismert lépései normális sejtekben a foszfatidil kolinnal szemléltetve az 1. ábrán láthatók /3/.



1. ábra Foszfatidilkolin bioszintézis

Ehrlich ascites tumor sejtek zsirsav metabolizmusa

Transzplantációs tumorokon, - igy az Ehrlich ascites tumoron is - tett megfigyelések arra utalnak, hogy az adott daganat anyagcserefolyamatai, többek között a sejtek gyors növekedése szempontjából alapvetően fontos zsirsav felvétel és leadás mértéke is eltér a tumor növekedés egyes szakaszaiban /4/. Az Ehrlich ascites sejtek a szükséges zsirsavakat a gazdaszervezetből nyerik, ezeket hasznositják saját lipidmolekuláik szintéziséhez, fiziológiás körülmények között a sejtek 2 szénatomos prekurzorokból való de novo zsirsav bioszintézise elhanyagolható. A gazdaszervezetből származó zsirsavak alapvető szerepet játszanak a daganat sejtek növekedésében: a membrán lipid alkotók felépitéséhez, valamint az oxidativ anyagcsere szubsztrátjaként energia termeléshez egyaránt nélkülözhetetlenek.

A sejteknek az ascites plazma biztositja az extracelluláris teret, igy ennek lipid tartalma biztositja és egyben meghatározza a sejtek lipid szükségletét. Az ascites plazma egyaránt tartalmaz szabad és észteresitett zsirsavakat kb. 50-50 %-ban. A tumor sejtek nagyméretü szabad zsirsav felvétele, valamint ezen anyagok gyors turn overe azt jelenti, hogy in vivo a szabad zsirsavak hasznositása nagyobb mértékü, mint a zsirsav észteroké /5/.

A zsirsavak mobilizálódásának körülményei a gazdaszervezetből, valamint a gazdaszervezet és a tumor közötti zsir-

sav transzport mechanizmusa igen régóta vizsgált folyamatok. A gyors növekedéshez szükséges nagymértékü zsirsavoxidáció folyamatos és nagymértékü zsirsav transzportot igényel a gazdaszervezetből az ascites folyadékba. Ennek a transzportnak a mechanizmusa valamint a zsirsavak kötődése a szállitó fehérjékhez a vérben igen bonyolult és máig sem teljesen tisztázott folyamat. Mermier és Baker /6/ vizsgálatai alapján az eddigi elképzelésektől teljesen eltérően - a nagymennyiségü zsirsav a vér plazma szabad zsirsav poolját kikerülve jut el a gazdaszervezet szöveteiből az ascites folyadékba. Az ismert lépésekből egy modellt alkottak az Ehrlich ascites tumor sejtek és a gazdaszervezet szabad zsirsav transzportjának szemléltetésére. A modell alapján a szabad zsirsavak három lehetséges uton juthatnak az ascites folyadékba: közvetlenül a hasüregi szervekből, vagy a hasüregbe ürülő nyirokszervek révén, illetve a vér lipoproteinek segitségével. A gazdaszervezetből transzportálódott szabad zsirsavak alkotják az ascites folyadék zsirsav pooljának egyik részét, a másik felét pedig magukból a sejtekből felszabadult zsirsavak hozzák létre. A zsirsav transzport tehát nem egyirányu, bizonyitott, hogy a tumor sejtek folyamatosan és nagy mennyiségben termelnek szabad zsirsavakat, amelyek a sejtből az extracelluláris térbe távoznak /7/.

A tumor növekedés különböző fázisaiban ez a kétirányu zsirsav - flux arányaiban változik. A gazdaszervezetből a tumorba történő zsirsav transzport-ra a frakcionális térfogat

/sejt per sejt + ascites folyadék térfogata/ változásából lehetett következtetni /8/. A tumor netto térfogat növekedése az 5-12 nap között 2,5-17,7 ml, de ebből a tumor sejtek térfogata csak 1,5-3,9 ml-re nőtt. A frakcionális térfogat igy 0,58-tól 0,22-re csökkent. Ez azt jelenti, hogy az extracelluláris folyadék akkumulációja nagyobb mértékü, mint a sejteké a tumor növekedés előrehaladtával.
A frakcionális térfogat csökkenése a tumor növekedés előrehaladtával összhangban van azzal a megfigyeléssel, miszrint a szabad zsirsav flux a gazdaszervezetből a tumor sejtekbe percenként kb. 26-szor nagyobb mint a beépült észteresitett zsirsav mennyisége.

A szabad zsirsavak felvételének és hasznositásának módja a sejtekben még szintén nem teljesen ismert folyamatok. Spector és Fletcher /9/ vizsgálatai szerint a vérben, valamint az ascites folyadékban lévő hosszu láncu zsirsavak 99 %-a a szérum albuminhoz kötött, fizikai jellegü kölcsönhatásokkal. A sejtbe való bejutás előtt a zsirsav-albumin komplexről a zsirsav ledisszociál és igy szabad zsirsav formájában kerül be a sejtbe. A zsirsavak kötődése a sejthez valószinüleg membrán receptorokon keresztül valósul meg, a felvétel nem energiaigényes folyamat a sejt membránon keresztül szabad diffuzióval történik /10, 11/.
Goodman szerint /12/ a membrán szabad zsirsav kötőhelyei legalább egy nagyságrenddel kisebb affinitással rendelkeznek

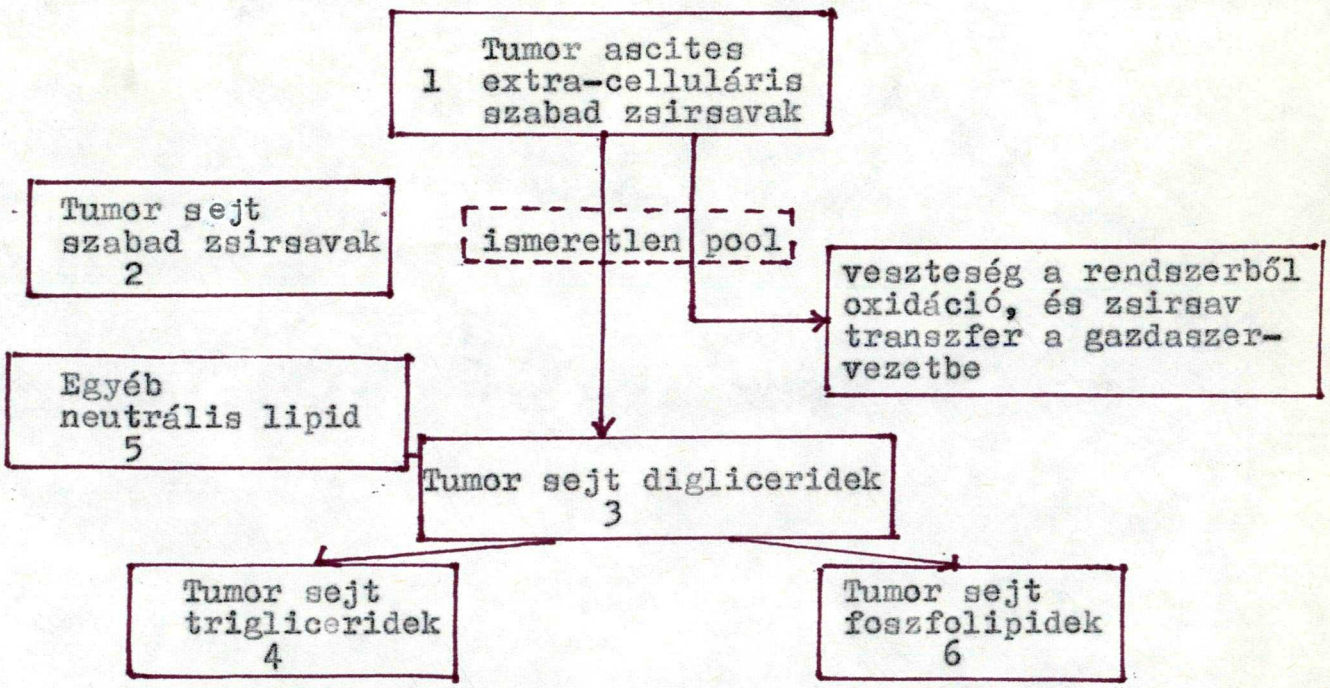
a zsirsavhoz, mint az albumin erős kötőhelyei. A zsirsav ledisszociálása az albuminról és a sejtbe való diffuziója mégis ugy történhet, hogy a sejt nagymértékü lipid metabolizmusa következtében a membrán kötőhelyekről a zsirsav gyorsan bekerül a sejtbe és igy az ujra és ujra megüresedő membrán receptorok mintegy koncentráció gradienst hoznak létre, amely biztositja az elegendő mennyiségü zsirsav bejutását a sejtbe.

A beépülő szabad zsirsav mennyiségét több tényező befolyásolja, ezek küzül az egyik legfontosabb a zsirsav/albumin moláris arány /13/. A felvétel mértéke exponenciálisan nő, ha emelkedik a fenti moláris arány. A zsirsav szerkezete is befolyásolja a felvételt, hosszabb szénláncu és telitett zsirsavakat nagyobb mértékben vesz fel a sejt /14/.

A fentebb emlitett modell /2. ábra/ részletesen ismerteti a szabad zsirsavak sejtbe való bejutása után a felhasználás különböző folyamatait is.

A modell alapján az extracelluláris folyadék és a tumor sejtek szabad zsirsav poolja között folyamatos és nagymértékü zsirsavkicserélődés folyik. A sejtnek ez a szabad zsirsav poolja, amely a szabad zsirsavak legnagyobb részét tartalmazz, nincs kapcsolatban azzal az anyagcsereuttal, amelyen keresztül az extracelluláris tér lipidjei a sejt lipid észtereivé alakulnak. Valószinüleg létezik egy jóval kisebb gyors turnoverü szabad zsirsav pool is, amely intermedierje az ösz-

szes képződő lipid észternek a sejtben, és az oxidációs folyamatokhoz felhasználódó lipideknek is. A sejtbe bejutó szabad zsirsavak egy része közvetlenül bekerül az extracelluláris térrel állandó kicserélődésben lévő független szabad zsirsav poolba. A másik része a feltételezett gyors turnoverü intermedier poolon áthaladva az energiaszolgáltató oxidativ lebomló folyamaton megy keresztül, illetve beépül a sejt lipid észter frakcióiba. Az Ehrlich ascites sejteknek igen jelentős mértékü a zsirsav oxidáló kapacitása, a tumorba bejutó szabad zsirsavak kb. egyharmada lebomlik CO_2-á, és H_2O-é.
A zsirsavak észtereződése digliceridekeken keresztül valósul meg mind a neutrális mind a foszfolipid frakciókban. Általában több zsirsav épül be a foszfolipidekbe, mint a neutrális lipidekbe /15/.



2. ábra Extra-celluláris szabad zsirsavak beépülése az Ehrlich ascites tumor sejtekbe

A zsirsav transzport - mint már emlitettük - nem egyirányu folyamat, jelentős mennyiségü zsirsav szabadul fel a sejtekből és kerül az extracelluláris térbe. Ez a szabad zsirsav mennyiség többszöröse a sejtek már emlitett szabad zsirsav pooljának /14/, igy feltehetően az endogén lipid észterek állandó lipolizisével magyarázható. Az endogén foszfolipidek felhasználása a lipolizishez sokkal nagyobb mértékü mint a neutrális lipideké /15/. A lipolizis mértékét számadatokkal jellemezve: 0.26 mol zsirsav észter képződése 0.25 mol-jának hidrolizisével jár együtt, igy a zsir akkumuláció csak 0.010 mol percenként. A hidrolizis termékei a szabad zsirsavak a sejtből közvetlenül az extracelluláris térbe távoznak, nem érintve a sejt szabad zsirsav pooljának nagyobb részét, és az extracelluláris tér szabad zsirsav tartalmának kb. felét ezek a zsirsavak alkotják.

Ehrlich ascites sejtek és membrán lipidek molekuláris szerkezetének jellemzői, és metabolizmusuk

R. Wood /16/ összefoglaló munkájában összehasonlitotta a tumor lipidek elsősorban az Ehrlich ascites tumor lipidek szerkezetét és metabolizmusát a "normál" szövetével. Az összehasonlitáshoz a megfelelő kontroll szövet mindig problematikus kérdés. A "normális" szövet metabolikus aktivitását a szövetet alkotó különböző szövetek együttese jelenti. Transzplantálás után a különböző sejtek aránya megváltozik a tumor adaptációjával, és ezért a normál szövet már nem lehet

a megfelelő kontrol, mivel a különböző sejtek arányának változása ill. a neoplázia hatására létrejövő metabolikus aktivitásbeli különbségek többé nem különithetők el. Ezért a legjobban ismert, és a lipid metabolizmus vizsgálatához leggyakrabban alkalmazott szövetet a májat tekintették összehasonlitási alapnak. Megállapitották, hogy az Ehrlich ascites tumor lipidek molekuláris tulajdonságai jelentősen eltérnek a kontrolnak tekintett máj szövet lipidek molekuláris tulajdonságaitól.

A. Sejtek

I. Foszfolipidek

I./1. Foszfatidilkolin /PC/ és foszfatidil etanolamin /PE/ molekuláris szerkezete.

Az Ehrlich ascites sejtek összlipidjének több mint 50 %-a foszfolipid. A foszfatidil-etanolamin 50 %-a és a foszfatidil-kolin 33 %-a éterkötést tartalmazó glicerinfoszfatid mig a többi foszfoglicerid nem tartalmazott jelentős mennyiségü gliceril étert. A diacil-, alkil-acil-, és az alk-1-enil-acil-foszfatidil-etanolaminnak és -kolinnak nem daganatos szövetekben mint pl. a májban igen jellegzetes a zsirsav összetétele és a zsirsavak pozicionális elhelyezkedése: elsősorban telitett zsirsavak találhatók az 1. pozicióban, mig főleg telitetlenek a 2. pozicióban. Az Ehrlich ascites sejteknél ebben a két fő foszfolipid frakcióban a diacil foszfatidokban nagyon kevés többszö-

rösen telitetlen zsirsavat, míg a gliceril éter foszfolipidoknél nagymennyiségü 20:4 és 22:6 zsirsavat találtak a 2. pozicióban.

A diacil foszfoglicéridekben a polién zsirsav hiányt a 18:2 zsirsav arány megnövekedése ellensulyozza. Ugy látszik, hogy bár az Ehrlich ascites tumor sejtek nagymennyiségü C_{20} és C_{22} többszörösen telitetlen zsirsavat tartalmaznak, ezeknek jó része a gliceril éter foszfatidokban található, és a diacil PC ill. PE ezekre a zsirsavakra deficiens.

A máj foszfatidokban bizonyos zsirsavak szelektiv párképződése tapasztalható, amely minden egyes foszfatid csoportra jellemző zsirsavösszetételt biztosit. AzEhrlich ascites sejt diacil-, és alkil-acil foszfatidil-kolinra és -etanolaminra egyaránt a zsirsavak random megoszlása jellemző az 1. és 2. pozicióban.

I./2. Többi foszfolipid molekuláris szerkezete

Az egyéb foszfolipidek /difoszfatidil-glicerol, foszfatidil-szerin /PS/, foszfatidil-inozit /PI/ és szfingomielin /SM/ kb. 15-20 %-t alkotják a sejt összes lipidjeinek.

A foszfatidil-kolinnal és -etanolaminnal ellentétben az összes többi foszfatid meghatározott zsirsavakat tartalmaz az 1. és 2. pozicióban. A májhoz hasonlóan a PS és a PI az 1. pozicióban főleg sztearinsavat, míg a 2. pozicióban főleg 20:4 zsirsavat tartalmaz. A többszörösen telitetlen zsirsavak csak 10 %-ban vannak a 2. pozicióban a PS-ben, míg a máj ebből 50 %-ot tartalmaz. Az Ehrlich ascites sejt szfingolipid-

je kétszer annyi 16:0-t, fele koncentrációju 24:0-t valamint csökkent mennyiségü 23:0 és 23:1 zsirsavat tartalmaz a patkány májhoz képest. Egy hosszu láncu különleges zsirsav jellemző az Ehrlich ascites sejtek szfingolipidjére, amely egy Δ^{15}, Δ^{18} tetrakozadiénsav amelynek molekulaszerkezete alapvetően különbözik a normális szövetekben jelenlévő 24:0 és 24:1 zsirsavakétól.

II. Neutrális lipidek

Az Ehrlich ascites sejtek egyik legnagyobb mennyiségü lipid csoportja a triglicerid /triacil-glicerin/. Erre a frakcióra jellemző a széles tartományu szénatom szám /46-62/. A különböző sejt frakciókból izolált trigliceridek hasonló szénatomszámu specieszeket tartalmaznak. Sztereospecifikus analizissel kimutatták, hogy a triacil glicerolok az 1. pozicióban főleg telitett és monoén zsirsavakat, mig a 2. és 3. pozicióban nagyobb mennyiségben többszörösen telitetlen zsirsavakat tartalmaznak. Igen magas a nagy molekulasulyu zsirsav specieszek aránya a tumor trigliceridekben, ami normális szövetekre nem jellemző.

A triacil glicerolok mellett izoláltak gliceril éter diésztereket /alkil-diacil-glicerin, alk-1-enil-diacil-glicerin/ is az Ehrlich sejt neutrális lipidekből. Jellemző, hogy ezekben a neutrális lipidekben a 2. pozicióban nagy mennyiségben található többszörösen telitetlen zsirsav, hasonlóan a foszfor tartalmu éter gliceridekhez. A 3. pozició-

ban kevesebb a polién zsirsav, itt a sztearát dominál.

A szterinek és szterin-észterek szintén nagy mennyiségben vannak jelen az Ehrlich ascites lipidekben. A koleszterin az egyetlen kimutatható szterin ebben a tumorban, a dezmoszterin nem jellemző. A koleszterin-észterek főleg mono- és polién zsirsavakat tartalmaznak, a telitetlen zsirsavak aránya <15 %. Elágazó szénláncu koleszterin észter molekulák csak nyomokban vannak jelen.

B. Membrán lipidek jellemzői és molekuláris szerkezetük

A teljes sejt lipidek koleszterin észter, triglicerid, szabad zsirsav lizofoszfatidilkolin, valamint a kolin és etanolamin glicerin-foszfatid frakciói közül bizonyos csoportok eltérnek az izolált membránban található ugyanolyan lipid frakcióktól. Ezeknek a különbségeknek egy része jellemző a normál májszövetre is, de néhány jellegzetesen csak a tumor sejteknél fordul elő.

I. Foszfolipidek:

Az egyik legjellegzetesebb ilyen eltérés az éter kötést tartalmazó lipidek hiánya a membrán kolint és etanolamint tartalmazó foszfatidokban.

Az éter kötésü lipidek hiánya a membrán frakcióban arra utal, hogy ezek a lipidek a sejt strukturális elemeinek nem lényeges alkotói. A teljes sejt diacil-foszfatidilkolin és -etanolamin zsirsavösszetétele valamint ugyanezen diacilfoszfatidok zsirsavösszetétele a membrán frak-

cióban teljesen megegyezett.

A membrán PS-re, PI-re egyaránt jellemző, hogy a 16:0 és 18:0 zsirsavak aránya megnő a teljes sejtekhez képest, mig a polién zsirsavak aránya lecsökken. A membrán szfingomielinben csökken a 22:1, 24:1, és 24:2 zsirsavak aránya a teljes sejthez képest.

II. Neutrális lipidek

A membrán neutrális lipidek zsirsavösszetétele szintén különbözik a teljes sejttétől. A membrán koleszterin észterek sokkal kevesebb polién zsirsavat tartalmaznak, és nagyobb arányban találhatók telitett és monoén zsirsavak. A triacil glicerolokban csak kis eltérés volt tapasztalható, mig a gliceril éter diészter frakció polién zsirsavai nagymértékben lecsökkentek a membrán lipidekben.

Lényegében tehát a membrán lipidekre általában jellemző, hogy lecsökken a többszörösen telitetlen zsirsavak aránya, és a telitett és monoén zsirsavak inkább dominálnak.

C. Metabolizmus

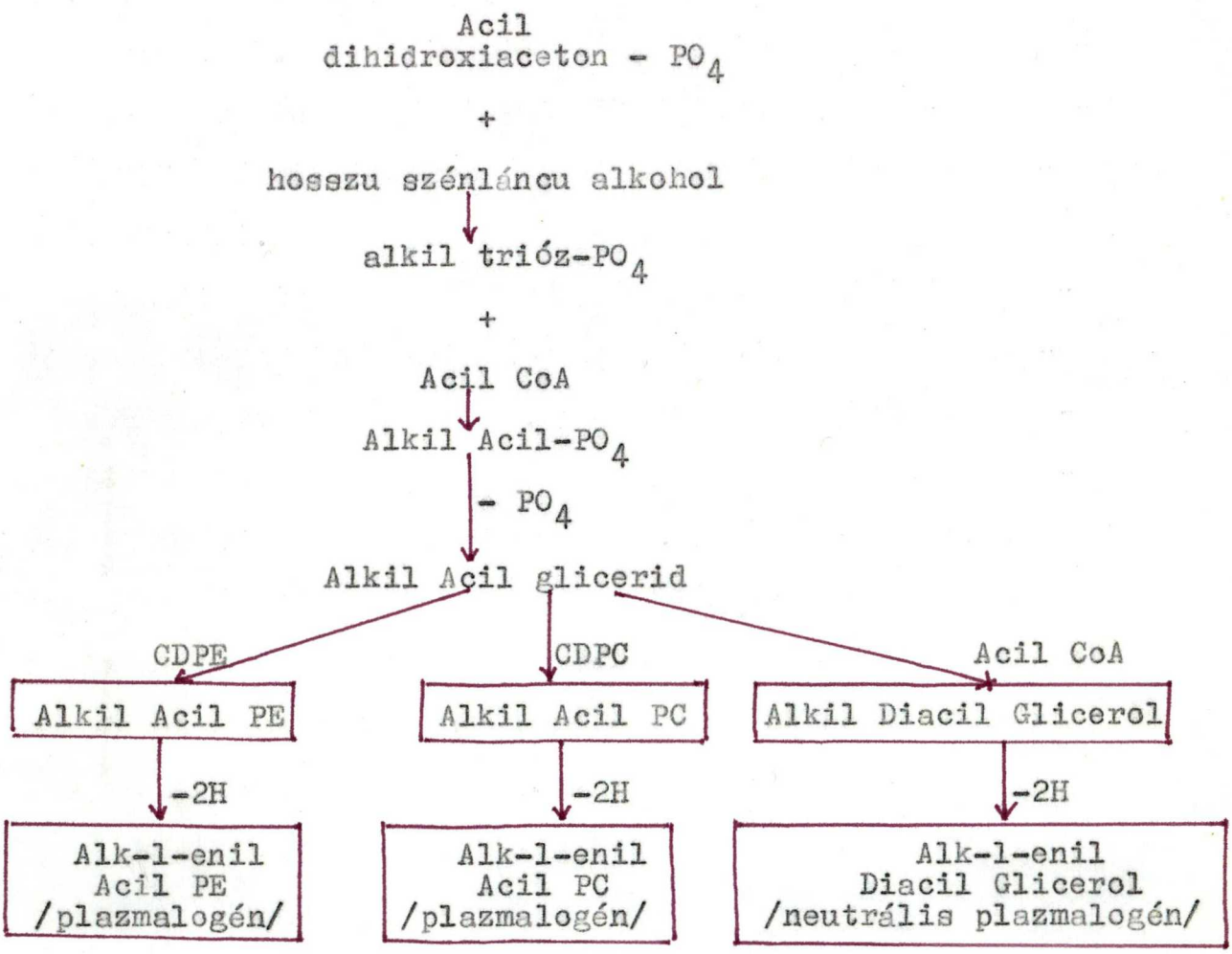
A lipidek molekuláris szerkezetének vizsgálata a klasszikus zsirsavösszetétel adataival szemben jelentős információt nyujthat a lipid metagolizmus kérdéseiről is.

Az Ehrlich ascites tumorban a triacil glicerolokban, a gliceril éter diészterekben, valamint a foszfatidok közül a

foszfatidilkolin és az etanolamin frakciókban a zsirsavak pozicionális elhelyezkedése teljesen random, ami rendellenes zsirsav metabolizmusra utal. Ezekből a foszfatid frakciókból, valamint a trigliceridekből származtatható diglicerídek zsirsavszerkezete hasonló. Ebből a tényből ezeknek a lipid csoportoknak a bioszintézisében a diglicerid szelektivitás hiányára lehetett következtetni. A diglicerídek hasonló zsirsavösszetétele az Ehrlich ascites tumorban valószinüleg az aktiv acil- CoA-lizofoszfatidil-kolin-acil-transzferáz rendszer hiányát ill. csökkent müködését jelenti.

Ugyanugy mint a diacilglicerídeknél, a gliceril éter diészterekből származó alkil-acil-glicerídek szintén egyforma zsirsavszerkezetüek, ami szintén a metabolikus enzimek szelektivitásának hiányával magyarázható. Jellemző azonban, hogy az acil glicerídek és az éter kötést tartalmazó glicerídek zsirsavösszetétele igen eltérő. Ez a tény, továbbá a parciális glicerídek közti paralellizmus arra utal, hogy az éter kötést tartalmazó lipidek bioszintézise független az acil glicerídek de novo, /Kennedy és Weiss féle/ bioszintetikus utjától. A gliceril-éter tartalom elég magas az Ehrlich ascites sejtben. Elképzelhető, hogy ennek az oka egyszerüen az eltérő bioszintézis kiinduló vegyületének, a dihidroxiaceton foszfátnak a felszaporodása, amely a glicerofoszfát dehidrogenáz enzimmüködés hiányának következménye. Az éterkötést tartalmazó glicerídek bioszintézi-

sének lépéseit a 3. ábra szemlélteti /16/.



3. ábra Éter kötést tartalmazó lipidek metabolizmusa

Bizonyos enzimrendszerek müködésképtelensége, továbbá az enzimspecificitás hiánya hozhat létre olyan random zsirsaveloszlásu lipideket, amelyek jellemzők az Ehrlich ascites tumor sejt lipidjeire.

Membrán fluiditás normális és transzformált sejtekben

Az utóbbi évtizedben egyre több kisérleti adat látszik igazolni, hogy a sejt növekedés és differenciálódás regulációjában bizonyos membrán komponenseknek alapvető szerepe van /17,18,19/. Ezzel kapcsolatosan nagyon sok munka foglalkozik a sejt felszini membrán szerepével azokban a biológiai szabályozó mechanizmusokban, amelyek a normális sejtek malignus transzformációját idézik elő /20,21/. Annak ellenére, hogy az ilyen jellegü hipotézisek száma igen nagy, a sejt felszini tulajdonságok és a malignus transzformáció direkt összefüggésére nincs bizonyitók. Ezért, bár számos adat bizonyitja, hogy a normális és malignus sejtek sejtfelszini tulajdonságai eltérőek, még nem sikerült találni olyan membrán változást, amely szükséges a malignus transzformáció kialakulásához.

I./ Membrán dinamikai paraméterei - "membrán fluiditás" fogalma

A sejtfelszin dinamikai paramétereinek tanulmányozásakor általában azt vizsgáljuk, hogy a membrán lipidek összetétele és szerkezete hogyan hat a membrán "fluiditásra". A "membrán fluiditás" pontos fogalma és definiciója azonban máig tisztázatlan és a meglevő kisérleti adatok tulzottan általánositásra törekvőek.

Lands és munkatársai /22/ megkisérelték az eddigi ismeretek

alapján a fluiditás fogalmát pontosabbá tenni. A következőkben az ő meggondolásaikat fogom ismertetni.

A fluiditás a mozgékonyság mértékének kifejezője, aritmetikusan a viszkozitás reciproka: ϕ /fluiditás/ = 1/η/ viszkozitás/.

A viszkozitás, - a molekuláris mozgás gátoltsága - valamilyen jellegü kinetikai energia abszorpciójának mértékét fejezi ki, mig a fluiditás ennek hiányát jelenti.
Különböző tipusu viszkozitás létezik /ennek megfelelően fluiditás is/ a kinetikai energia 3 formájának megfelelően, ezek: transzlációs, rotációs, és vibrációs energia. A kinetikai energia mindhárom formája párhuzamos vagy merőleges helyzetü lehet a membrán síkjára. Ez igy összesen 6 különböző féle mozgás lehetőséget és mozgás korlátozást jelent, amely előfordulhat egy fluid lipid kettősrétegben. Ennek megfelelően 6 féle fluiditással jellemezhetünk egy bilayert, nem létzik egyféle "általános fluiditás", ami jellemző lenne a rendszerre. Azonban van a fluid matrixnak egy olyan fontos tulajdonsága amely mind a hat féle kinetikai energia abszorpcióval kapcsolatba hozható-, ez a denzitás. A denzitás /tömeg/ egységnyi térfogat/ az anyagnak egy olyan tulajdonsága, amely biztositja a mikrokörnyezet kinetikai energia abszorpcióját molekuláris ütközések révén. Egy nagyobb denzitásu mikrokörnyezetben "m" tömegü "n" számu molekula egységnyi idő alatt több energia abszorpcióval járó ütközést szenved.

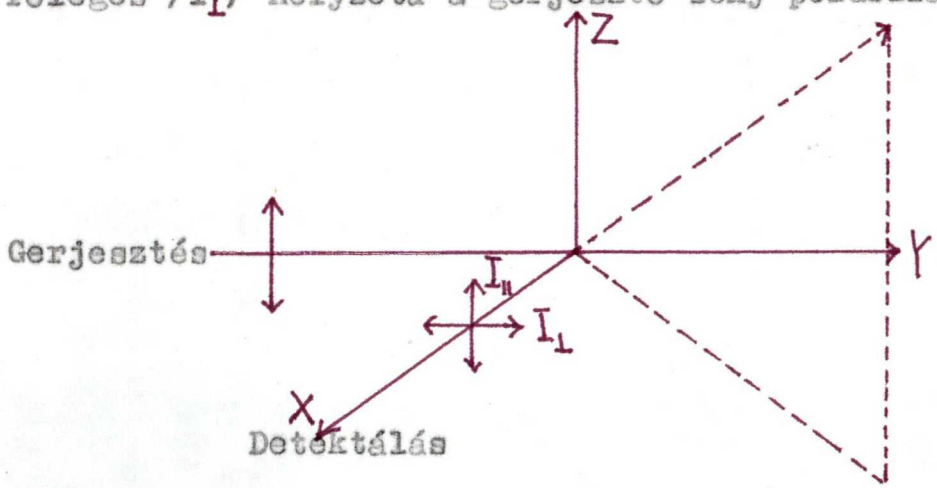
A fluiditás bármelyik tipusának változása tehát a molekuláris térfogat megnövekedésével és ezáltal meghatározott mértékü denzitás változással jár együtt. A denzitás általános szerepének felismerése, valamint a fluiditás több tipusa, érthetővé teszi, hogy ugyanazon fluid rendszerről különböző müszeres megközelitéssel /elektron spin rezonancia, fluoreszcens depolarizáció, differenciál scanning kalorimetria, diffuzió stb./ eltérőek az eredmények. A konkrét mérési eredmény interpretálásakor el kell döntenünk, hogy a hat féle fluiditás közül melyiknek van alapvető szerepe a kapott értékek kialakitásában.

A fluoreszcens festékekkel történő vizsgálatok ezért igen jelentősek hasonló összetételü membrán rendszerek relativ membrán expanzió mértékének összehasonlitására, amely expanzió befolyásolja a steady-state anizotrópiát a festékmolekulák rotációs mozgásának gátlása révén /23/. Ezt a módszert 1974-ben Inbar és munkatársai /24/ dolgozták ki.
A sejt membrán dinamikai paramétereinek vizsgálatára limfoid sejtekben egy fluoreszcens apoláros szénhidrogént, az 1,6-difenil-1,3,5 hexatriént /DPH/ alkalmazták, amely a sejt membrán hidrofób apoláros részeibe épül be.

II./ Fluoreszcens polarizáció mérése

A fluoreszcens polariziáció méréséné1 a festékmolekulák gerjesztése monokromatikus fénnyel történik, amely vertikálisan polarizált. A fényelnyelés utáni fényemissziót mérjük egy analizátoron keresztül, amely párhuzamos /$I_{\parallel}$/ vagy me-

rőleges /$I_\perp$/ helyzetü a gerjesztő fény polarizációs síkjára.



Az $I_\parallel$ és az $I_\perp$ egymásutáni mérésével a fluoreszcens polarizációt, /p/ valamint a fluoreszcens anizotrópiát /r/ és a teljes fluoreszcens intenzitást /F/ a következőképpen kapjuk:

$$p = \frac{I_\parallel - I_\perp}{I_\parallel + I_\perp}, \qquad r = \frac{I_\parallel - I_\perp}{I_\parallel + 2I_\perp}, \qquad F = I_\parallel + 2I_\perp$$

III./ Mikroviszkozitás meghatározása

A p értéke a gerjesztett DPH molekulák rotációs depolarizációjának mértéktől függ és igy belőle közvetlenül a festékmolekulák környezetének dinamikai tulajdonságaira lehet következtetni. Ezt fejezi ki a Perrin egyenlet nem gömb alaku festék molekulák esetében, mint pl. a DPH is:

$$\frac{r_o}{r} = 1 + C_{/r/}\,\frac{T \cdot \tau}{\eta}$$

ahol: r_o: a határ anizotrópia /rotáció nélküli anizotrópia értéke alacsony hőmérsékleten/

r: mért anizotrópia

T: abszolut hőmérséklet

τ : DPH gerjesztett állapotának átlagos élettartama

$C_{/r/}$: a molekula alakjától függő paraméter

η : mikroviszkozitás

/25/.

A mikroviszkozitás a klasszikus hidrodinamikai kifejezések analógiájára a mikroszkópikusan fluid régiók, pl. a membrán lipidek dinamikai paramétereit fejezi ki abszolut viszkozitási egységekben /poise/.

A mikroviszkozitás pontos meghatározásához a $C_{/r/}$ és a τ ismerete szükséges. A τ értékét megfelelő müszerrel meg lehet határozni, de ez elég nehéz feladat, és nem is mindig célravezető olyan heterogén rendszerekben mint a sejt plazma membrán. A $C_{/r/}$ és az r_o valamint a τ értékét is legtöbbször közelitő számitásokkal lehet meghatározni. Egyik ilyen megoldás, hogy a $C_{/r/}.T.\tau$ szorzatot konstansnak tekintik, mivel a τ és a $C_{/r/}$ értéke jelentősen kisebb mértékben csökken a hőmérséklettel, mint a η . Jobb közelitést lehetett elérni, ha $C_{/r/}$ és az r_o értékét kisérletesen meghatározták mesterséges lipid membránokban. A τ mérése lehetséges indirekt uton is a fluoreszcencia intenzitás hőmérsékletváltozásának mérésével:

$$\tau = \frac{\tau_o \cdot F/T/}{F_o}$$

ahol F_o: alacsony hőmérsékleten mért fluoreszcencia intenzitás

τ_o: DPH-ra 11.4 ns

F: adott hőmérsékleten mért fluoreszcencia intenzitás

τ : élettartam /átlagos/

IV. Ideális fluorofórok követelményei

A különböző lipid membránok fluoreszcens polarizációs tulajdonságainak vizsgálatára csak olyan fluorofór alkalmazható, amely az alábbi tulajdonságokkal rendelkezik /25/.

1./ oldhatatlan vízben

2./ szénhidrogén oldószerben jól oldódik

3./ merev molekuláris szerkezettel rendelkezik, az oldalcsoportok rotációja nem okoz dpolarizációt

4./ magas és konstans p_o értéke van

5./ az abszorpciós spektrumban van egy olyan tartomány, melyben p_o értéke 1/7 és - 1/3 között van

6./ τ: 1-8 ns közötti érték, mert ebben a tartományban az 1-100 cP viszkozitásu rendszerek jól mérhetők

7./ nagy extinkciós együttható és kvantumhatásfok jellemzi

8./ minimális az átfedés az abszorpciós és az emissziós spektrumok között, az energiatranszfer következtében fellépő depolarizáció elkerülésére.

A DPH ezeknek a követelményeknek eleget tesz, stabil transz konfigurációju polién szénhidrogén. Abszorpciós maximuma: 355 nm, az extinkciós együttható 80000 M^{-1} cm^{-1}. Alacsony hőmérsékleten, nagy viszkozitásnál a kvantumhatásfoka ~1. Az r_o értéke magas és stabil: 0.362, τ= 11.4 ns. A DPH vizes oldatban mikroaggregátumokat hoz létre, amelyek gyakorlatilag nem fluoreszkálnak. Hidrofób közegben kb 1000-szeres a fluoreszcencia intenzitás növekedés. A beépülés alatt a polarizációs fok állandó.

V./ Mikroviszkozitás paraméterei

Lineáris szénhidrogénláncu oldatokban a hőmérséklet növelésével a mikroviszkozitás exponenciálisan csökken:

$$\eta = Ae^{\Delta E/RT}$$

ahol ΔE: aktivációs energia - az a kinetikus energia, amely az intermolekuláris kölcsönhatások megszüntetéséhez szükséges.

Lineáris szénhidrogénekben ΔE értéke a lánc hosszusággal növekszik. Elágazó szénlánc esetén szintén nő a ΔE értéke. A $\log \eta / 1/T$ függvény változatlan fázisu lipid rendszerben egyenest ad, melynek meredeksége $\Delta E/R$. Ha a lipid rendszerben fázisátmenet, vagy fázisszeparáció megy végbe, akkor a függvénygörbén törés következik be, a törőspont feletti /fázisátmenet előtti állapot/, ill. a törőspont alatti /fázisátmenet utáni állapot/ egyenes meredeksége különböző lesz, ΔE értéke a fázisátmeneti hőmérséklet feletti hőmérséklet tartományban nő, ami utal a rendezettség csökkenésére a lipid membránban.

VI./ Membrán szerkezet és a rotációs fluiditás összefüggése

M. Inbar és munkatársainak /26/ sokoldalu vizsgálatai, melyeket egészséges és leukémiás limfocitákon végeztek, részben intakt sejteken, részben izolált plazma membránon, azt mutatták, hogy a membrán lipid összetétele és a mikroviszkozitása között direkt összefüggés van. A membrán koleszterin /foszfolipid moláris aránya alapvetően meghatá-

rozta a mért fluoreszcens polarizációs fokot, és az ebből meghatározott mikroviszkozitás értékét. A leukémiás limfociták sejt membránjában egyaránt csökken a koleszterin/foszfolipid moláris arány és a mikroviszkozitás.

Mély-Goubert és munkatársai /27/ ezzel szemben a normális limfocitákhoz képest a tumoros limfocitákban mért alacsony fluoreszcens polarizációs fokot a membránhoz kötött fehérjék szerkezetének megváltozásával magyarázták. Vizsgálataikból azt a következtetést vonták le, hogy a DPH főleg a membrán fehérjék strukturájáról ad felvilágositást, és a mért fluoreszcens polarizáció nem függ a koleszterin /foszfolipid arány által meghatározott fluiditástól.

A fent emlitett ellentmondó kisérleti adatok miatt az utóbbi években elég sok kérdés merült fel a DPH fluoreszcens polarizációs tulajdonságaival kapcsolatban, és főleg a steady-state polarizációból számitott mikroviszkozitás termitológiája bizonyult tulzottan leegyszerüsitettnek az eredmények interpretálásához. Ennek okai a következők:

1./ Már emlitettük, hogy a rotációs viszkozitás csak egyik tipusa annak a 6 féle kinetikus energia abszorpciónak, és ezáltal 6 féle viszkozitásnak, amely létrehozza az egész fluid matrix jellemző dinamikus szerkezetét. Ezért a DPH-val meghatározott rotációs depolarizáció abszolut értékeit nem lehet az egész lipid membrán átlag fluiditásaként értelmezni.

2./ A fluoreszcens depolarizáció időfelbontásos mérése kimutatta, hogy a DPH emissziós anizotrópiájának lecsengése nem exponenciális /28/. A mikroviszkozitás értelmezése a Perrin egyenlet alapján nem gömb alaku fluorofórokra csak akkor lehetséges, ha mind az emisszió, mind a teljes anizotrópia csökkenésének időfüggése exponenciális. Ezért a steady-state körülmények között mért fluoreszcens polarizációs fok és a mikroviszkozitás közt feltehetően bonyolultabb az összefüggés, mint a Perrin egyenletben. A mikroviszkozitás abszolut értékei igy önmagukban nem jellemzik a lipid membrán dinamikai paramétereit.

3./ A mikroviszkozitás terminológia ellen szól az a tény is, hogy a DPH-val mért anizotrópia értéke nemcsak a depolarizáció mértékétől, hanem a festék gerjesztett állapotának élettartamától is függ, ami egy heterogén membrán szerkezetben igen eltérő lehet. Igy a steady-state körülmények között mért fluoreszcens anizotrópia mérések inkább csak összehasonlító vizsgálatokra alkalmazhatók. Bizonyos, hogy a festék környezetének strukturális változása egy lipid rendszerben a fluoreszcens anizotrópia változásával jár együtt, és ez valóban jelzi egy bizonyos lipid mikrokörnyezet denzitás változását.

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED

Célkitüzés

Kisérleteink célja az volt, hogy vizsgáljuk az Ehrlich ascites tumor sejtek lipidanyagcseréjének néhány jellemző tulajdonságát, valamint ezeknek a tulajdonságoknak a változását a tumor növekedése során.

Kisérleteinket a tumor növekedés kezdeti gyors /5. nap/ és későbbi lassu /14. nap/ szakaszában végeztük, a lipidanyagcsere alábbi konkrét kiragadott részeit vizsgálva:

I./ ^{14}C palmitinsav és ^{14}C olajsav beépülését a sejtek lipid észter frakcióiba.

II./ A sejtek foszfolipid frakcióinak és neutrális lipidjeinek zsirsavösszetételét.

III./ ^{14}C acetátból az egyes zsirsavak szintézisét.

IV./ ^{14}C kolin és ^{14}C etanolamin prekurzorok beépülését a foszfolipidekbe.

V./ A sejtek foszfolipid összetételét.

VI./ Valamint egy, a lipidanyagcserével összefüggő, alapvetően fontos sejt "funkciót":
a sejtekből izolált plazma membránban a koleszterin/ /foszfolipid arány által meghatározott rotációs fluiditást.

Anyagok és módszerek

Ehrlich ascites tumor transzplantálásának és fenntartásának körülményei, a sejtekből tulélő tenyészet létrehozása

A transzplantáció a tumor növekedés 5. napján $5x10^6$ sejttel történt 28-30 g sulyu Swiss outbred egerekbe. A transzplantációt követő 5. ill. 14. napon 2-3 állan hasüregéből gyüjtöttük az ascites sejteket.

A PBS-1 /0,15 M NaCl,10 mM $Na_2H\ PO_4$/ mosott és centrifugálással összegyüjtött sejtszuszpenziót Tripán kék festékkel festettük, az élő sejteket Bürker kamrában számoltuk. $2x10^7$ sejt/ml koncentrációval MEM tápfolyadékban tulélő tenyészetet hoztunk létre. A tápfolyadék 2 % lipid mentes BSA-t /Sigma, V. frakció/ tartalmazott. A tenyészetet 37°C-os vizfürdőben enyhén rázatva tartottuk a prekurzorokkal való inkubiás ideje alatt.

Jelzett prekurzorok turn-overének mérése

A tulélő tenyészet minden ml-éhez, amely $2x10^7$ sejtet tartalmazott, 20 nmol ^{14}C palmitinsavat adtunk, amelyet albuminhoz kötöttünk, a BSA koncentráció szintén 2 % volt. A ^{14}C olajsav és ^{3}H palmitinsav kettős jelölésnél a jelzett zsirsav koncentráció 40 nmol/ml volt, mindkét zsirsavból 20-20 nmol/ml volt jelen.

A ^{14}C kolint és ^{14}C etanolamint 50 nmol/ml ill. 250 nmol/ml koncentrációban néhány µl alkoholos oldat formájában adtuk a tenyészethez. A jelzett prekurzorokkal

minden esetben 4 órán keresztül inkubáltuk a sejteket /külön-külön tenyészetben voltak az 5 napos és 14 napos tumorból származó sejtek/, és minden órában 1 ml mintát kivettünk, a beépült radioaktivitás meghatározására. A 4. óra után a jelzett prekurzorokat tartalmazó tápfolyadékot lecseréltük, és mosás után radioaktiv mentes tápfolyadékban inkubáltuk tovább a sejteket. A médium csere után még 9 órán át végeztük a kisérletet, és az 5. 6. 7. 9. és 13. órában vettünk ki 1-1 ml mintát. A különböző időközökben kivett 1-1 ml mintát, amely $2x10^7$ sejtet tartalmazott, azonnal nagy térfogatfeleslegü hideg PBS-ben lecentrifugáltuk, majd többszörös mosással eltávolitottuk a külső radioaktiv szennyezést. A mosott sejteket 10 ml kloroform:metanol 2:1 arányu elegyébe vittük.

A ^{14}C acetát beépülését ugyanigy tulélő tenyészetben vizsgáltuk, a radioaktiv anyagot alkoholos oldatban vittük a tenyészetbe. Az inkubálást 3 óráig végeztük, minden órában 1 ml mintát vettünk ki a tenyészetből.

Foszfolipidek szétválasztása

A PBS-ben szuszpendált sejt vagy membrán frakciót kloroform:metanol 2:1 arányu elegyben extraháltuk. A fehérje és egyéb nem lipoid természetü anyagok csapadék formájában kiülepedtek, ezt szüréssel eltávolitottuk. A kloroform: metanol elegyhez 0.2 M KCl oldatot adtunk, a sóoldat hatására két fázis különült el, a lipidek az alsó kloroformos fázisban koncentrálódtak. A felső fázis eltávoli-

tása után /viz + metanol/ az oldatot vizmentes Na_2SO_4-on engedtük keresztül, hogy a maradék viznyomokat eltávolitsuk. Ezután az elegyet bepároltuk, majd meghatározott térfogatu kloroform:metanol 2:1 oldatba vittük a lipideket.

A lipid extraktumból a foszfolipidek szétválasztását Silica gél G /Merck/ lapon végeztük egy dimenzióban. A lapot előzőleg 1 órán keresztül 115°C-on aktiváltuk. A szolvens etilacetát: kloroform:n propanol:metanol: :0.25 %-os KCl 25:25:25:15:7 arányu elegye volt. Az egyes foszfolipidek azonositása már előzőleg ismert és alkalmazott standardokkal történt. Ha csak a foszfolipideket és a neutrális lipideket akartuk szétválasztani, akkor a szolvens petroléter:éter:ecetsav 85:15:1 arányu elegye volt. Az előhivást 2 %-os rodamin B vizes oldatával végeztük /29/. Abban az esetben, ha a foltokból csak P_i tartalmat akartunk meghatározni, akkor a lapokat jódgőzben hivtuk elő.

Anorganikus foszfor meghatározás roncsolásos módszerrel

A meghatározandó foltra 50 %-os H_2SO_4-at cseppentettünk, ugy hogy a folt teljesen átitatódjék. A lapot 180°C-on 5 órán át száritószekrényben tartottuk, a lekapart folthoz 4 ml deszt. vizet és 1 ml foszforreagenst adtunk /6.85g Na-molibdenát + 0.4 g hidrazinszulfát + 100 ml cc.H_2SO_4 + + 500 ml deszt. viz, hütés után 1000 ml-re kiegészitve/. A mintákat 100°C-on 30 percet forraltuk, és spektrofotométeren 700 nm-nél mértük az extinkciót. A standart 3.9 ml

deszt vizet + 100 µl 10^{-3}M KH_2PO_4 + 1 ml foszforreagenst tartalmazott /29/.

Zsirsavösszetétel meghatározása

Amint a foszfolipidek szétválasztásánál említettük, a sejtekből a lipideket kloroform:metanol 2:1 elegyében extraháltuk. A zsirsavösszetétel vizsgálatához a mintákat bepároltuk, majd 5 %-os HCl-metanolt /kb. 5 ml/ adtunk hozzá és a kémcsöveket leforrasztva 80°C-on inkubáltuk. A bombacsövet felbontva kb. 1 ml vizet és 2 ml petroléter adtunk hozzá, a zsirsav metilészterek a petroléteres fázisba mentek át. A petroléteres fázist leszivtuk és bepároltuk, majd igen kis térfogat /kb 5 µl/ benzolban vettük fel a vizsgálandó mintát. A mintákat JEOL 1100-as lángionizációs detektorral működő gázkromatográf segitségével analizáltuk, az oszlop töltet megosztó fázisa SP 2330 vagy 2340, a hordozófázis 100-200 Mesh szemcsenagyságu Chromosorb W AW volt. Az egyes zsirsavészter csucsok azonositása standardokkal történt, a csucsok alatti területet integrátorral számoltuk ki.

A ^{14}C acetát beépülésnél az egyes zsirsavak aktivitását $^{14}CO_2$ formájában a gázkromatográf kivezetőcsövére helyezett szürőpapirral ellátott küvettában fogtuk fel, amelyet előzőleg hyamin hidroxiddal vontunk be /30/.

Plazma membrán izolálás

A plazma membrán izolálás Forte módszerével történt /31/, amelyet ascites sejtekre irt le. Az ascites sejteket

mostuk, majd 6x térfogatu hipotóniás homogenizáló oldatban /18 mM TRIS, 25 mM NaCl, 0.5 mM$CaCl_2$, pH:7.2/ vettük fel. A müveletet 4°C-on végeztük, és fél órát hagytuk duzzadni a sejteket. A homogenizálást Potter csőben végeztük, majd a homogenizátumot 2000 rpm-en centrifugáltuk 2 percig, amely során a sejtmagokat kiülepitettük. A magmentes frakciót 5000 rpm-en 20 percig centrifugálva kaptuk a durva membrán frakciót, amelyet cukor gradiensre vittünk. A cukor gradienst 38 ml-es csövekben készitettük el a következő rétegekkel, alulról felfelé a következő sorrendben: 60 %, 50 %, 45 %, 40 % egyenként 7,5 ml térfogatban. A durva membrán preparátumot a gradiens tetejére rétegeztük, amely frakció cukor sürüségét 30 %-osra állitottuk be. A gradiens frakcióinak sürüségét törésmutató méréssel állitottuk be. Beckman ultracentrifugában SW27 rotorban 27000 rpm-en 1 órán át centrifugáltuk. A membrán frakció a 40 % és 45 %-ot cukor gradiens közötti rétegben kaptuk. Az igy nyert preparátumot többször higitva és ülepitve kaptuk a tiszta membrán preparátumot, amelyet a további mérések elvégzésére 1-2 napon belül felhasználtunk.

Fehérje mérés

A plasma membrán fehérje tartalmának mérését Hartree szerint /32/ végeztük. Az 1 ml térfogatu mintához 0.9 ml "A" oldatot adtunk /2 g K-Na tartarát + 100 g Na_2CO_3 oldva 500 ml 1N NaOH-ban, desztl. vizzel kiegészitve 1 l-re/, ezzel erősen összeráztuk, és 50°C-os vizfürdőn tartottuk

10 percig. Lehütés után 0.1 ml "B" oldatot adtunk hozzá /2 g Na-K tartarát + 1 g $CuSO_4 \times 5H_2O$ oldva 900 ml deszt. vizben + 10 ml 1N NaOH/. Szobahőmérsékleten 10 percig állni hagytuk, majd 3 ml "C" oldatot /Folin reagens - 15-szörösére higitva/ adtunk hozzá. Erőteljes összerázás után 10 percig 50°C-os vizfürdőben tartottuk, majd lehütés után spektrofotométeren 650 nm-en mértük az extinkciót. A kalibrációs görbét BSA oldattal készitettük el.

C/P moláris arány meghatározása

A tisztitott membrán preparátumot Silica gél G /Merck/ vékonyréteg lapon választottuk szét. A szolvens petroleuméter:éter:ecetsav 90:15:3 arányu elegye volt. Futtatás után a lapról a foszfolipid, mono- és diglicerid, szabad koleszterin, szabad zsirsav, triglicerid, koleszterin-észter frakciókat lehetett elkülöniteni és mennyiségileg meghatározni. Az egyes azonositott frakciókat a lapról Hagedorn csövekbe gyüjtöttük, és a kvantitativ meghatározásukat dikromátos oxidációval végeztük /33/. Mindegyik összegyüjtött mintához 2 ml kénsavas dikromát reagenst adtunk /20 ml 25 %-os $Na_2Cr_2O_7 \times 2H_2O$+800 ml cc. H_2SO_4/, 2 ml deszt. vizzel higitottuk, majd 1 órán át forró vizfürdőn tartottuk. Lehülés után 10 ml deszt. vizzel higitottuk, és a silica gél lecentrifugálása után mértük az extinkciót spektrofotométeren. Standardként 200 és 400 µg koleszterint vittünk fel a lapra, és ezzel a továbbiakban ugyanugy jártunk el, mint a membrán mintákkal.

A vak reagens optikai denzitását 0,700-ra állitottuk be, és ezzel szemben mértük a standardok és a vizsgálandó minták denzitását. A vak reagens és a meghatározandó lipid frakció optikai denzitása közötti különbség a minta lipid tartalmával arányos.

A plazma membrán frakció koleszterin és foszfolipid tartalmának ismeretében a moláris arányokat a koleszterin molsulyának /386/ és a foszfolipideknél átlag molsullyal /775/ számolva adtuk meg.

DPH-membrán fluoreszcens polarizációjának mérése

A plazma membránt $2x10^{-6}$ M DPH vizes oldatában inkubáltuk 37°C-on 1 órán át. A festék vizes szuszpenzióját minden mérés előtt frissen készitettük a DPH $2x10^{-3}$ M-os tetrahidrofurán oldatából intenziv keveréssel.
A lipid/festék moláris aránya kb. 1000:1 volt a küvettában, amelyet a membrán fehérjetartalmának mérésével állitottunk be, a membrán fehérje:lipid arányát 1-nek véve.

A fluoreszcencia intenzitást és a fluoreszcens polarizációt Perkin-Elmer MPF 44A spektrofluoriméteren mértük, /34/. A gerjesztés hullámhossza 366 nm az emissziós hullámhossz 420 nm volt. A háttér szórás csökkentésére üveg filtert alkalmaztunk. A gerjesztés 10 másodpercig történt és a fluoreszcens emissziót ez idő alatt Perkin-elmer 048 digitális integrátorral átlagoltuk. A háttér fluoreszcenciát a festék nélküli membrán szuszpenzió fluoreszcencia intenzitásának mérésével ellenőriztük, és ez minden eset-

ben kb. 1 %-a volt a festékkel jelölt minta fluoreszcencia intenzitásának. A festékkel való inkubálás alatt a fluoreszcencia intenzitás egyre nőtt, és 60 perc alatt telitési görbét kaptunk.

A fluoreszcens polarizációt az inkubálás 1 órája után mértük, ekkor már stabil értéket kaptunk.

A polarizáció hőmérsékletfüggését $0^{o}C$-$40^{o}C$-ig egy termosztálható küvettában mértük, és a küvettában az aktuális hőmérsékletet termisztorral ellenőriztük.

Felhasznált anyagok

^{14}C palmitát /1.14μCi/μmol/, ^{14}C oleát /60μCi/μmol/, ^{14}C acetát /60μCi/μmol/, ^{14}C kolin-klorid /49.5 mCi/mmol/, ^{14}C etanolamin hidroklorid /4μCi/μmol/, ^{3}H palmitát /250μCi/μmol/ - a New England Nuclear készitményei.

Bovine Serum Albumin /BSA/ V. frakció, Minimum Essential Medium /MEM/ - a Sigma cég készitményei.

Foszfolipid standardok: PC, PE, PI, PS, LPC, SM frakciók - a SerdaryResearch Laboratories Canada készitményei.

1,6-difenil-1,3,5 hexatrién /DPH/ - Koch-Light cég készitménye.

Eredmények

I./ ^{14}C palmitinsav és ^{14}C olajsav turn-overe a sejtek zsirsavészter frakcióiban

Az emlős sejtekben előforduló zsirsavak közül a palmitinsav és az olajsav nagy mennyiségben található meg. Az Ehrlich ascites plazma szabad zsirsavainak 1/4-e palmitinsav. Ezt a két zsirsavat választottuk modellként az Ehrlich ascites sejtek zsirsav anyagcseréjének tanulmányozására. Mindkét zsirsavat először albuminhoz kötöttük, amint azt a módszerek c. fejezetben leirtuk, és a zsirsavakkal való inkubálást 2 %-os lipid mentes szérumot tartalmazó tápfolyadékban végeztük, mivel a teljes szérum gátolja a jelzett prekurzorokból történő szintézist.

Meghatároztuk a ^{14}C jelzett zsirsavak beépülését a sejt lipid észter frakcióiba az egyes frakciók specifikus aktivitásának növekedésének mérésével, majd a médiumot lecserélve mértük az izolált lipid észter frakciókban a radioaktivitás csökkenését. Mindkét folyamatot időfüggésében vizsgáltuk. Mind a beépülés mind a lebomlás komplex folyamat, mértékét több tényező befolyásolja. Ezek közül a legfontosabbak:

a./ Mint az irodalmi áttekintésben említettük több szabad zsirsav pool létezik a sejtben, amely a környezettel és egymással is állandó kapcsolatban van.

b./ Recikllizáció lehetséges, az egyszer már beépült és le-

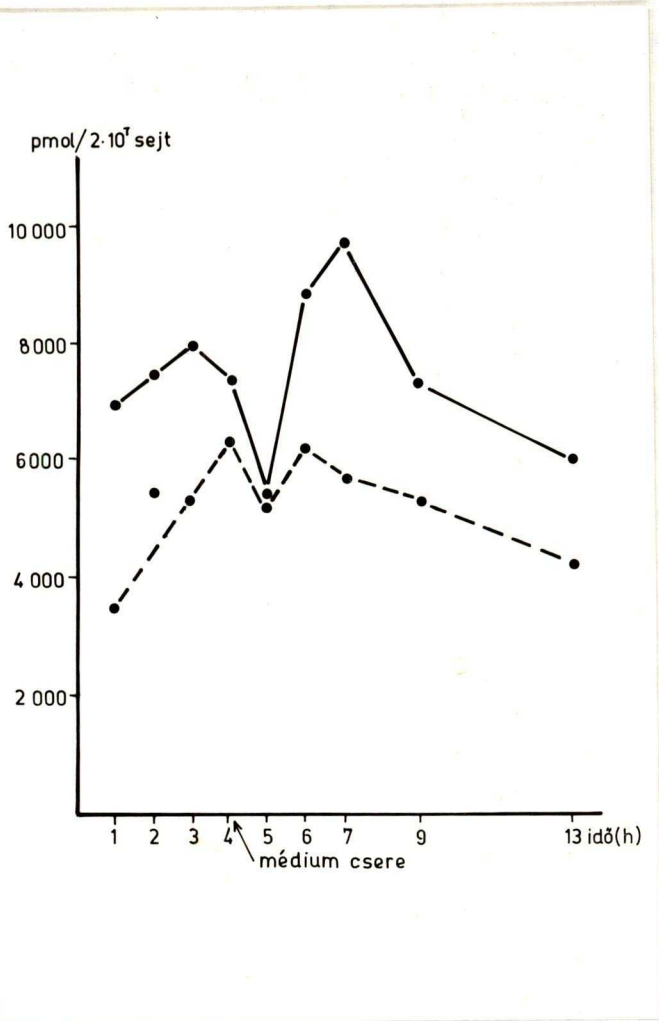
bomlott zsirsav ujra felhasználódhat ugyanabban vagy egy másik zsirsav észter frakcióban.

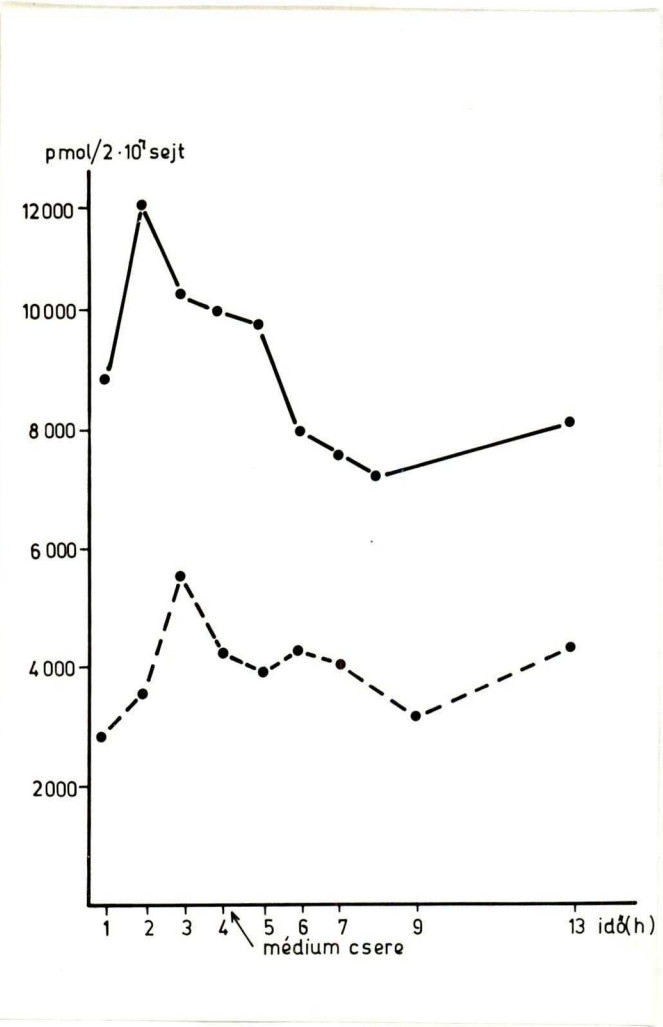
c./ A jelzett zsirsav transzferje bekövetkezhet egyik észter frakcióból a másikba de novo szintézis nélkül is a transzferáz enzimek segitségével.

I./1. ^{14}C palmitinsav beépülése 5 és 14 napos tumor összlipidjébe és zsirsavészter frakcióiba

A sejtek összlipid extraktumában a specifikus aktivitás /4. ábra/ mindkét sejtpopulációban már az első órában jelentős, a 4. órában tapasztalt maximális aktivitásnak kb. 2/3-a. A jelzett zsirsavval való inkubálás 4 órája alatt folyamatosan nőtt a sejtek radioaktivitása. A 4. órai, médium csere után az 5 napos tumor sejtekben a radioaktivitás átmeneti gyors csökkenése volt tapasztalható, majd az 5-7 órás szakaszban átmenetileg kissé növekedett az összlipid extraktum specifikus aktivitása, és a 7. órában mért maximális érték az inkubálás végéig /13. óra/ lassan csökkent /Összesen 34 %-kal/. A 14 napos tumorból származó sejtekben a 2. órában volt a maximális beépülés, és ez folyamatosan csökkent az inkubálás végéig /Összesen 27 %-kal/.

A ^{14}C palmitinsav degradáció tehát lényegében bifázikus jellegü volt a zsirsav észterekben.





4./a.,b. ábra ^{14}C palmitát turn-overe Ehrlich ascites sejtek összlipidjében és össz. lipid észter frakcióiban.

a./ —— 5 napos tumor sejt lipid;
—— 5 napos tumor sejt lipid észter

b./ —— 14 napos tumor sejt lipid;
—— 14 napos tumor sejt lipid észter

Vékonyrétegen, kloroform-metanol-ecetsav oldószerrendszerben elválasztva a sejt zsirsav észter frakcióit azt tapasztaltuk, hogy a sejtbe bejutott jelzett palmitinsav különböző hányada található a kétféle koru sejt zsirsav észter frakcióiban. Az 5 napos tumorból származó sejtekben az első órában a sejtbe bejutott jelzett zsirsavaknak mintegy a fele épült be a zsirsav észterekbe. A 2. órától kezdve egyre nőtt a jelzettség aránya a zsirsav észterekben és az 5. órában már a sejtekben található összes jelzett lipid 90 %-a észter kötésben volt. A 14 napos tumorból származó sejtekben az 1. órában a sejten belüli össz. jelzett zsirsavaknak csak mintegy 30 %-a volt az észter frakciókban, és a jelzettségi arány az inkubáció során nőtt ugyan, de csak az 50 %-ot érte el. Igy a 14 napos tumor sejtekben a zsirsav észter frakciókban minden időpontban történt mintavételben sokkal kevesebb volt a jelzett palmitinsav mennyisége, mint az 5 napos tumorból származó sejtek észtereiben. Elképzelhető, hogy a 14 napos tumorból származó ascites sejtekben a szabad zsirsavak, ezen belül a palmitinsav forgalma sokkal nagyobb mint az 5 napos tumor sejtekben, és ezzel magyarázható a zsirsav észter frakciókban nem reprodukálható, de a sejtekbe beépült jelzett anyag nagy mennyisége /4. ábra/.

Külön vizsgáltuk a foszfolipidek és a neutrális lipidek jelzettségének mértékét, és számoltuk a különböző mintavételi időpontokban a jelzett PL/NL arányt /1. táblázat/.

Mind az 5 napos, mind a 14 napos tumor sejteknél a PL-ek jelölődése palmitinsavval nagyobb mértékű volt, mint a neutrális lipidekké. Azonban míg a jelzett PL/NL arány az 5 napos tumor esetében a jelzett zsírsavval való inkubációs szakaszában átlagosan 4,5 volt, addig a 14 napos tumornál ebben a szakaszban jóval alacsonyabb, 2,1. Az 5 napos tumor sejtekben a radioaktív zsírsavval jelzett médium lecserélése után a PL/NL arány hirtelen lecsökkent, az összaktivitás csökkenésével párhuzamosan. Ez azt jelenti, hogy a zsírsavmentes közegben elsősorban a foszfolipidek bomlása következett be, ebben a frakcióban nagyobb volt a jelzett zsírsav vesztése, mint a neutrális lipidekben. A mosás utáni 9. és 13. órában, ahol feltehetően a palmitinsav recirkulációja következett be, a sejt összaktivitásának növekedésével párhuzamosan ismét nőtt a jelzett PL/NL arány. A 14 napos tumor sejtekben a PL/NL arány viszont lényegében változatlan maradt a vizsgálati idő alatt.

inkubációs idő /óra/	5.nap ^{14}C PL/NL arány		14. nap ^{14}C PL/NL arány	
	^{14}C palmitát	^{14}C oleát	^{14}C palmitát	^{14}C oleát
1	4,78	2,51	2,41	1,19
2	4,33	2,37	2,12	1,34
3	5,47	2,37	2,08	1,34
4	4,21	1,74	1,95	0,88
médium csere után				
5	1,99	3,00	2,27	1,70
6	1,50	2,65	2,16	2,12
7	1,42	3,00	2,01	1,43
9	6,86	3,11	2,16	1,33
13	8,39	3,65	1,81	1,27

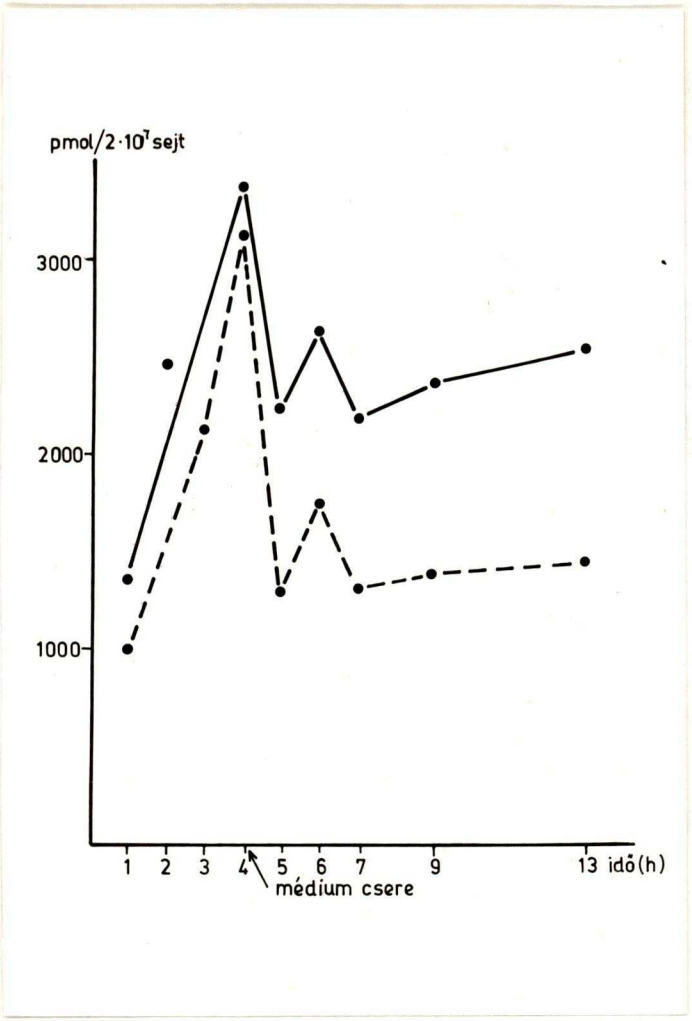
1. táblázat 5. ill. 14 napos tumor sejtek jelzett PL/NL arányai 20 nmol/2x10^7 sejt ^{14}C palmitáttal, ill. 20 nmol/2x10^7 sejt oleáttal való inkubálásnál.

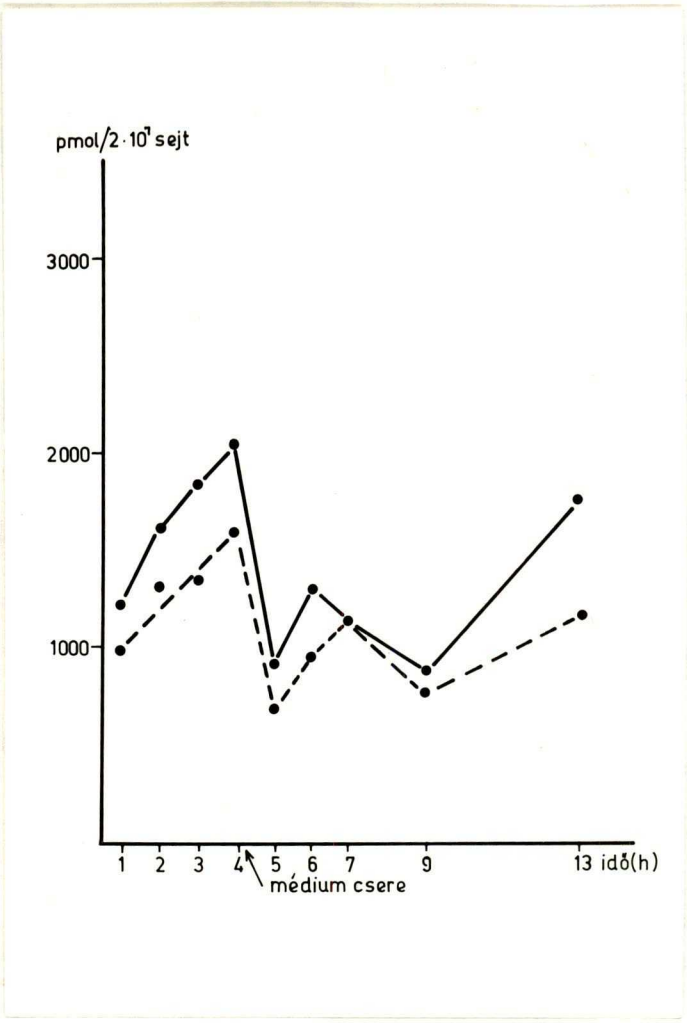
I./2. ^{14}C oleát beépülése 5 és 14 napos tumorból származó sejtek összlipidjébe és szirsav észtereibe

20 nmol ^{14}C olajsav/$2x10^7$ sejt koncentráció mellett, azonos kisérleti körülmények között a tumor sejtek kevesebb ^{14}C olajsavat vettek fel mint ^{14}C palmitinsavat.

A 14 napos tumor sejtekbe kevesebb ^{14}C olajsav épült be mint az 5 napos tumor sejtekbe, esekben a sejtekben mind az összlipidben, mind a szirsav észterekben kisebb volt a specifikus aktivitás /5. ábra/. A foszfolipideket és neutrális lipideket elválasztva azt tapasztaltuk, /2. táblázat/, hogy ^{14}C olajsav esetén szintén nagyobb mértékben jelölődtek a foszfolipidek, a PL/NL arány az 5 napos tumornál átlag 2,5 volt, míg a 14 napos tumornál ennél alacsonyabb, átlag 1,3.

A 4. órai médium csere után a ^{14}C olajsav esetén még nagyobb mértékü volt a gyors jelzett szirsav degradáció. Az inkubálás 5. órájára mind az 5 napos, mind a 14 napos tumor sejtekben a beépült ^{14}C olajsav mennyisége 42 %-kal csökkent, azonban a 6. órában ujabb aktivitás emelkedést tapasztaltunk, igy a görbe nem jellegzetesen bifázikus.





5./a., b. ábra ^{14}C oleát turn-overe Ehrlich ascites sejtek összlipidjében és össz. lipid észter frakcióiban

a./ —— 5 napos tumor sejt lipid;
—— 5 napos tumor sejt lipid észter

b./ —— 14 napos tumor sejt lipid;
—— 14 napos tumor sejt lipid észter

I./3. ^{14}C oleát és ^{14}C palmitát együttes beépülése összlipidekbe és zsirsav észterekbe

20 nmol ^{14}C olajsav koncentráció és 20 nmol ^{3}H palmitinsav koncentráció együttes alkalmazásánál a PL/NL arány mind az 5 napos, mind a 14 napos tumor sejteknél 1-nél kisebb volt a 4 órás jelzett zsirsavakkal való inkubációs periódus alatt /2. táblázat/. Összesen 40 nmol/ /$2x10^7$ sejt zsirsav koncentrációnál tehát a neutrális lipidekbe aránylag több palmitát és oleát épül be, mint a 20 nmol-os zsirsav koncentrációnál. Feltehetően a sejtek a felesleges zsirsavakat tartalékként építik be a neutrális lipidekbe. A médiumcsere után az 5 napos tumor sejtekben a PL/NL arány ugrásszerüen 3 fölé emelkedett, mivel megszünt a médiumból a zsirsavak pótlása. A 14 napos tumorból származó sejtekben a PL/NL arány a médium cseretől függetlenül 0,2 és 0,3 között volt.

inkubációs idő /óra/	5. nap PL/NL arány		14. nap PL/NL arány	
	^{3}H palmitát	^{14}C oleát	^{3}H palmitát	^{14}C oleát
1	0,61	0,79	0,28	0,38
2	0,76	0,97	0,29	0,38
3	0,72	0,94	0,25	0,34
4	0,72	0,89	0,23	0,30
médium csere után				
5	3,64	3,55	0,27	0,36
6	3,28	3,22	0,29	0,39
7	3,32	3,21	0,31	0,38
9	0,89	1,10	0,29	0,38
13	0,98	1,23	0,34	0,42

2. táblázat 5. ill. 14. napos tumor sejtek jelzett PL/NL arányai 20 nmol/$2x10^7$ sejt ^{3}H palmitáttal és 20 nmol/$2x10^7$ sejt ^{14}C oleáttal való együttes inkubáláskor.

I./4. ^{14}C palmitát beépülése 5 és 14 napos tumorból származó sejtek izolált foszfolipid frakcióiba

A sejtekből extrahált lipidekből vékonyréteg lapon a módszerekben említett oldószer rendszerben elválasztottuk az egyes foszfolipid frakciókat, és a standardokkal azonosított, lekapart foltok aktivitását mértük. Mindegyik mintavételi időpontban az egyes foszfolipid frakcióknak $2x10^7$ sejtben mért specifikus aktivitását tüntettük fel az ábrákon /6. 7.,8.,9.,10. ábra/. ^{14}C palmitinsav esetén az egyes foszfolipid frakciók sorrendje a jelölődés mértékét tekintve a következő volt: PC > PE > SM > LPC > PI > PS - mindkét koru tumorból származó sejtben. Az egyes frakciók közötti %-os megoszlást a 3. táblázat tartalmazza, néhány jellemző időpontban.

a./

Mintavétel ideje: /óra/	PL ^{14}C 16:0 /pmol/	PC/%/	PE/%/	SM/%/	LPC/%/	PI/%/	PS/%/
4.	4818	53	17	15	6	5	4
5.	3488	41	16	22	8	8	5
13.	3698	46	18	19	5	7	5

b./

Mintavétel ideje: /óra/	PL ^{14}C 18:1 /pmol/	PC/%/	PE/%/	PS/%/	PI/%/	SM/%/	LPC/%/
4.	1976	57	26	6	5	5	1
5.	976	55	22	9	6	5	3
13.	1143	49	30	8	6	5	2

c./

Mintavétel ideje: /óra/	PL ^{14}C 16:0 /pmol/	PC/%/	PE/%/	SM/%/	LPC/%/	PI/%/	PS/%/
4.	2825	49	16	13	11	6	5
5.	2718	47	13	17	12	6	5
13.	2936	48	13	17	8	8	6

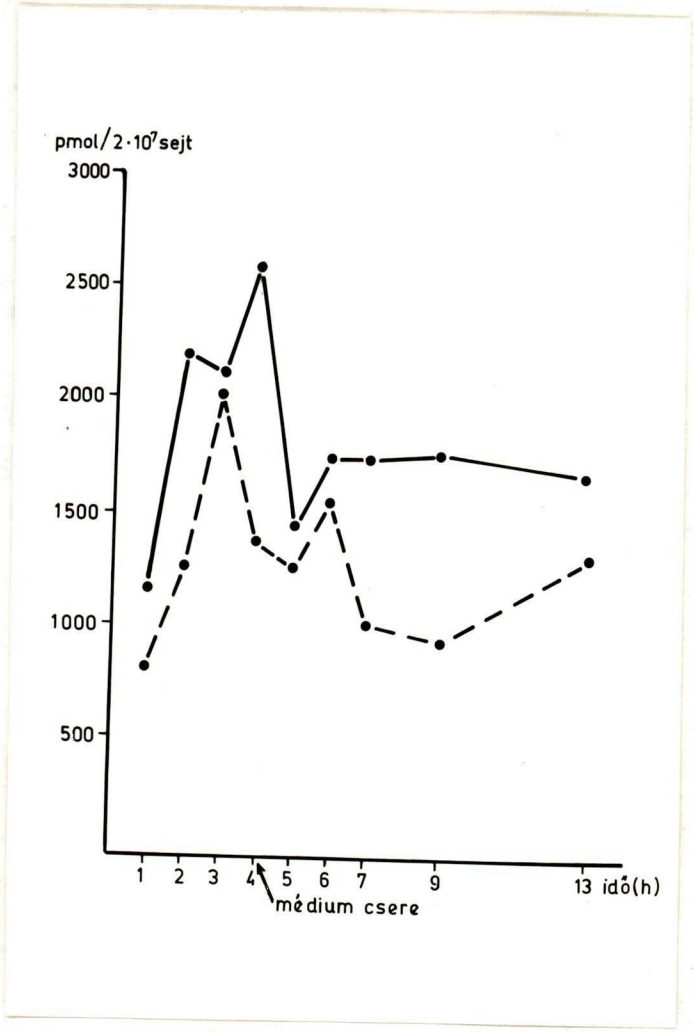
d./

Mintavétel ideje: /óra/	PL ^{14}C 18:1 /pmol/	PC/%/	PE/%/	PS/%/	PI/%/	SM/%/	LPC/%/
4.	745	61	19	9	6	2	3
5.	419	57	19	12	6	2	4
13.	644	58	19	12	5	2	4

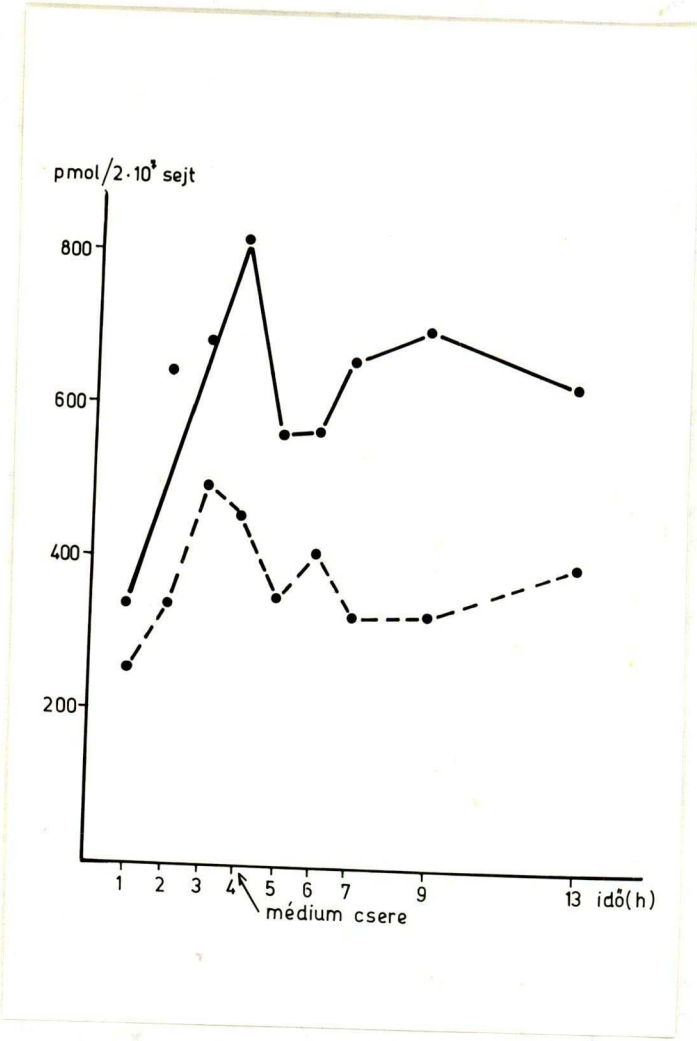
3. táblázat Izolált foszfolipid frakciók jelölődésének mértéke /%-ban kifejezve/ az összes jelzett foszfolipidhez képest.
a./ 5 napos tumor ^{14}C palmitáttal inkubálva
b./ 5 napos tumor ^{14}C oleáttal inkubálva
c./ 14 napos tumor ^{14}C palmitáttal inkubálva
d./ 14 napos tumor ^{14}C oleáttal inkubálva

A foszfatidil kolin és a foszfatidil etanolamin frakciókban /6,7. ábra/ az 1-4 órás inkubálási szakaszban a jelzett palmitinsav beépülése egyre nőtt az 5 napos tumor sejtekben. A 4. órában e két zsírsav összes frakcióban még nem következett be a maximális kicserélődés a külső környezet jelzett zsírsavaival. A 14 napos tumor sejtekben már a 3. órában elérte a maximumot a jelzett zsírsav beépülés, ezután a radioaktivitás csökkenése volt tapasztalható. A beépült palmitinsav mennyisége mindegyik mintában az 5. napos tumorból származó sejtekben sokkal magasabb volt, mint a 14 napos tumorból származó sejtekben. A médium csere után a jelzett zsírsavak lizise rögtön elkezdődött, és egy órán belül lebomlott a maximálisan beépült zsírsavak 30 %-a, mind a PC-ben, mind a PE-ben. A 6-13 órás szakaszban már lényegesen nem csökkent tovább a beépült jelzett palmitinsav mennyisége. A ^{14}C palmitinsav degradáció tehát ebben a két fő PL frakcióban jellegzetesen bifázikus, mint azt az össz. zsírsav

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED



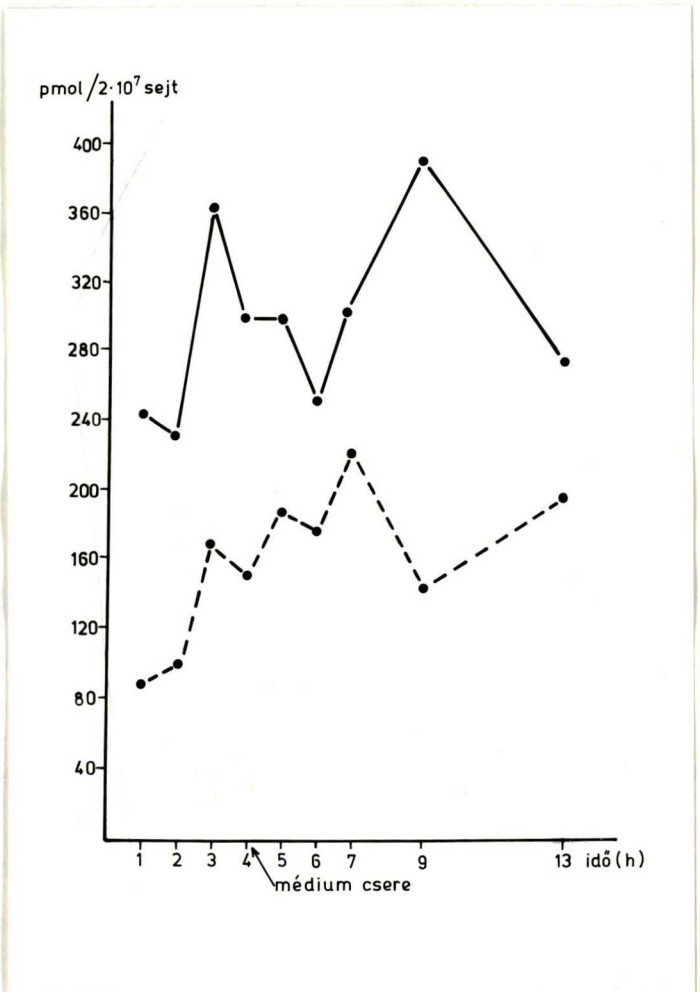
6. ábra ^{14}C palmitát turn-overe Ehrlich ascites sejtek PC frakciójában
—— 5 napos tumor;
--- 14 napos tumor



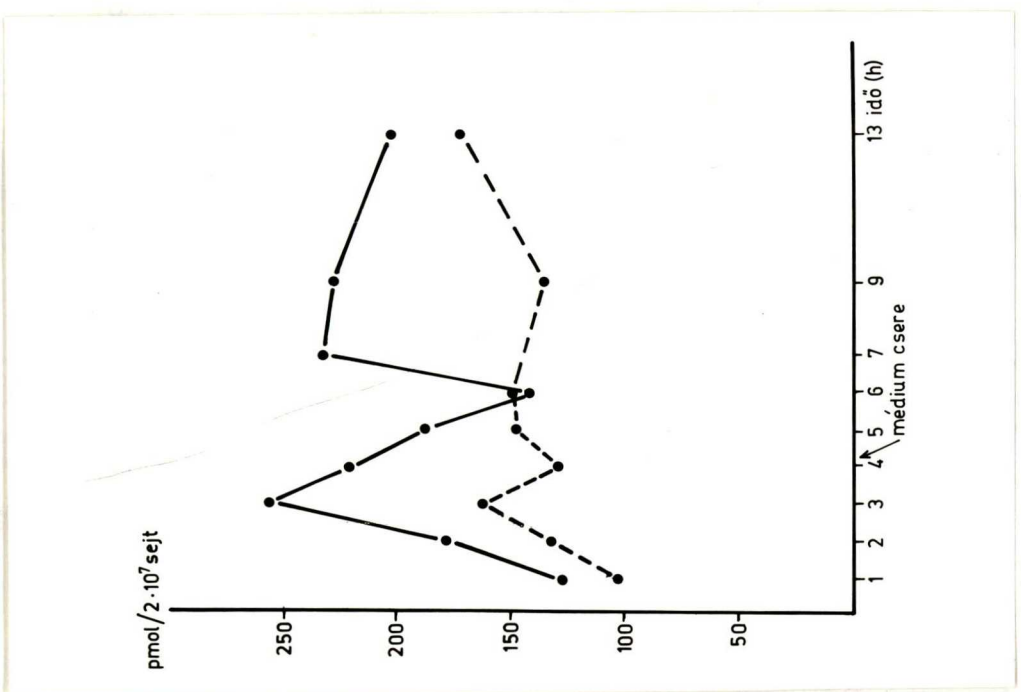
7. ábra ^{14}C palmitát turn-overe Ehrlich ascites sejtek PE frakciójában
—— 5 napos tumor;
—— 14 napos tumor

észtereknél is tapasztaltuk.

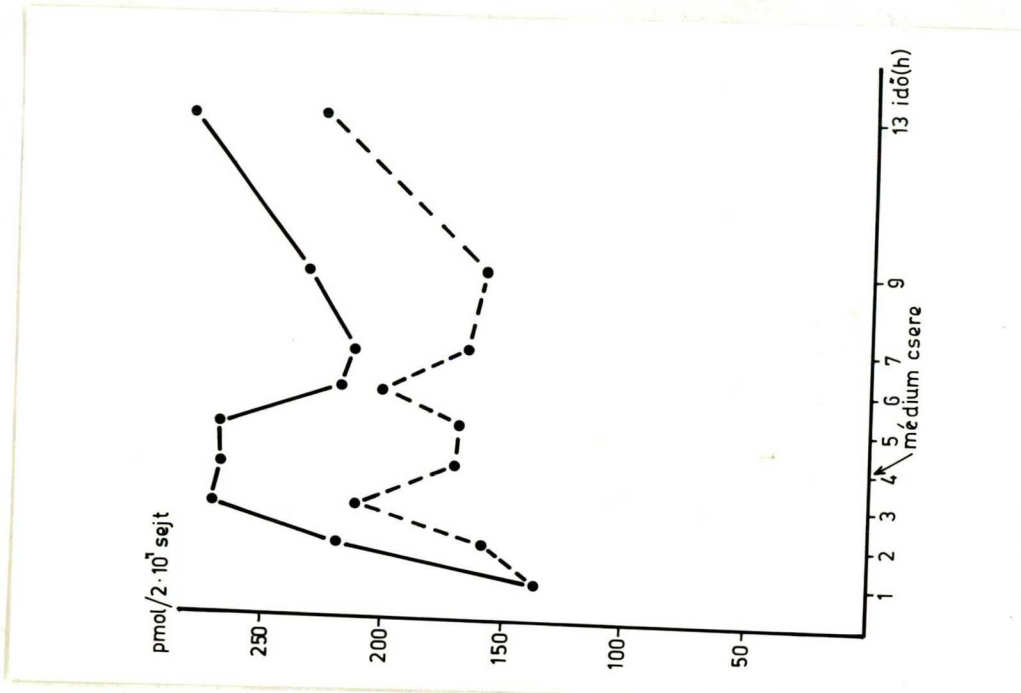
A szfingomielin frakcióban a ^{14}C palmitát degradációja eltér a PC és PE frakcióétól /8. ábra/. Az 5 napos tumor sejtekben a médium csere után 2 óra alatt lecsökkent a specifikus aktivitás 30 %-kal a frakcióban, de ezután feltehetően egy másik poolból ujabb radioaktivitás növekedés következett be. A 14 napos tumor sejtekben a ^{14}C palmitinsav beépülése az SM frakcióban sokkal kisebb mértékü volt, mint az 5 napos tumorból származó sejtekben és lényegében folyamatosan növekvő tendenciáju az inkubálás 7. órájáig.



8. ábra ^{14}C palmitát turn-overe Ehrlich ascites sejtek SM frakciójában
—— 5 napos tumor;
--- 14 napos tumor



9. ábra ^{14}C palmitát turn-overe Ehrlich ascites sejtek PS frakciójában
— 5 napos tumor;
-- 14 napos tumor



10. ábra ^{14}C palmitát turn-overe Ehrlich ascites sejtek PI frakciójában
— 5 napos tumor;
-- 14 napos tumor

A 9. és a 10. ábra tartalmazza a PS ill. a PI frakciókban a ^{14}C palmitát lebomlását, amely szintén bifázikus jellegü.

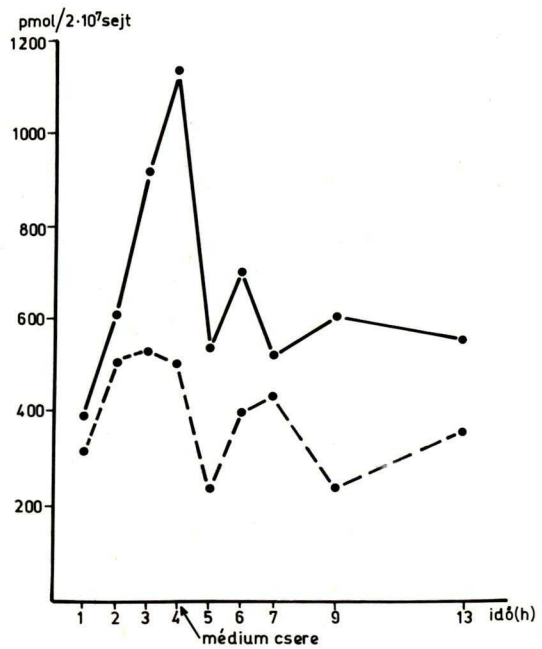
I./5. ^{14}C oleát beépülése 5 és 14 napos tumorból származó sejtek izolált foszfolipid frakcióiba

A ^{14}C olajsav esetén a jelölődés mértékének sorrendje az egyes frakciókban: PC > PE > PS > PI > SM > LPC, mindkét koru tumorból származó sejtben. Az egyes frakciók közötti %-os megoszlást a 3. táblázat tartalmazza.

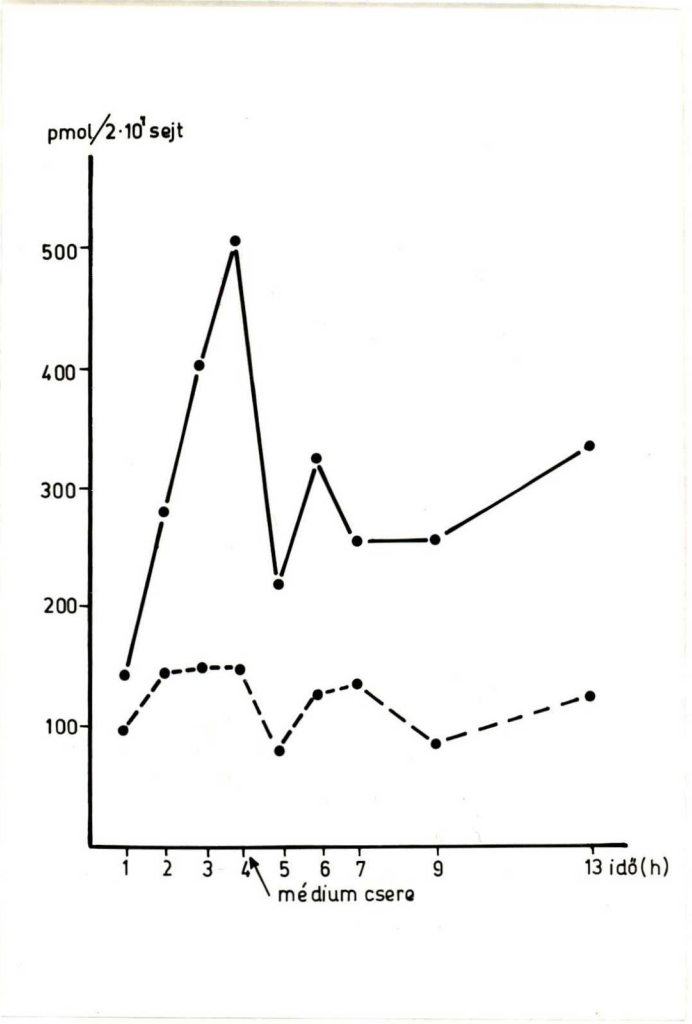
Jellemző volt, hogy a 14 napos tumorból származó sejteknél minden egyes foszfolipid frakcióban, és a vizsgálat minden egyes időpontjában jóval alacsonyabb volt a specifikus aktivitás, mint az 5 napos tumorból származó sejtekben /11, 12,13,14,15. ábra/. A ^{14}C olajsav beépülésének és lebomlásának kinetikája is egészen eltérő a kétféle koru tumor sejtpopulációban, az egyes zsirsav észter frakciókban. Az 5. napos tumorból származó sejtekben mindegyik vizsgált foszfolipid frakcióban /PC, PE, PS, PI, SM/ a jelzett zsirsavval való inkubálás alatt /1-4 óra/ a beépülés sebessége közel lineáris volt. A médium csere után a zsirsav utánpótlás hiánya a jelzett lipid észterek mennyiségét nagymértékben csökkentette. Ebben a szakaszban /4-5 óra/ a ^{14}C palmitinsavnál tapasztaltakhoz hasonlóan ill. még nagyobb mértékben lecsökkent a ^{14}C jelzett lipid észterek mennyisége. A vizsgálat további szakaszában /5-13 óra/ ez a mennyiség lényegében stabilan megmaradt, ha eltekintünk a feltehetően recirkulációból eredő kisebb ingadozásoktól. Az 5. napos tumorban tehát a ^{14}C olajsav az eddigiekhez hasonlóan bifázikus jelleggel bomlik le.

A 14 napos tumorból származó sejteknél a ^{14}C olajsav

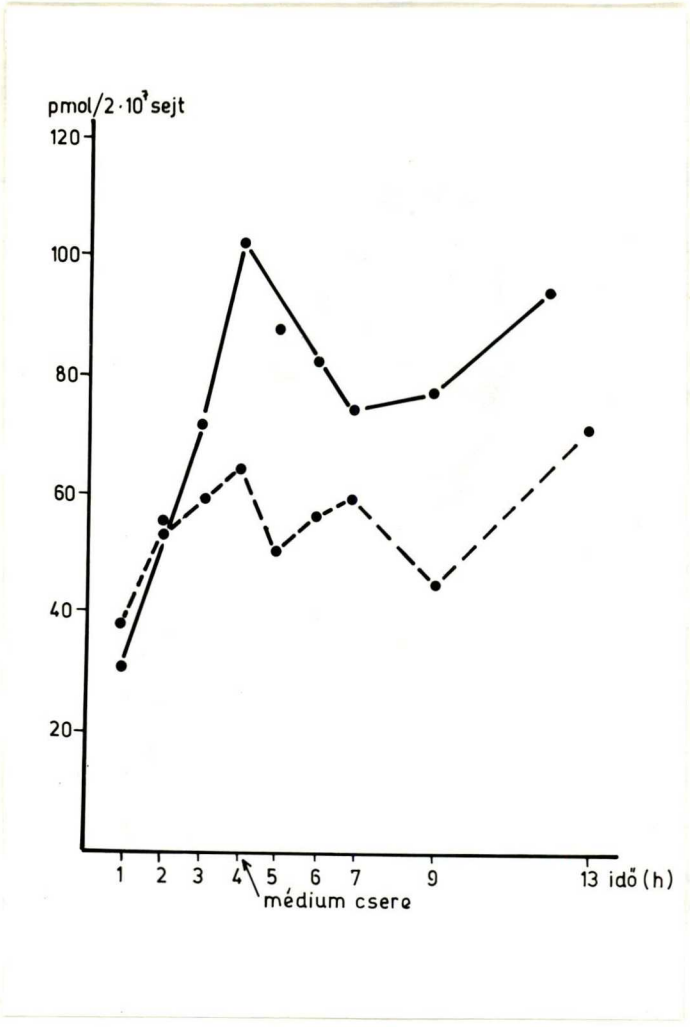
beépülése a PC, PE, PS, PI frakciókba csak a 2.-3. óráig fokozódik, és jóval kisebb mértékben, mint az 5. napos tumorból származó sejteknél volt tapasztalható. A médium csere után a maximálisan beépült ^{14}C olajsav mennyisége csökken ugyan a 4. és 5. óra között, de ezután feltehetően egy ujabb poolból való szabad zsirsav mobilizálódás következtében a maximálishoz közeli specifikus aktivitás volt jellemző a 13 órás szakaszban. A szfingomielin frakcióban pedig gyakorlatilag nem volt ^{14}C olajsav beépülés a 14 napos tumorból származó sejteknél. A 14 napos tumor sejteknél tehát némelyik PL frakcióban kimutatható ugyan a zsirsav degradáció bifázikus jellege, de az eleve alacsony beépülés és az 5-13. órás aktivitás növekedés miatt lényegében nagyon kismértékü a degradáció.



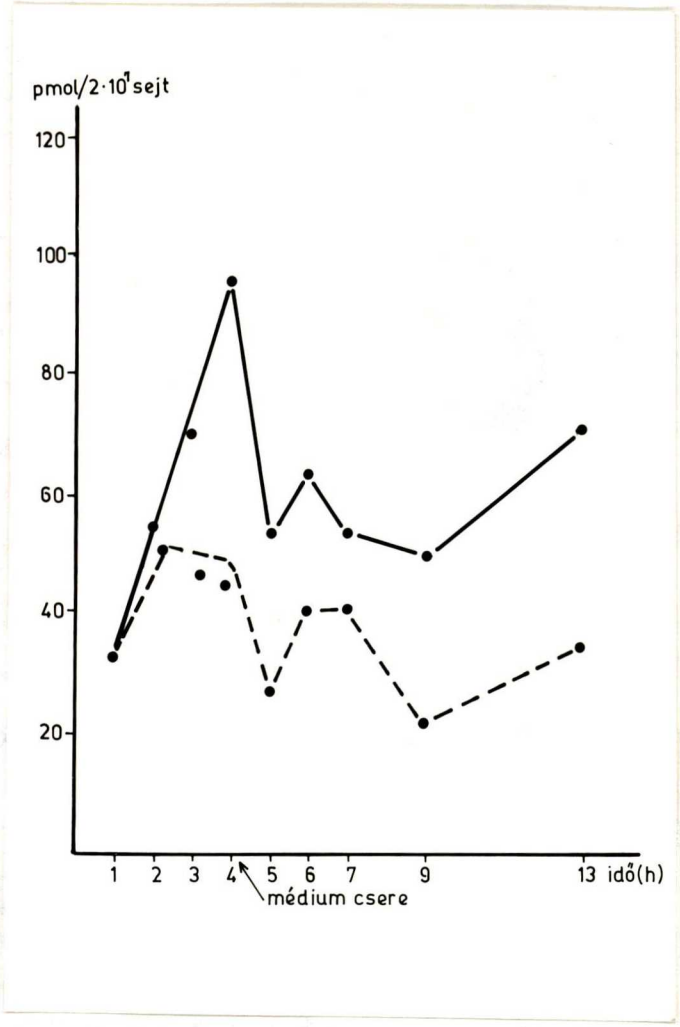
11. ábra ^{14}C oleát turn-overe Ehrlich ascites sejtek PC frakciójában
—— 5 napos tumor;
--- 14 napos tumor



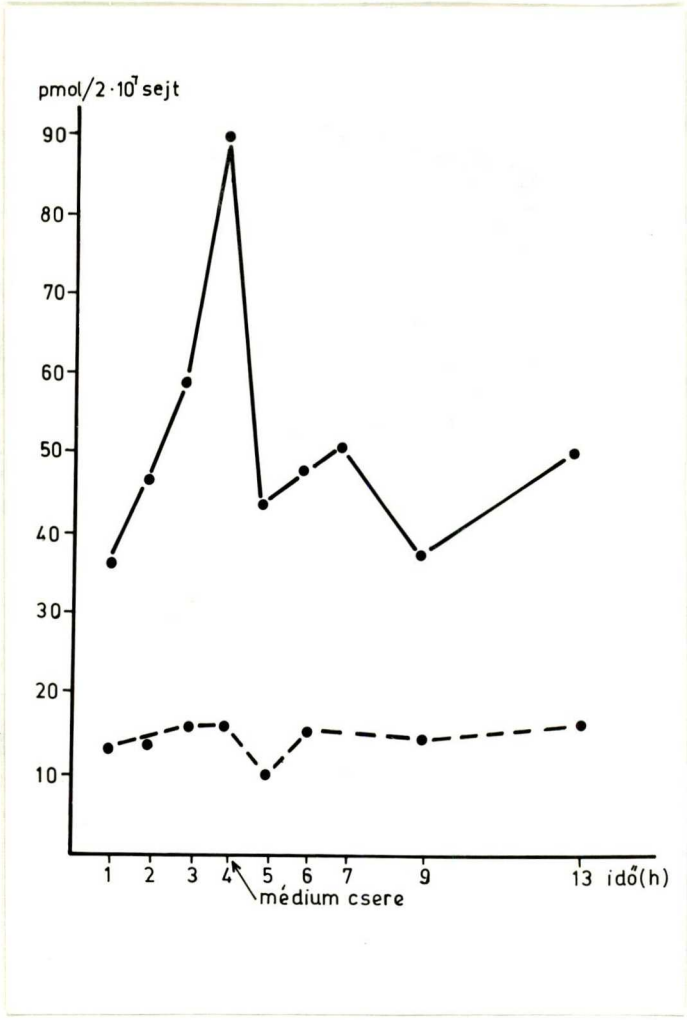
12. ábra ^{14}C oleát turn-overe Ehrlich ascites sejtek PE frakciójában
—— 5 napos tumor;
--- 14 napos tumor



13. ábra ^{14}C oleát turn-overe Ehrlich ascites sejtek PS frakciójában
—— 5 napos tumor;
---14 napos tumor



14. ábra ^{14}C oleát turn-overe Ehrlich ascites sejtek PI frakciójában
—— 5 napos tumor
---14 napos tumor



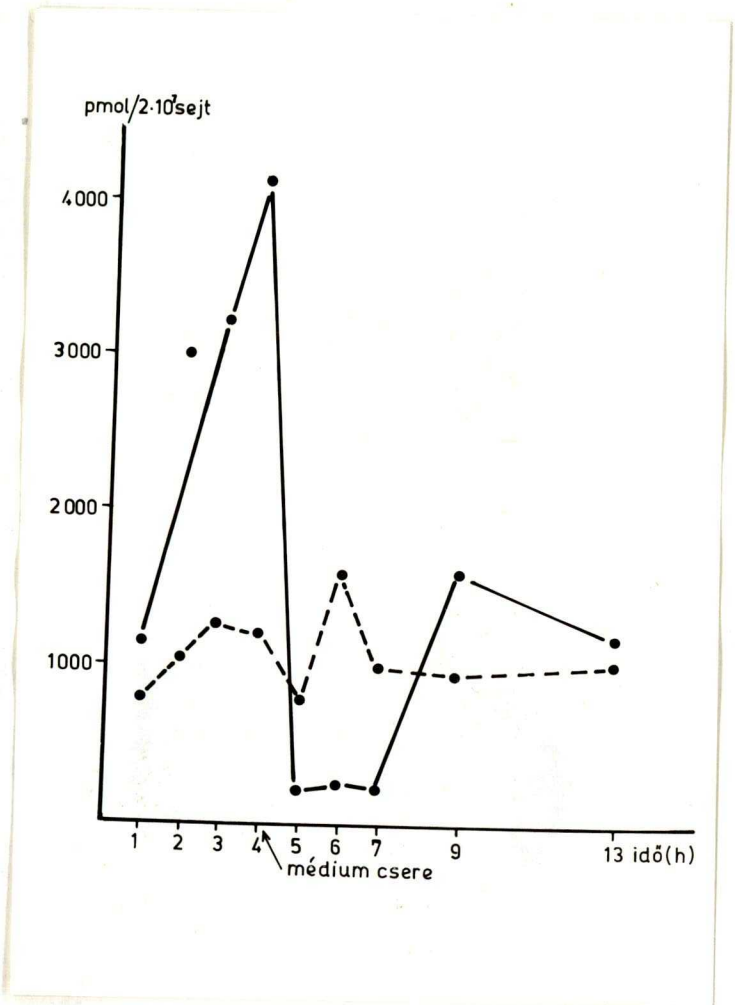
15. ábra ^{14}C oleát turn-overe Ehrlich ascites sejtek SM frakciójában
—— 5 napos tumor;
---14 napos tumor

I./6. ^{14}C oleát és ^{3}H palmitát együttes beépülése 5 és 14 napos tumor sejtek izolált foszfolipid frakcióiba

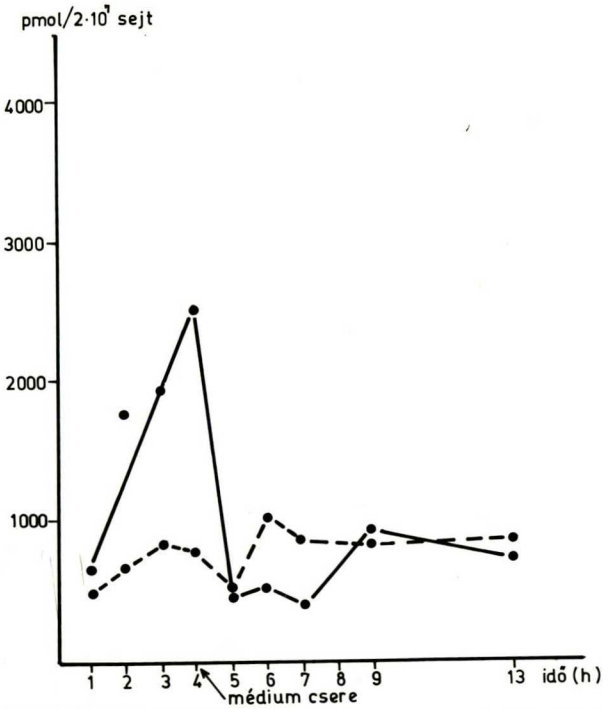
^{14}C oleáttal és ^{3}H palmitáttal inkubálva a sejteket, megfigyeltük, hogy két különböző zsirsav együttes alkalmazása, továbbá a kétszeres zsirsav koncentráció hogyan változtatja meg a beépülés és a lebomlás mértékét, ill. kinetikáját, továbbá azokat a paramétereket, amelyeket a csak egyféle zsirsav /csak palmitát, vagy csak oleát/ alkalmazásánál vizsgáltunk.

A 4. órában tapasztalt maximálisan beépült ^{14}C olajsav és ^{3}H palmitinsav mennyisége az egyes izolált foszfolipid frakciókban külön-külön mindkét zsirsav esetében kétszerese volt a csak egyféle zsirsavval való inkubálásnál tapasztalt maximális /4. órában mért/ beépülésnek, az 5 napos tumorból származó sejtekben. A médium csere után a fokozott felvételnek megfelelően fokozott mértékü a jelzett zsirsav vesztés is a lipid észter frakciókból. A kisérlet 7. órájától kezdve azonban minden foszfolipid frakcióban ismét növekedett a specifikus aktivitás, és ez az érték megegyezett az ebben a szakaszban a csak egyféle zsirsavval való inkubálásnál mért jellemző specifikus aktivitás értékekkel. A 14 napos tumorból származó sejtek két különböző zsirsavval való inkubálás esetén is jóval kevesebbet épitettek be mind ^{14}C olajsavból, mind ^{3}H palmitátból, mint az 5 napos tumorból származó sejtek. Érdekes azonban, hogy a két zsirsav egyidejü jelenléte ugyanugy kétszeresére növelte a ^{14}C oleát maximális felvéte-

lét a csak ^{14}C oleáttal való inkubáláshoz viszonyítva, mint az 5 napos tumor sejtek esetében, de a ^{3}H palmitát maximálisan beépíthető mennyisége alacsonyabb a csak egy szénsavval ^{14}C palmitáttal való inkubálásnál tapasztalt maximális értéknél. /16./ a., b. ábra/



16./a. ábra ^{3}H palmitát és ^{14}C oleát együttes turn-overe Ehrlich ascites sejtek PC frakciójában
—— 5 napos tumor ^{3}H palmitát;
--- 14 napos tumor ^{3}H palmitát



16./b. ábra ^{3}H palmitát és ^{14}C oleát együttes turn-overe Ehrlich ascites sejtek PC frakciójában
—— 5 napos tumor ^{14}C oleát;
--- 14 napos tumor ^{14}C oleát

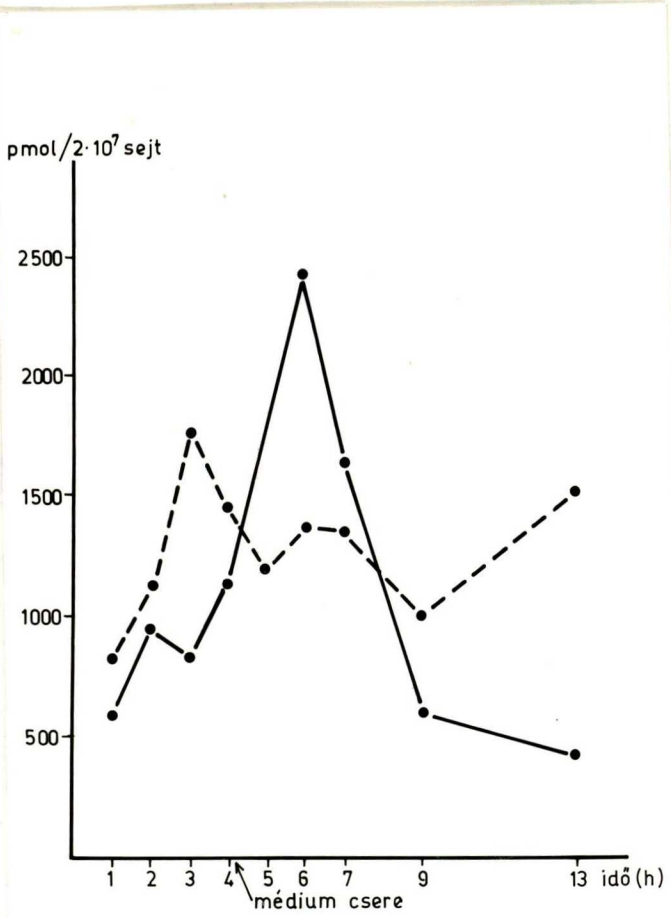
I./7. ^{14}C palmitát és ^{14}C oleát beépülése 5 és 14 napos tumor sejtek neutrális lipidjeibe

20 nmol/2x10^{7} sejt ^{14}C palmitinsav koncentráció mellett jóval több jelzett zsirsav épült be a foszfolipid frakciókba, mint a neutrális lipidekbe, mint ezt az 1. táblázat jelzett PL/NL adatai mutatják, az 5 napos tumorból származó sejtek esetében. A 14 napos tumor sejteknél azonban a jelzett PL/NL arányok jóval alacsonyabbak voltak. Ez ugy jöhetett létre, hogy a 14 napos tumor sejtek jelzett zsirsav felvétele a neutrális lipid frakcióba ugyanolyan mértékü, mint az 5 napos tumor sejteknél /17,18. ábra/, viszont a

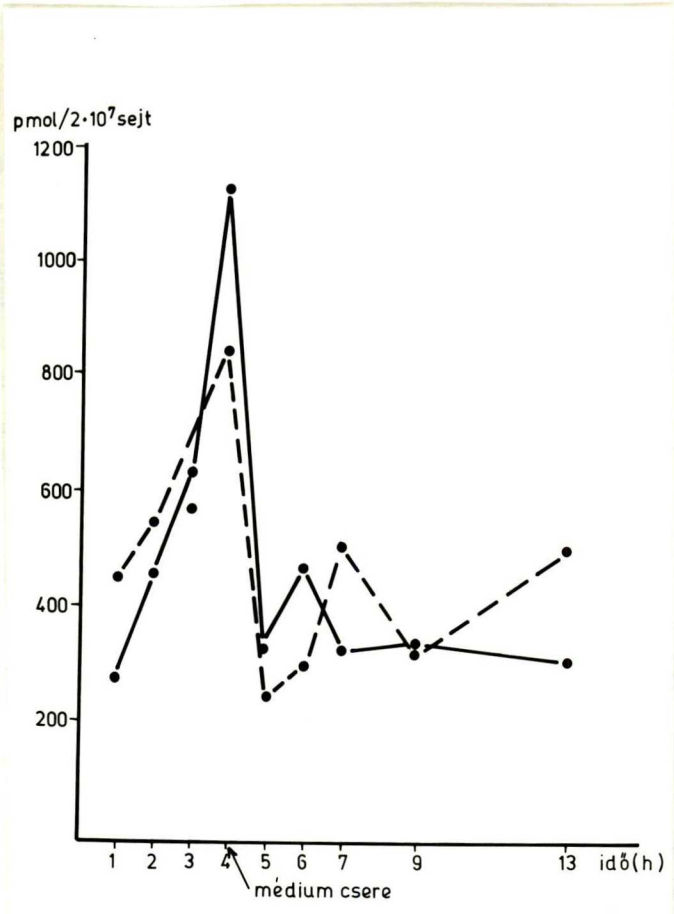
foszfolipidekbe, mint láttuk csökkent a felvétel, igy a 14 napos tumor sejtekben az összes beépült zsirsavak nagyobb hányada képezett neutrális lipid észtert, ezért itt jellemző az alacsony PL/NL arány /1. táblázat/.

^{14}C oleáttal és ^{3}H palmitáttal való együttes inkubálásnál, 40 nmol/2x10^{7} sejt össz. zsirsav koncentrációnál a PL/NL arányok mindkét jelzett zsirsavra nézve jóval alacsonyabbak voltak, mint a külön-külön 20 nmol/2x10^{7} sejt zsirsavkoncentrációval végzett kisérletek esetében /2. táblázat/. A magasabb zsirsav koncentráció tehát fokozta a neutrális lipidekbe való zsirsav beépülést. A 14 napos tumor sejtekben a PL/NL arány az 5 napos tumorhoz viszonyitva itt is alacsonyabb volt, a neutrális lipidekbe való nagymértékü beépülés miatt.

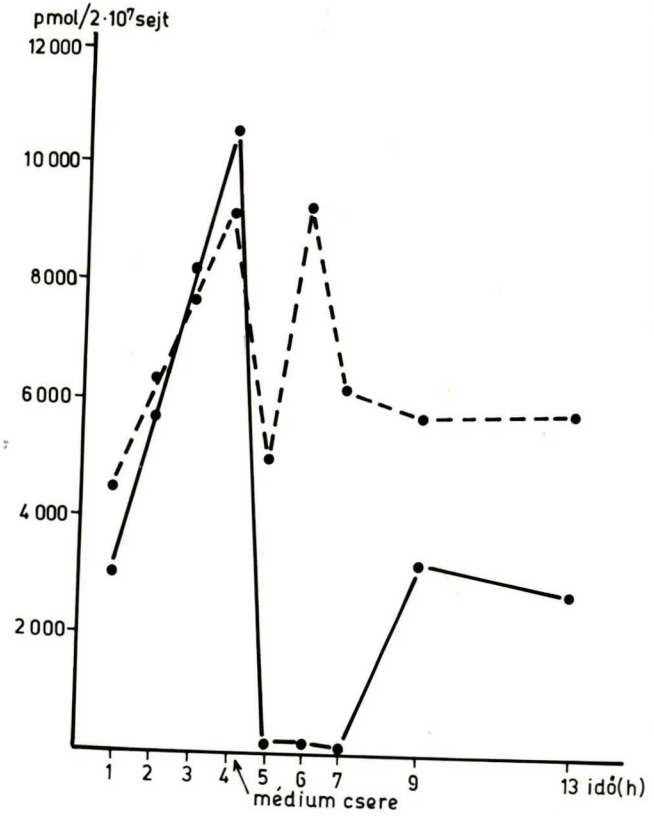
A beépülés és a lebomlás időfüggése a neutrális lipidekbe a foszfolipidekhez hasonló /19.a.b. ábra/. Az 1-4 órás jelzett zsirsavval való inkubálás szakaszában a specifikus aktivitás nő a lipid észterekben, majd a médium csere után 1 óra alatt lebomlott a jelzett zsirsavak jó része. Az utolsó 7-13 óráig tartó szakaszban a megmaradt és a recirkuláció következtében ujra beépült jelzett zsirsavak lassu bomlása volt jellemző.

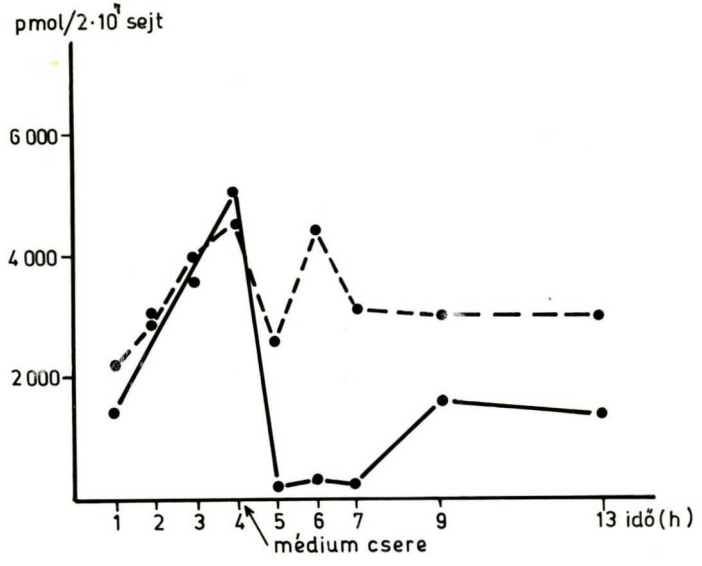


17. ábra ^{14}C palmitát turn-overe Ehrlich ascites sejtek neutrális lipidjeiben
—— 5 napos tumor;
– – – 14 napos tumor



18. ábra ^{14}C oleát turn-overe Ehrlich ascites sejtek neutrális lipidjeiben
—— 5 napos tumor;
– – – 14 napos tumor





19./a., b. ábra ^{3}H palmitát és ^{14}C oleát együttes turn-overe Ehrlich ascites sejtek neutrális lipidjeiben

a./ —— 5 napos tumor ^{3}H palmitát b./ —— 5 napos tumor ^{14}C oleát;
--- 14 napos tumor ^{3}H palmitát --- 14 napos tumor ^{14}C oleát

József Attila Tudományegyetem SZEGED Központi Könyvtár

II./ 5 és 14 napos tumorból származó sejtek foszfolipidjeinek és neutrális lipidjeinek zsírsavösszetétele

A sejtek lipid extraktumából izolált foszfolipid frakciók és neutrális lipidek zsírsavösszetételét a 4. táblázat adatai tartalmazzák.

Az egyes foszfolipideknek igen jellemző és egymástól eltérő volt a zsírsav tartalma. Az Ehrlich ascites tumor PC-re jellemző volt a tumor fejlődés mindkét szakaszában, hogy viszonylag kevés polién zsírsavat tartalmazott, és a zsírsavösszetétele nagyjából megegyezett a neutrális lipidekével. A PE frakcióra jellemző volt, hogy kevés 16:0-t és nagy mennyiségü 22:6-t tartalmazott. A PS frakcióban a legnagyobb mennyiségben 18:0 zsírsavak találhatók.
A PI frakció zsírsavösszetétele igen jellemző, mivel szinte kizárólag 18:0-ból és 20:4-ből áll.
Az SM-re jellemző a palmitinsav magas %-os aránya.

A tumor kora /nap/	PC		PE		PS		PI		SM		NL	
	5.	14.	5.	14.	5.	14.	5.	14.	5.	14.	5.	14.
16:0	20,19 ←	13,35	7,99 ←	4,85	5,22 ←	3,27	5,76 ←	3,89	55,10 ←	38,49	25,74 ←	13,55
18:0	16,92	17,71	20,06	16,44	41,70	38,02	42,25	37,34	11,41	11,28	14,16	18,29
18:1	21,95	18,60	16,46	10,32	12,79	16,97	4,64	6,22	1,72 →	7,05	19,76	19,86
18:2	23,35	22,94	18,74	15,97	15,34	20,08	5,63	8,29	5,07	6,40	15,83	19,61
20:4	5,98 →	8,55	9,96	10,97	3,01	4,56	30,66 →	35,95	4,48	8,17	3,83	5,47
22:4	1,70	2,29	3,21	3,84	3,75	5,45	3,44	3,55			8,54	7,17
22:4	1,10	1,35	1,53 →	12,53	1,87	2,85	1,65	1,33	15,56 →	30,28	4,96	4,62
22:5	1,12	1,70	1,35	3,21	2,58	1,83	1,56	1,79			2,23	0,84
22:6	4,59 →	7,72	13,71	13,38	7,24	6,54	3,17	2,32			6,62	5,29

4. táblázat 5. és 14. napos tumor sejtek izolált foszfolipid frakcióinak és neutrális lipidjeinek zsirsavösszetétele.

Az adatok relativ %-ban vannak kifejezve.

Az 5 napos és a 14 napos tumorból származó sejtek izolált foszfolipid frakcióinak és neutrális lipidjeinek zsírsavösszetételét összehasonlítva a következő eredményre jutottunk:

1./ A 16:0 %-os aránya minden egyes foszfolipid frakcióban és a neutrális lipidekben is magasabb az 5 napos tumorból származó sejtekben.

2./ A polién zsírsavak /20:4; 22:4; 22:6/ aránya megnőtt a 14 napos tumorból származó sejtekben.

A foszfolipid és neutrális lipid zsírsavösszetétel alapján az 5. táblázat néhány, a különböző koru tumor sejtekre jellemző arányt tartalmaz.

A 16:0/18:0 arány a nagyobb palmitinsav tartalom következtében magasabb az 5 napos tumorból származó sejtek mindegyik foszfolipid frakciójában és a neutrális lipidekben is. A telített/polién zsírsavak aránya a 14 napos tumor sejtek foszfolipid frakcióiban és a neutrális lipidekben lecsökken a polién zsírsavtartalom növekedése következtében.

A tumor kora /nap/	PC		PE		PS		PI		SM		NL	
	5.	14.	5.	14.	5.	14.	5.	14.	5.	14.	5.	14.
16:0 / 18:0	1,19	0,75	0,39	0,29	0,13	0,08	0,14	0,10	4,83	3,41	1,82	0,74
telített / polién	2,56	1,44	0,94	0,48	2,54	1,95	1,19	0,92	3,32	1,29	1,42	1,36

5. táblázat 5. és 14. napos tumor sejtek zsírsavösszetételének jellemző arányai. Az arányokat a relativ %-os összetétel adataiból számoltuk.

III./ ^{14}C acetát beépülése 5 és 14 napos tumorból származó sejtek foszfolipidjeinek zsírsavláncába

Fiziológiás körülmények között, mint azt az irodalmi összefoglalóban említettük, az Ehrlich ascites tumor de novo zsírsav szintézise 2 szénatomos egységekből elhanyagolható, a sejtek főleg az ascites folyadékból veszik fel már kész formában a szükséges zsírsavakat. Lipidmentes médiumban, in vitro körülvények között azonban a főbb zsírsavakba való jelzett acetátnak, mint zsírsav prekurzornak a beépülését követni lehet, és így következtetni tudunk a sejtek potenciális de novo zsírsav szintetizáló képességére.

A ^{14}C acetát beépülését 1, 2, ill. 3 órával a jelzett anyag hozzáadása után a 6. táblázat tartalmazza. Az igen kismértékű jelzett anyag beépülés miatt, csak a legnagyobb mennyiségben előforduló zsírsavak esetében lehetett következtetéseket levonni. Alapvető különbséget tapasztaltunk: 1./ a jelzett palmitinsav, 2./ sztearinsav, 3./ arahidonsav %-os arányában:

1./ Az 5 napos tumorból származó sejteknél a ^{14}C acetátból képződött jelzett 16:0 zsírsavak %-os mennyisége nagyobb, mint a 14 napos tumorból származó sejtekben. A jelzettség mértéke az inkubációs idő alatt folyamatosan nő, tehát a ^{14}C acetát prekurzorból folyamatosan történik palmitinsav szintézis az 5 napos tumor sejtekben.

2./ A 14 napos tumorból származó sejtekben ezzel szemben a

18:0 zsirsav jelzettségének mértéke magasabb, mint az 5 napos tumorban, ennekben a sejtekben nem jellemző a folyamatos palmitinsav szintézis.

3./ A 14 napos tumorból származó sejtekben a 20:4 jelzett zsirsav %-os aránya szintén magasabb, mint az 5 napos tumornál.

Inkubációs idő ^{14}C acetáttal	5. nap			14. nap		
	1^h	2^h	3^h	1^h	2^h	3^h
14:0	2,3	2,1	1,5	2,0	1,0	1,8
16:0	18,2	22,0	32,0	17,1	13,0	18,6
16:1	4,3	4,8	5,1	3,5	2,9	2,9
18:0	16,6	16,7	15,1	28,6	22,9	25,0
18:1	28,5	28,6	24,4	26,3	26,1	20,5
18:2	20,9	16,5	14,1	16,6	21,0	19,6
20:1	0,6	0,7	0,6	0,7	0,4	1,0
20:2	0,7	0,8	0,5	1,4	0,9	0,8
20:3	0,6	0,7	0,9	0,7	0,9	1,5
20:4	5,7	6,5	3,8	11,0	8,5	6,4

6. táblázat 5. és 14. napos tumor sejtek zsirsav szintézise ^{14}C acetátból, relativ %-ban kifejezve.

IV./ ^{14}C kolin beépülése 5 és 14 napos tumorból származó sejtek PC és SM frakcióiba

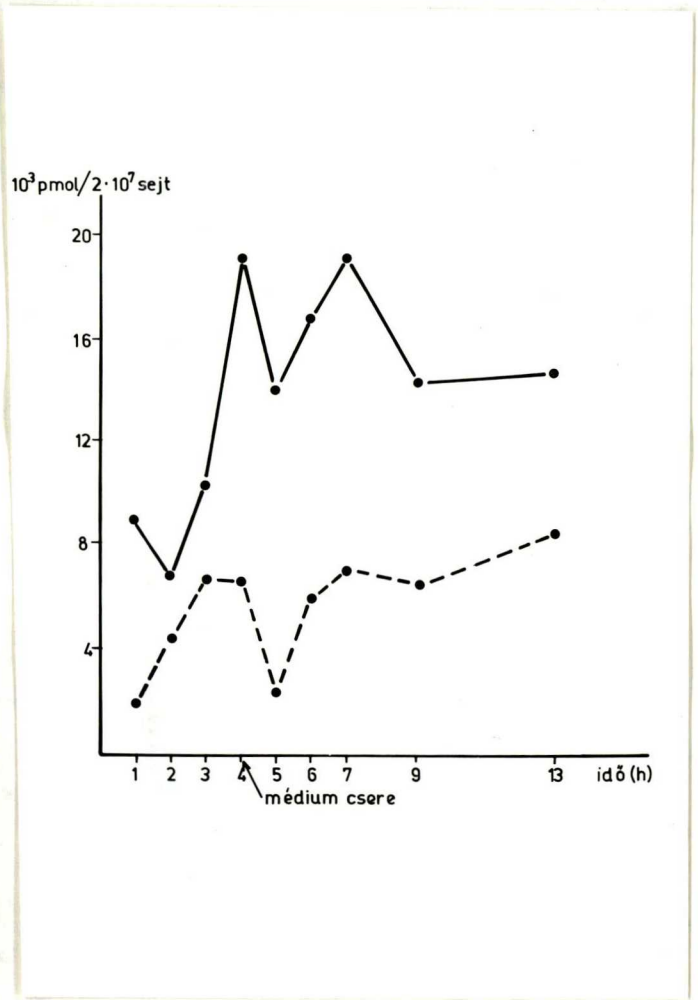
Mint azt az irodalmi összefoglalóban említettük a kolin és etanolamin az aktivált bázisokon CDP kolin és CDP etanolaminon keresztül kapcsolódik a foszfolipid bioszintéziséhez /1. ábra/. ^{14}C jelzett kolinnal és etanolaminnal

ezt a folyamatot lehet vizsgálni, amely során 1,2 diacil glicerinből és aktivált bázisokból a kolinfoszfotranszferáz enzim működéssel létrejönnek a kész diacil foszfolipidek. A megfelelő PC diacilglicéridekből azonban a ^{14}C kolin - CDP kolin bioszintetikus ut megfordulásával a CDP kolinon keresztül - bekerülhet a szfingomielin frakcióba is.

A ^{14}C kolin beépülését 5 és 14 napos Ehrlich ascites tumor sejtek PC frakciójába a 20. ábra tartalmazza. Az 5 napos tumor sejtek ^{14}C kolin felvétele /50 nmol/2x10^7 sejt/ az 1-4 órás inkubálás során lineáris volt. A 4. órában még nem volt egyensulyban a külső jelzett kolin pool és a sejten belüli jelzett PC mennyisége. A médium csere után 1 óra alatt egy gyors, de nem jelentős mennyiségü specifikus aktivitás csök enést tapasztaltunk a PC frakcióban, azonban 1 óra mulva a frakcióban ujra a 4. órás maximális aktivitást mértük, amely a kisérlet további 6 órájában kb. 1/5 részével csökkent, és ezután állandó maradt.

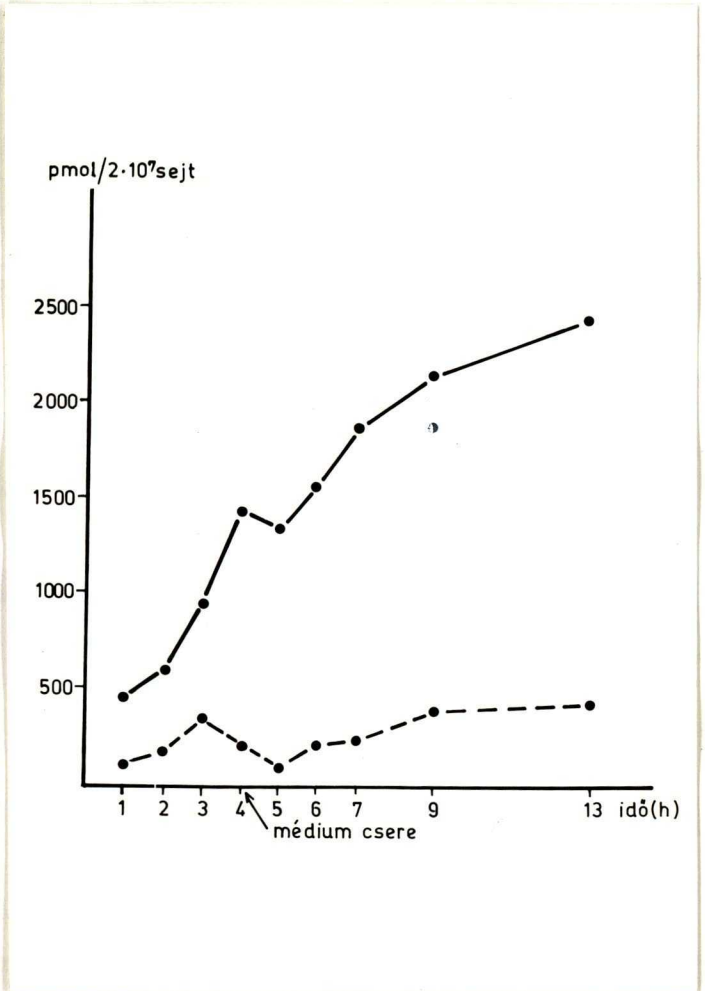
A 14 napos tumorból származó sejtekben a külső jelzett és a belső kolin pool már feltehetően az inkubálás 3. órájában egyensulyba került, mert további ^{14}C kolin beépülés már nem volt mérhető a PC frakcióban. Igy a 14 napos tumorból származó sejtekben a PC frakcióba való ^{14}C kolin beépülés maximuma csak kb. az 1/3-a volt az 5 napos tumorban tapasztalhatónak. A médium csere után ezekben a

sejtekben is csak átmenetileg volt tapasztalható specifikus aktivitás csökkenés a PC frakcióban, de a maximálisan mért aktivitás 1 órán belül visszaállt és a kisérlet további szakaszában már egyáltalán nem csökkent a ^{14}C PC mennyisége.



20. ábra ^{14}C kolin turn-overe Ehrlich ascites sejtek PC frakciójában
—— 5 napos tumor;
--- 14 napos tumor

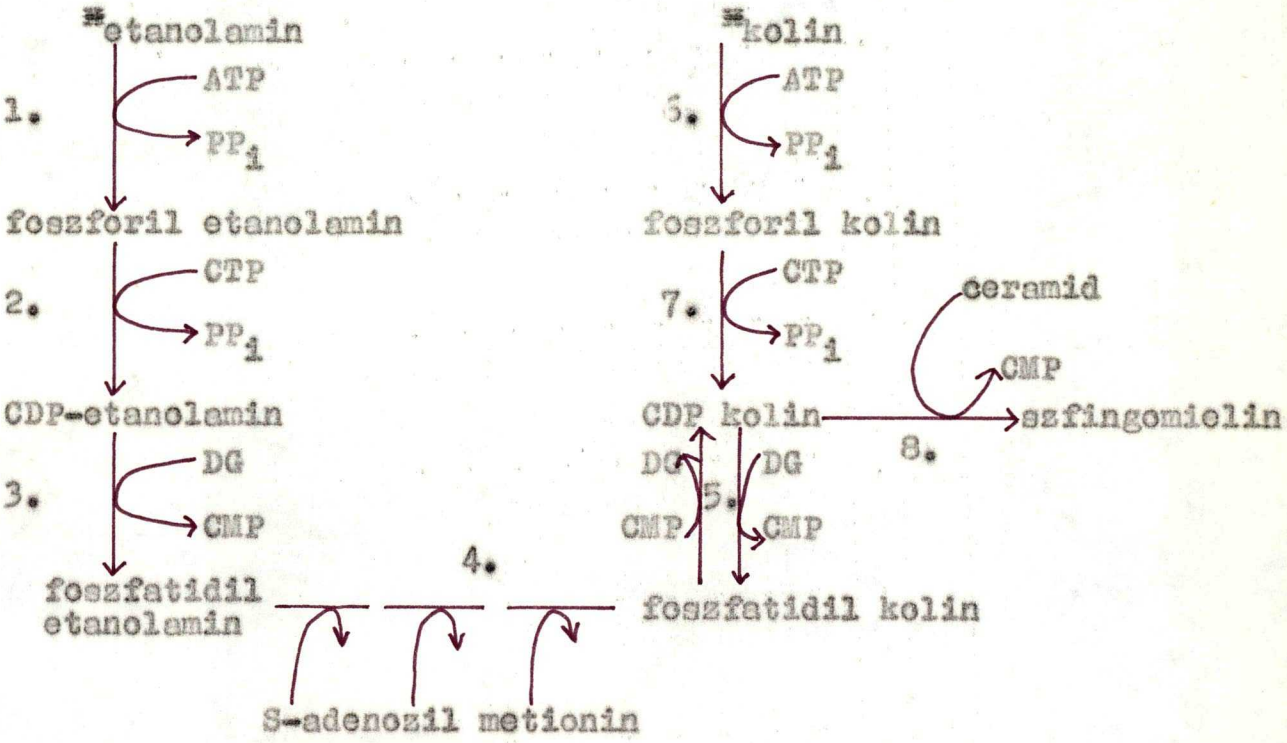
A ^{14}C PC frakcióból a jelzett kolin megjelenését mérve a szfingomielin frakcióban azt tapasztaltuk, hogy ez folyamatos tendenciáju az 5 napos tumorból származó sejtekben, és a médium cserétől függetlenül a jelzett kolin utánpótlás megszünése után is folytatódik. A 14 napos tumorból származó sejteknél az 5 napos tumorhoz képest jelentéktelen mértékü a PC-ból az SM-be történő jelzett kolin transzport /21. ábra/.



21. ábra ^{14}C kolin turn-overe Ehrlich ascites sejtek SM frakciójában
—— 5 napos tumor;
--- 14 napos tumor

V./ ^{14}C etanolamin beépülése 5 és 14 napos tumorból származó sejtek PE, PC és SM frakcióiba

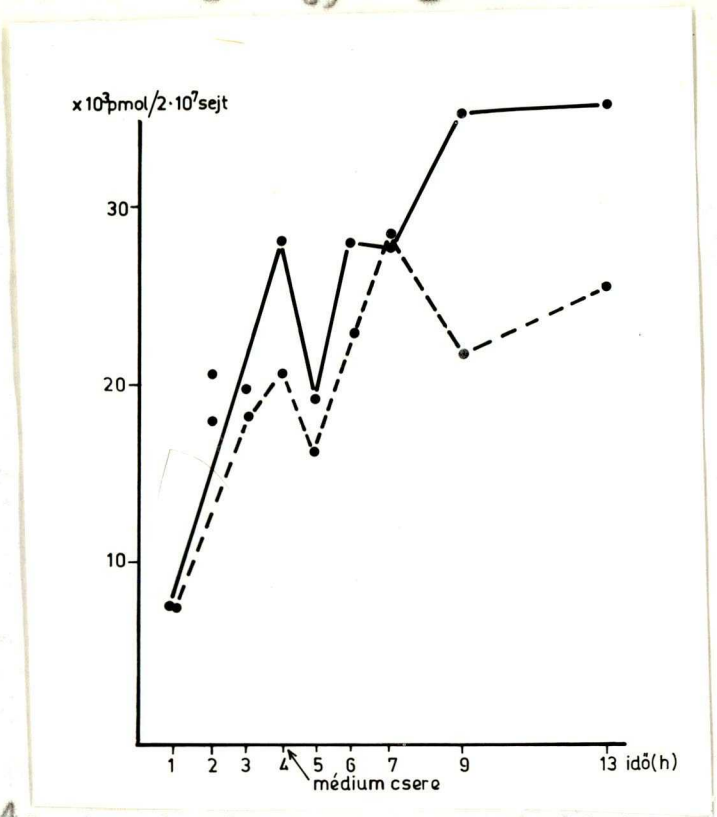
^{14}C etanolamin segítségével a PE bioszintézist CDP etanolaminon keresztül, illetve bizonyos PC és SM frakciók szintézisét a metilációs folyamaton keresztül lehet vizsgálni. Ehrlich ascites sejtekben is leírták a metilációs anyagcsereut működését /35/, amely során a jelzett etanolamin beépül mind a PC, mind az SM frakciókba /22. ábra/.



22. ábra Foszfolipid metabolizmus ismert utjai. Az etanolamin metilációval beépül a PC frakcióba /1-5/ és az SM frakcióba /1-5 és 8/.

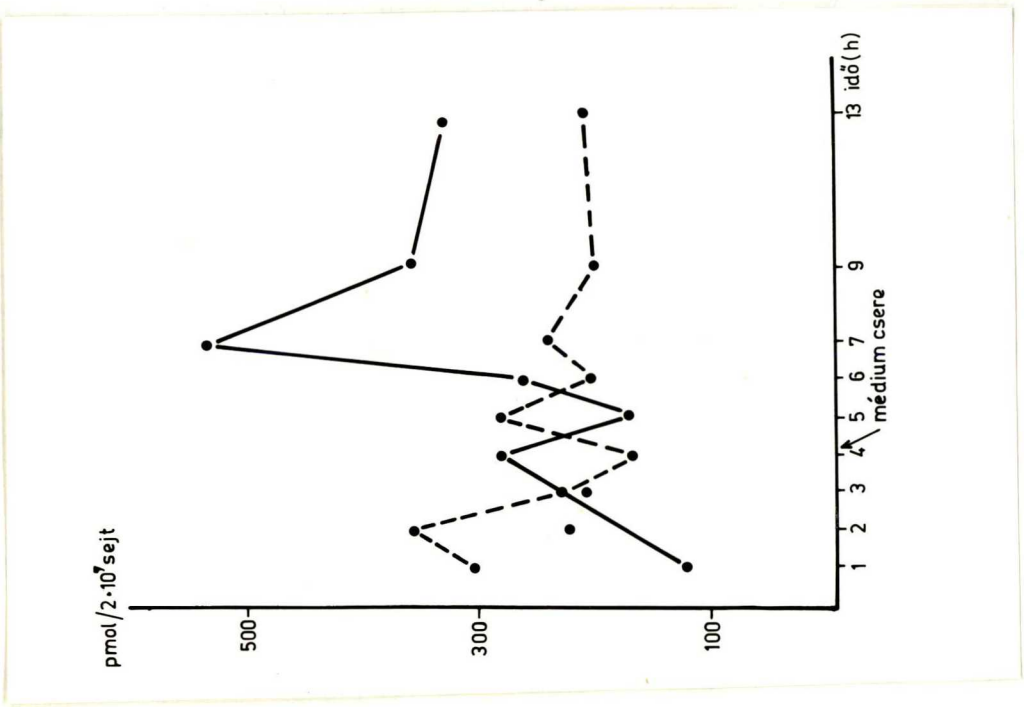
József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED

A ^{14}C etanolamin az inkubálás ideje alatt /1-4 óra/ folyamatosan épült be mindkét koru sejtpopuláció PE frakciójába. /23. ábra/. A külső ^{14}C etanolamin pool és a sejtek belső jelzett PE tartalma között még feltehetően nem következett be az egyensulyi állapot az inkubáció 4. órájában. A médium csere után átmenetileg mindkét sejtben csökkent a beépülés mértéke, azonban a médium csere utáni 2. órában egy ujabb nagyon gyors specifikus aktivitás növekedést tapasztaltunk a PE frakcióban, amely növekedés jóval meghaladta a 4. órában tapasztalt értéket, amikor még a jelzett etanolamin benne volt az inkubáló médiumban. A PE frakcióban tapasztalt aktivitás növekedésnek ez a második szakasza talán ugy magyarázható, hogy a PE frakcióból a jelzett etanolamin a metilációs anyagcsere után keresztül távozik a PC illetve SM frakciókba, és igy további ^{14}C etanolamin beépülést tesz lehetővé a sejten belüli ^{14}C etanolamin poolból. A PE frakció specifikus aktivitásának növekedése a 6. órától mindkét koru tumor sejt populációra jellemző, azonban a beépülés maximuma az 5 napos tumorból származó sejtekben jóval magasabb, mint a 14 napos tumor sejtekben.



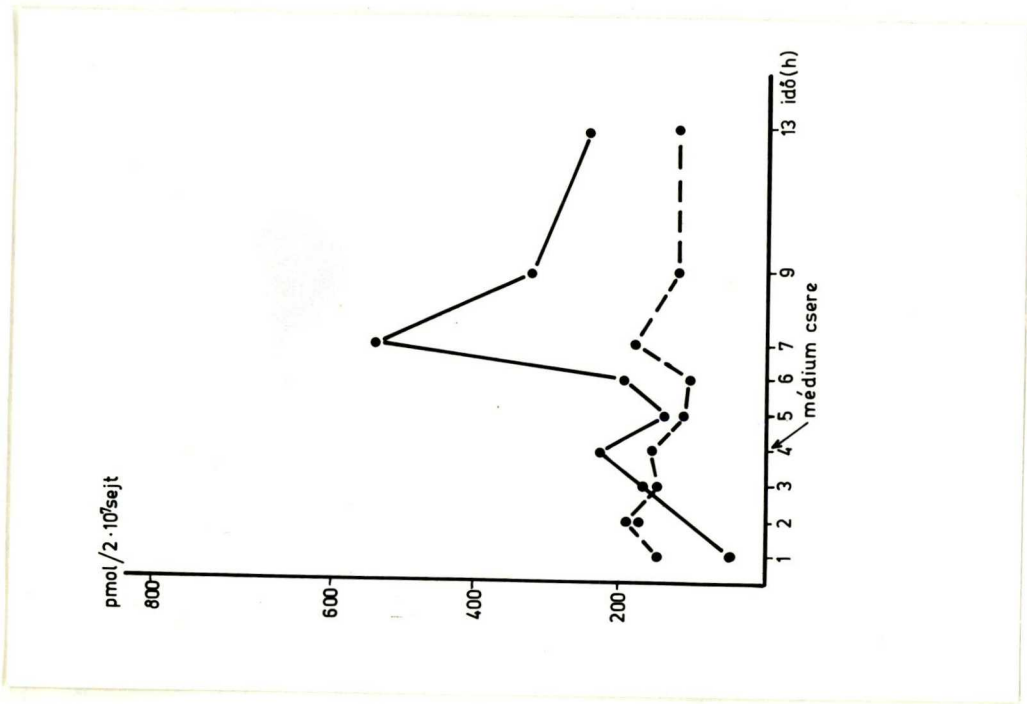
23. ábra ^{14}C etanolamin turn-overe Ehrlich ascites sejtek PE frakciójában
—— 5 napos tumor; --- 14 napos tumor

A PC frakcióban a specifikus aktivitás növekedése ^{14}C etanolaminnal való inkubálás során egybeesett a PE frakcióban tapasztalt ^{14}C aktivitás csökkenésével /5-7 óra/. Igy a 24. ábrán látható specifikus aktivitás csucs a PC frakcióban a metilációs anyagcsere következtében létrejött PC molekulákat jelenti, az 5 napos tumorból származó sejtekben. Ezzel szemben a 14 napos tumorból származó sejtek PC frakciójában a ^{14}C etanolamin jelzéssel alacsony és lecsengő a specifikus aktivitás időgörbéje, ami a metilációs anyagcsereut hiányára, illetve csökkent működésére utal.



24. ábra ^{14}C PE - ^{14}C PC átalakulás Ehrlich ascites sejtekben
—— 5 napos tumor;
--- 14 napos tumor

Lényegében ugyanilyen specifikus aktivitás görbéket kaptunk az SM frakcióban is /25. ábra/. Itt is csak az 5 napos tumorból volt kimutatható a specifikus aktivitás jellegzetes csucsa az 5-7 óra között, a 14 napos tumorból származó sejtekben jelentéktelen a metilációs anyagcserével létrejött SM mennyisége.



25. ábra ^{14}C PE - ^{14}C SM átalakulás Ehrlich ascites sejtekben
—— 5 napos tumor;
--- 14 napos tumor

VI./ 5 és 14 napos tumorból származó sejtek foszfolipid összetétele

A 7. táblázat tartalmazza az 5 és 14 napos tumorból származó sejtek %-os foszfolipid összetételét. A kétféle koru tumor sejt foszfolipidjei közül a PC, PE és az SM frakcióban tapasztaltunk eltérést. Ezek az eltérések megfelelnek a ^{14}C kolin és ^{14}C etanolamin beépüléssel végzett kisérletek eredményeinek. A 14 napos tumorból származó sejtekben a PC és az SM tartalom feltehetően a metilációs anyagcsereut hiánya következtében lecsökkent, mig ugyanebből az okból a PE tartalom ezekben a sejtekben na-

gyobb. A többi foszfolipid frakció mennyiségében nem találtunk eltérést.

%	5. nap	14. nap
PC	44,8 ←	33,2
PE	18,9 →	31,8
PS	3,5	6,8
PI	7,8	7,7
SM	12,9 ←	8,1
LPC	5,5	6,3
DPG	6,6	6,1

7. táblázat 5. és 14. napos sejtek foszfolipid összetétele

VII./ 5 és 14 napos tumorból származó sejtek plazma membrán rotációs fluiditásának mérése

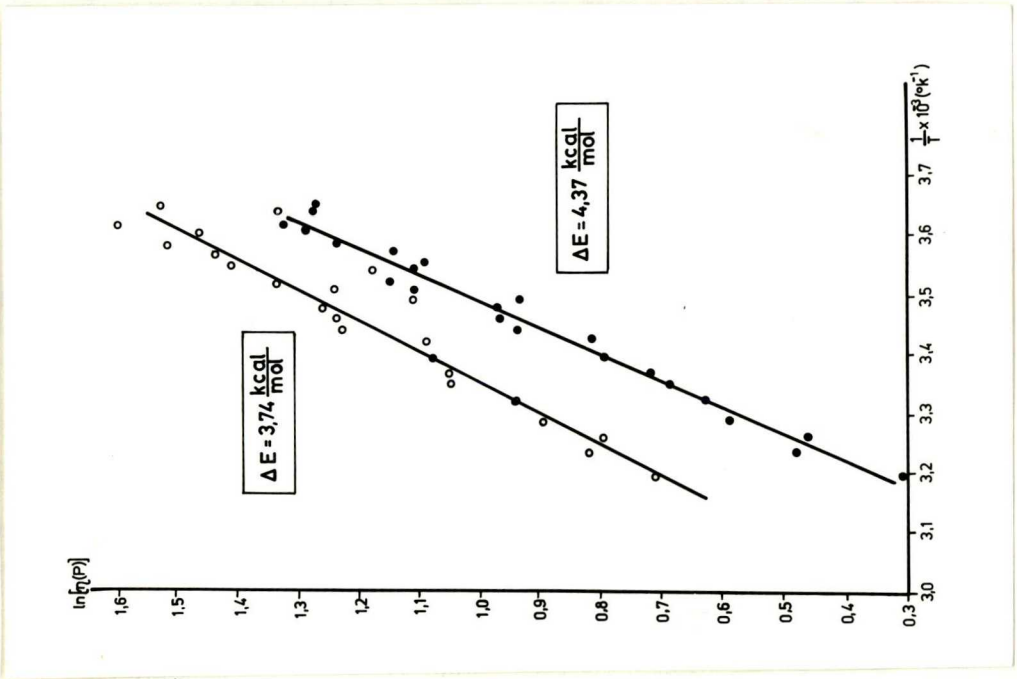
A fluoreszcens polarizáció mérése, valamint az anizotrópia és mikroviszkozitás meghatározása a módszerek fejezetben leirtak alapján történt.

A 8. táblázat tartalmazza a 0°C-on mért plazma membrán fluoreszcens anizotrópia és mikroviszkozitás értékeit külön az 5 napos és külön a 14 napos tumor sejtekből származó preparátumban. A 14 napos tumorból izolált plazma membrán fluoreszcens anizotrópia értékei 6 egymástól független preparátumban 0°C-on mérve minden esetben és jelentősen alacsonyabbak voltak az 5 napos tumor sejt membránban mért értékeknél.

	5. nap		14. nap	
	r	η	r	η
1.	0,206	3,69	0,196	3,26
2.	0,246	6,18	0,221	4,46
3.	0,244	6,01	0,210	3,88
4.	0,238	5,55	0,201	3,47
5.	0,198	3,34	0,186	2,88
6.	0,216	4,19	0,192	3,10

8. táblázat DPH-val jelölt 5. napos és 14. napos tumorból származó plazma membrán $0^{o}C$-on mért fluoreszcens anizotrópia /r/ értékei és mikroviszkozitása /η/, 6 egymástól független preparátumban

A DPH-val jelölt plazma membrán fluoreszcens polarizációjának hőmérsékletfüggése a $0^{o}C$-$40^{o}C$-os tartományban közelitőleg lineáris volt /26. ábra/, a tumor növekedés mindkét periódusából származó sejtben. Kifejezett töréspont ami fázisseparációra utalna, nem volt tapasztalható. A ΔE aktivációs energia mindkét sejt membrán preparátumban $\sim$4,8 kcal/mol volt. Mindamellett a 14 napos tumorból származó plazma membrán fluoreszcens polarizáció foka az egész hőmérséklet tartományban mérve alacsonyabb volt az 5 napos tumor membrán-DPH polarizációs fokának értékeinél.



26. ábra DPH-val jelölt plazma membrán mikroviszkozitásának hőmérsékletfüggése
○—○ 5 napos tumor
●—● 14 napos tumor

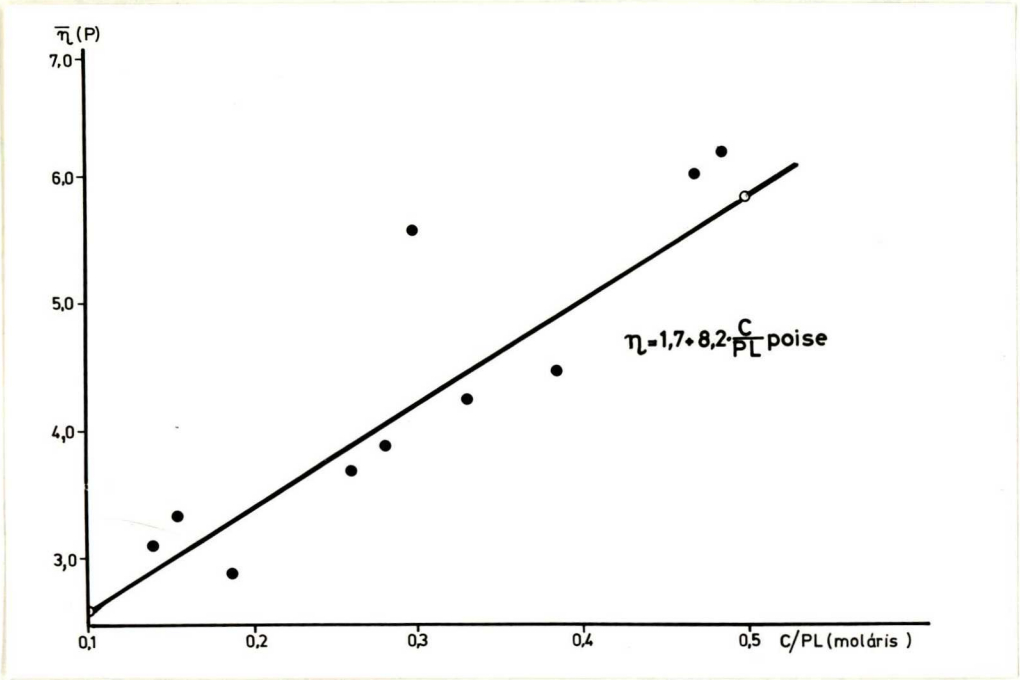
VIII./ A rotációs fluiditás és a membrán koleszterin/foszfolipid /C/P/ moláris arányának összefüggése

Az izolált membrán preparátumokban meghatároztuk a C/P moláris arányát. Nyolc egymástól független kisérletben az átlagos C/P arány az 5. napos tumorból származó sejtekben: 0.361 ± 0.043; és a 14 napos tumor sejtekben 0.251 ± 0.032 volt A két sejt C/P arányában ez a különbség szignifikáns, $P < 0.02$ a Student teszt alapján.

Vizsgáltuk, hogy a fluoreszcens anizotrópia mért értékei hogyan korrelálnak a membrán C/P moláris arányával. A 27. ábrán látható, hogy ha a mikroviszkozitás /η/ értékeit a C/P moláris arány függvényében ábrázoljuk közel egy egyenest kapunk. A korrelációs együttható: 0.90056. A Student-teszt alapján a mikroviszkozitás és a C/P moláris

arány közötti korreláció szignifikáns: $P < 0.001$.

Tehát a 14 napos tumorból származó sejt membrán rotációs fluiditása nagyobb, mint az 5 napos tumorból származó sejt membráné, és ez a fluiditás-növekedés korrelációban van a sejt membrán C/P moláris arányának csökkenésével.



27. ábra DPH-val jelölt plazma membrán mikroviszkozitása a C/PL hányados függvényében

Értékelés

Az általunk tett megfigyelésekből és mások eddig ismert eredményeiből az alábbi következtetéseket vonhattuk le az Ehrlich ascites tumor lipid anyagcseréjének néhány kiragadott részproblémájával és a lipidanyagcserével összefüggő membrán szerkezettel kapcsolatban:

1./ A tumor sejtek lipid észtereiben állandó és folyamatos zsirsav turn-over folyik, amint ezt a ^{14}C oleát és ^{14}C palmitát beépülésével kapcsolatos kisérleteknél tapasztaltuk. A két zsirsav turn-overe eltérő mértékü, a palmitinsavnak 9 óra alatt mintegy 30 %-a, az olajsavnak mintegy 53 %-a bomlik le.

A zsirsavak turn-overe függ attól, hogy a sejtek a tumor proliferáció melyik szakaszában vannak. Az 5 napos tumorból származó sejtekben a zsirsav beépülés és lebomlás mértéke egyaránt nagyobb, mint a 14 napos tumorból származó sejtekben. A beépülés és lebomlás kinetikája szintén eltérő a két sejtpopulációban. Az 5 napos sejteknél a zsirsavak beépülésére jellemző, hogy az gyors és közel lineáris folyamat, az inkubálás 4 órája alatt. A degradáció bifázikus jellegü mindegyik észter frakcióban - egy gyors /4-5 óra/ és egy lassu /6-13 óra/ szakasza van. Ez különösen a PC frakciónál egyértelmü, a zsirsavak lebomlásából arra lehet következtetni, hogy ez a foszfolipid frakció a legin-

kább instabil /3. táblázat/. A jelzettség mértéke ebben a frakcióban a degradáció során az összes foszfolipid jelzettségének csökkenéséhez képest is csökken, mindkét zsirsav esetében, mig az összes többi foszfolipid frakcióban a jelzettség relativ mértéke állandó marad, vagy növekszik.

A 14 napos tumorból származó sejtekben a kisebb mennyiségü beépült zsirsavat a sejtek igyekeznek megtartani. A zsirsav degradáció szakaszában különösen a ^{14}C olajsavnál jellemző, hogy átmeneti csökkenés után /4-5. óra/ ujabb aktivitás növekedés következett be a 6-7. órában, és igy a 13. órára lényegében alig csökkent a jelzett zsirsavak mennyisége a lipid észterekben.

A szfingomielin frakcióban mindkét sejtpopulációban a többi foszfolipid frakciótól eltérő kinetikáju a zsirsavak beépülése és lebomlása. Valószinü, hogy ez a foszfolipid frakció nagyon stabil, igy a médium cserétől függetlenül folyamatosan növekszik a beépült ^{14}C palmitát mennyisége, mint ezt a 3. táblázat adatai mutatják.
A neutrális lipidekbe a foszfolipidektől eltérően egyforma a jelzett zsirsavak beépülésének és lebomlásának mértéke a kétféle tumorsejt populációban. A 14 napos tumorból származó sejteknél a relative nagyobb mértékü zsirsav beépülés a neutrális lipidekbe alacsonyabb jelzett PL/NL arányokat hozott létre.

2./ Mivel a tumor sejtek saját lipidjeik szintéziséhez nagyrészt a gazdaszervezetből mobilizált zsirsavakat hasznositják, ezért a két vizsgált és a zsirsavanyagcsere szempontjából alapvetően fontos zsirsav eltérő turn-overe alapján a kétféle sejtpopulációban feltételeztük, hogy a sejtek zsirsavösszetétele is eltérő ezekben a sejtekben. Az izolált foszfolipid és neutrális lipid frakciók gázkromatográfiás analizisével a következő eltéréseket tapasztaltuk. Az 5 napos tumor sejtekben magasabb volt a palmitinsav/sztearinsav arány mint a 14 napos tumor sejtekben, - a magasabb palmitinsav tartalom következtében. A 14 napos sejtekben viszont jóval magasabb volt a polién zsirsavak %-os aránya, igy a telitett/polién zsirsav arány lecsökkent ezekben a sejtekben.

A ^{14}C acetátból történt de novo foszfolipid bioszintézis igen kismértékü a tumor sejtekben. Számottevő prekurzor beépülés csak néhány nagyobb mennyiségben előforduló zsirsav frakcióba volt tapasztalható. Ennek a kisérletnek az eredménye összevethető volt a foszfolipidek zsirsavösszetételénél kapott eredménnyel. Az 5 napos tumorban a palmitinsav nagyobb mértékben jelölődött, mint a 14 napos tumorban, ahol viszont a ^{14}C sztearinsav tartalom volt magasabb. A polién zsirsavak közül az arahidonsavnál volt kimutathatóan nagyobb mértékü prekurzor beépülés a 14 napos tumor sejtekbe.

3./ Jelzett kolin és etanolamin turn-overának mérésével vizsgáltuk a foszfolipidek szintézisét és lebomlását CDP-kolinon és CDP-etanolaminon keresztül. Megállapitottuk, hogy a tumor sejt foszfolipidek egy részének /~20 %/ szintézise és lebontása folyamatosan történik. Az 5 napos tumor sejtek a zsirsavakhoz hasonlóan több ^{14}C kolint és ^{14}C etanolamint épitettek be, mint a 14 napos tumor sejtek. Ugyan a jelzett foszfolipidek degradációja is nagyobb mértékü volt, azonban emellett is a jelzett prekurzorból képződött PC, PE, és SM mennyisége minden időpontban nagyobb volt az 5 napos tumorból származó sejtekben.

A metilációs anyagcsereut csökkent müködésére következtettünk a jelzett PE-PC valamint SM átalakulás hiányából a 14 napos tumor sejtekben.

Bár a metilációs anyagcsere során létrejövő PC mennyisége nagyon kicsi a CDP-kolinon keresztül történő PC bioszintézishez képest /36/, mégis több adat bizonyitja, hogy ez a folyamat a sejtek és a plazma membrán alapvető funkcióit befolyásolja, mivel egészen más zsirsav összetételü PC molekulákat hoz létre, mint amelyek a CDP-kolin anyagcsereut során keletkeznek. Bizonyitott, hogy a membrán fluiditás és bizonyos membrán receptorok aktivitása erősen függ a metiláció müködésétől /37, 38/.

Sinclair /35/ leirta a metilációs anyagcsereut mü-

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED

ködését Ehrlich ascites tumorban, de vizsgálatait csak a proliferációs stádiumban lévő sejteken végezte, ehhez hasonló eredményt kaptunk mi is az 5 napos tumorból származó sejtekben. A 14 napos tumorban azonban a sejtek nem képesek a transzmetilációra, amint ezt a ^{14}C etanolamin beépülésének vizsgálata kimutatta.

A sejtek foszfolipidjeiben a PE/PC %-os arány változása a 14 napos tumorban szintén alátámasztja a transzmetiláció hiányára vonatkozó elképzelésünket.

Az SM frakcióban szintén nem tapasztaltunk aktivitás növekedést ^{14}C etanolaminnal történő inkubálás során, és az SM frakció %-os mennyisége szintén lecsökkent a 14 napos tumor sejtekben.

4./ A palzma membrán lipid összetételét valamint fluiditását általában befolyásolja a sejt lipidanyagcseréje. A membrán rotációs fluiditását DPH fluoreszcens festékkel mérve megállapitottuk, hogy a tumor fejlődés késői szakaszából származó sejtek /14 nap/ plazma membrán fluiditása lényegesen magasabb, mint a tumor növekedés korai szakaszából származó sejteké. A DPH-val mért membrán fluiditás növekedés egyik és valószinüleg alapvetően meghatározó tényezőjét, a moláris C/P arány csökkenését kimutattuk ezekben a sejtekben. A DPH-val azonban csak a membrán egy bizonyos részének, a festék környezetének rotációs fluiditására lehet következtetni, igy a 14 napos tumor sejtek lipid anyagcseréjében tapasztalt egyéb

változásokat /zsirsavak turn-overének csökkenése, a metilációs anyagcsere hiánya stb./ és ennek következményeit más, ezeknek a folyamatoknak az eredményét jobban tükröző módszerekkel /ESR, membrán receptorok aktivitása, membránhoz kötött enzimek müködésének vizsgálata/ lehetne tanulmányozni.

Irodalom

1. Wallach, D.F.H., J. Soderberg, L. Bricker. Cancer Res, 20. 397 /1960/
2. Szikla, K., É. Pokorny, L. Hullán, L. Holczinger. Cancer Biochem. Biophys., 5. 259-264 /1981/
3. Ferber, E., E. Kröner, B. Schmidt, H. Fischer, B.A. Peskar, C. Anders, In: M. Kates, A. Kuksis /eds/ Membrane Fluidity, Humana Press, Clifton, 239-263 /1980/
4. Mermier, P., N. Baker, Lipids, 8. 534-535 /1973/
5. Spector, A. A. Cancer Res, 27. 1580-1586 /1967/
6. Mermier, P., N. Baker. J. of Lipid Research, 15. 339-351 /1974/
7. Spector, A.A., D. Steinberg. J. of Lipid Research. 7. 649-656 /1966/
8. Baker, N., P. Mermier, L. Wilson. Lipids, 8. 433-436 /1973/
9. Spector, A.A., J.E. Fletcher. J. of Lipid Research, 10. 56-57 /1969/
10. Spector, A.A. Ann, N. Y. Acad. Sci., 149. 768-783 /1968/
11. Spector, A.A., D. Steinberg. A. Tanaka. J. Biol. Chem., 240. 1032-1041 /1965/
12. Goodman, D.S.U. Amer. Chem. Soc., 80. 3892-3898 /1958/
13. Spector, A.A., D. Steinberg. Cancer Res., 27. 1587-1594 /1967/
14. Spector, A.A., D. Steinberg. J. of Lipid Research, 7. 649-656 /1966/
15. Spector, A.A., D. Steinberg. The J. of Biol. Chemistry, 242. 3057-3062 /1967/

16. Wood, R. In: R. Wood /ed./ Tumor Lipids: Biochemistry and Metabolism, American Oil Chemists Society Press, Champaign, 139-182 /1975/

17. Gitler, C. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1. 51-109 /1972/

18. Singer, S. J., G. L. Nicolson. Science, 175. 720-724 /1972/

19. Edidin, M. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 3. 179-211 /1974/

20. Inber, M., L. Sachs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63. 1418-1422 /1969/

21. Ben Bassat, H., L. Sachs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68. 2784-2788 /1971/

22. Lands, W.E.M. In: M. Kates and A. Kuksis /eds./ Membrane Fluidity, Humana Press, Clifton, 69-73 /1980/

23. Lakowicz, J.R., F.G. Prendergrast, D. Hogan. Biochemistry, 18. 508-519 /1979/

24. Shinitzky, M., M. Inbar. J. of Mol. Biol. 85. 603-615 /1974/

25. Shinitzky, M., Y. Barenholz. BBA, 515. 367 /1978/

26. Inbar, M., In: K. Letnansky /ed./ Biology of the Cancer Cell, Kugler Publications, Amsterdam 1980, 269-294

27. Mély-Goubert, P., Freedman, M. H. Cancer Biochem. Biophys. 4. 167-171 /1980/

28. Kaunto, S., K. Kinosita, A. Iregami. Biochemistry, 16. 2319 /1977/

29. Rouser, G., B. Fleischer, H. Yamamoto. Lipids, 5. 494 /1970/

30. Farkas, T., Izotóptechnika, 24. 70-75 /1981/

31. Forte, J.G., T.M. Forte, E. Heimz. BBA, 298. 827 /1973/

32. Hartree, E.F. Anal. Biochem, 48. 422 /1972/

33. Kremmer, T., E. Ferenczy, E. Posch Chromatographia, 2. 142 /1969/

34. Inbar M., M. Shinitzky. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71. 4229 /1974/

35. Sinclair, A. Canadian Journal of Biochemistry, 49. 700-708 /1971/

36. Vance, D.E., Ben de Kruiff. Nature, 288. 277-278 /1980/

37. Hirata, F., J. Axelrod. Nature, 275. 219-220 /1978/

38. Creus, F.T., Y. Morita, F. Hirata, J. Axelrod, R.P. Siraganian. Biochem. Biophys. Res. Commun., 93. 42-49 /1980/

Ez a disszertáció az Országos Onkológiai Intézet Onkopathológiai Kutató Intézetében készült. Ezuton szeretnék köszönetet mondani Dr. Sugár János Professzor Urnak az Intézet Igazgatójának a dolgozat elkészitéséhez szükséges feltételek biztositásáért, munkám figyelemmel kiséréséért, támogatásáért. Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Holczinger László tudományos igazgató helyettes urnak a dolgozat témájának felvetéséért, hasznos tanácsaiért. A sejt membrán lipid összetételével kapcsolatos vizsgálatokban nyujtott segitségért Dr. Kremmer Tibornak mondok köszönetet.

A kisérleti munka egy jelentős részét a Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetében és a József Attila Tudományegyetem Biofizikai Tanszékén végeztem. A munkalehetőségért Dr. Wollemann Mária és Dr. Szalay László Professzoroknak tartozom köszönettel. A kisérleti technika elsajátitásában Dr. Farkas Tibor, Dr. Nemecz György és Dr. Laczkó Gábor volt segitségemre, közreműködésük nélkülözhetetlen volt a dolgozat elkészitésénél.

Végül köszönettel tartozom a kézirat átolvasásáért Dr. Holczinger Lászlónak, Dr. Bálint Zsuzsának és Dr. Farkas Tibornak, a gépelést Kőmives Dávidnénak, valamint azoknak a munkatársaimnak, akik a kisérletek kivitelezésénél és a dolgozat ábraanyagának elkészitésében közreműködtek.

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED