

Experimentális dermatológia a Debreceni Bőrgyógyászati Klinikán – 1993-2001

Experimental dermatology at the Department of Dermatology Debrecen – 1993-2001

SZABÓ IMRE DR.¹, ERDEI IRÉN DR.²

Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Onkológiai Intézet, Sugárterápia Tanszék, Debrecen, Magyarország¹,

Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Bőrgyógyászati Klinika, Debrecen, Magyarország²
Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Tanszék, Debrecen, Magyarország²

ÖSSZEFOGLALÁS

Hunyadi János professzor úr vezetése alatt a debreceni bőrgyógyászati klinika felzárkózott a hazai és nemzetközi experimentális dermatológiával foglalkozó intézetek közé. Az *in vitro* laboratóriumi technikák adaptálásával lehetővé vált a primer hámsejtkultúrák és HaCaT sejtekenyésztése és tudományos vizsgálata. Az így nyert keratinocyták felhasználásával változatos sejtfunkciós vizsgálatokra és immunológiai elemzésekre nyílt lehetőség. A keratinocyta alapú tudományos érdeklődés számos kollaborációs vizsgálat alapját is képezte. A kapott eredmények nagyban hozzájárultak a hámmal kapcsolatos ismereteink bővüléséhez.

Kulcsszavak:

keratinocyta - plasmin - Ca²⁺ - égésbetegség - time-lapse videó

SUMMARY

Under the leadership of Professor Janos Hunyadi the Department of Dermatology Debrecen reached the international scientific level in experimental dermatology and became one of the most advanced dermatological research institutes in Hungary. Introduction of modern laboratory techniques including culturing of primary keratinocytes and HaCaT cells provided possibility for further scientific studies. Wide variety of institutional and collaborative functional and immunological analyses had been carried out using keratinocyte cultures. The results obtained in these studies contributed to better understanding of epithelium function.

Key words:

keratinocyte - plasmin - Ca²⁺ - burn disease - time-lapse video

Experimentális dermatológia a debreceni Bőrklinikán

Hunyadi János professzor úr vezetése alatt a debreceni Bőrklinika tudományos tevékenysége alapvető változásokon ment keresztül. Ehhez jelentősen hozzájárult, hogy ebben az időszakban az experimentális dermatológia ugrásszerű fejlődésen ment át, amely hatására lényeges szemléletváltás következett be. Ennek eredményeképpen a statikus bőrmódellettől eljutottunk a dinamikus bőrmódel koncepcióig, vagyis a „bőr, mint határreteg” elképzelést felváltotta a „bőr, mint immunszerv” modell. Ez utóbbit a bőr rezidens és migráló sejteinek működésével kapcsolatos ismeretek gyarapodása segítette elő (8, 9).

Sejtmodellek

Hunyadi professzor úr a szegedi bőrgyógyászati iskola szemléletét és experimentális gyakorlatát magával hozva, a hám felépítését döntően meghatározó keratinocyták vizsgálatát vezette be. Ahhoz, hogy a hámsejtekkel kapcsolatos kérdésekre korrekt választ kapjunk, megfelelő sejtmodellekre volt szükség. Ebben az időben a nemzetközi irodalom és számos hazai kutató laboratórium is HaCaT sejteket használt modellként. A humán eredetű, immortalizált HaCaT sejtek tenyésztése viszonylag egyszerű. Fehérje tartalmú tenyésztő médiumokban (DMEM, RPMI), CO₂ termosztátban, steril körülmények között inkubálva gyorsan szaporodnak. Se-

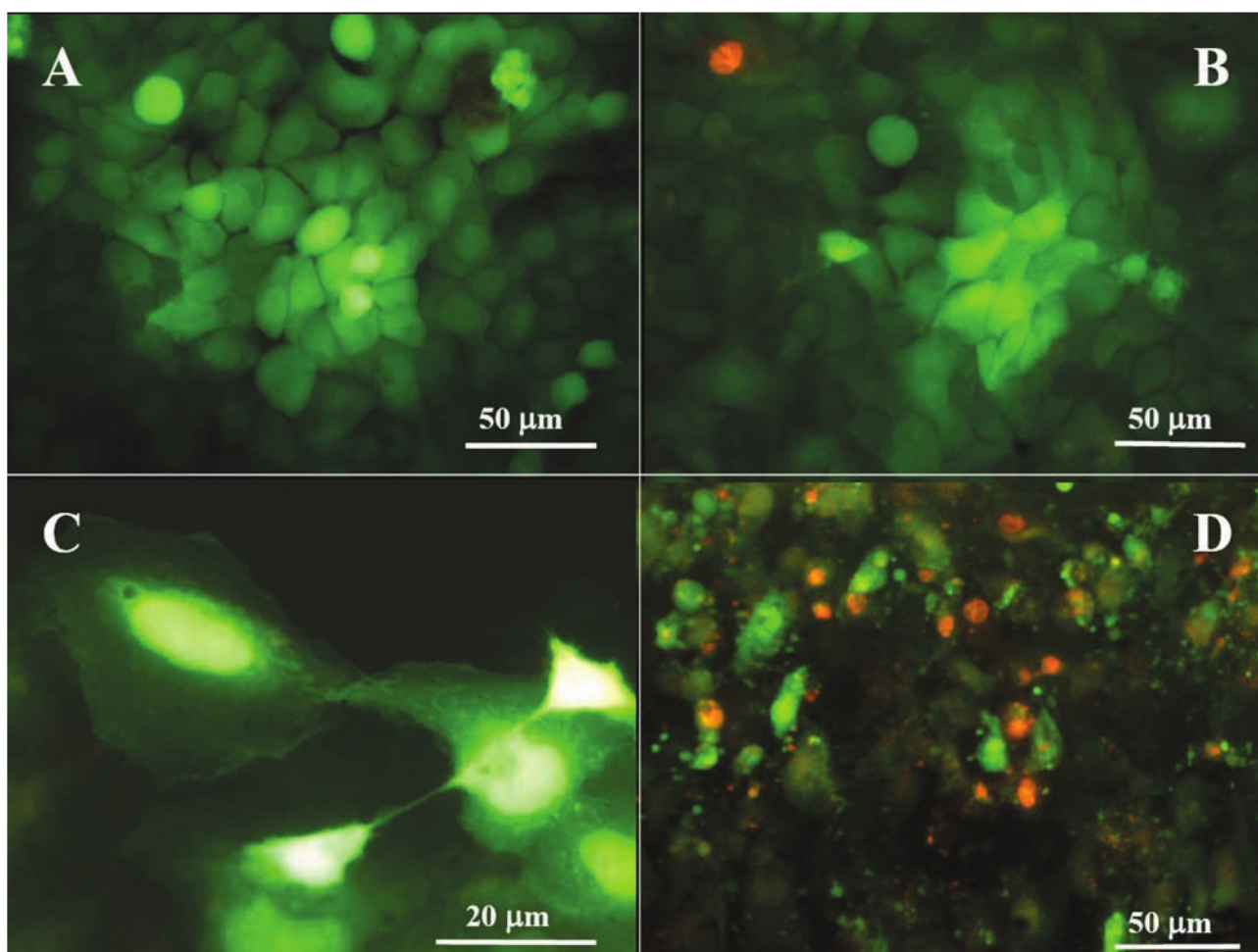
gítségükkel a szoliter hámsejtek, a belőlük kialakuló monolayerek, vagy a többrétegű hám is jól tanulmányozható. Az immortalizált, így genetikailag módosult HaCaT sejtekkel kapcsolatos eredmények interpretálásához szükség volt a primer hámsejtkultúrák vizsgálatára is. A primer hámsejtek tenyésztése a HaCaT sejtekhez viszonyítva sokkal komplexebb. A megfelelő tenyésztési milió biztosítása mellett növekedési faktorok hozzáadása is szükséges. A primer sejtek tenyésztése még ilyen körülmények között is limitált marad, csupán néhány passage erejéig tartják meg osztódó képességüket. A keratinocita tenyésztés beállítása után a sejtek funkcionális karakterizálása következett (15). A sejtek vitalitása fluoreszcens mikroszkóppal jól követhető. A nem fluoreszkáló prekursor carboxyfluoresceinsuccidimidylester (CFSE) csak élő sejtekben alakul át fluoreszkáló metabolittá, így anekrózt jelző párhuzamos ethyumbromide (EB) festéssel a sejtek vitalitása/pusztulása fluoreszcens mikroszkóppal viszonylag egyszerűen kiértékelhető (1. ábra). A módszer segítségével a keratinocita apoptosis is jól követhetővé vált (2. ábra).

Intracelluláris Ca^{2+} mérés keratinocytákban

A sejtmorfológia mikroszkópos elemzésén túl, kollaborációs vizsgálatokkal lehetőség nyílt a sejtaktiváció egyik meghatározó útvonalának, az intracelluláris Ca^{2+} változásának tanulmányozására is. A Debreceni Egyetem Élettani Intézetében végzett mérések bizonyították, hogy az excitábilis sejtekhez hasonlóan, keratinocita aktiváció során isintracelluláris Ca^{2+} szabadul fel. A vizsgálatok segítségével sikerült karakterizálni a folyamat kinetikai jellemzőit és néhány jellegzetes paramétereit (1, 2, 3, 10, 14.).

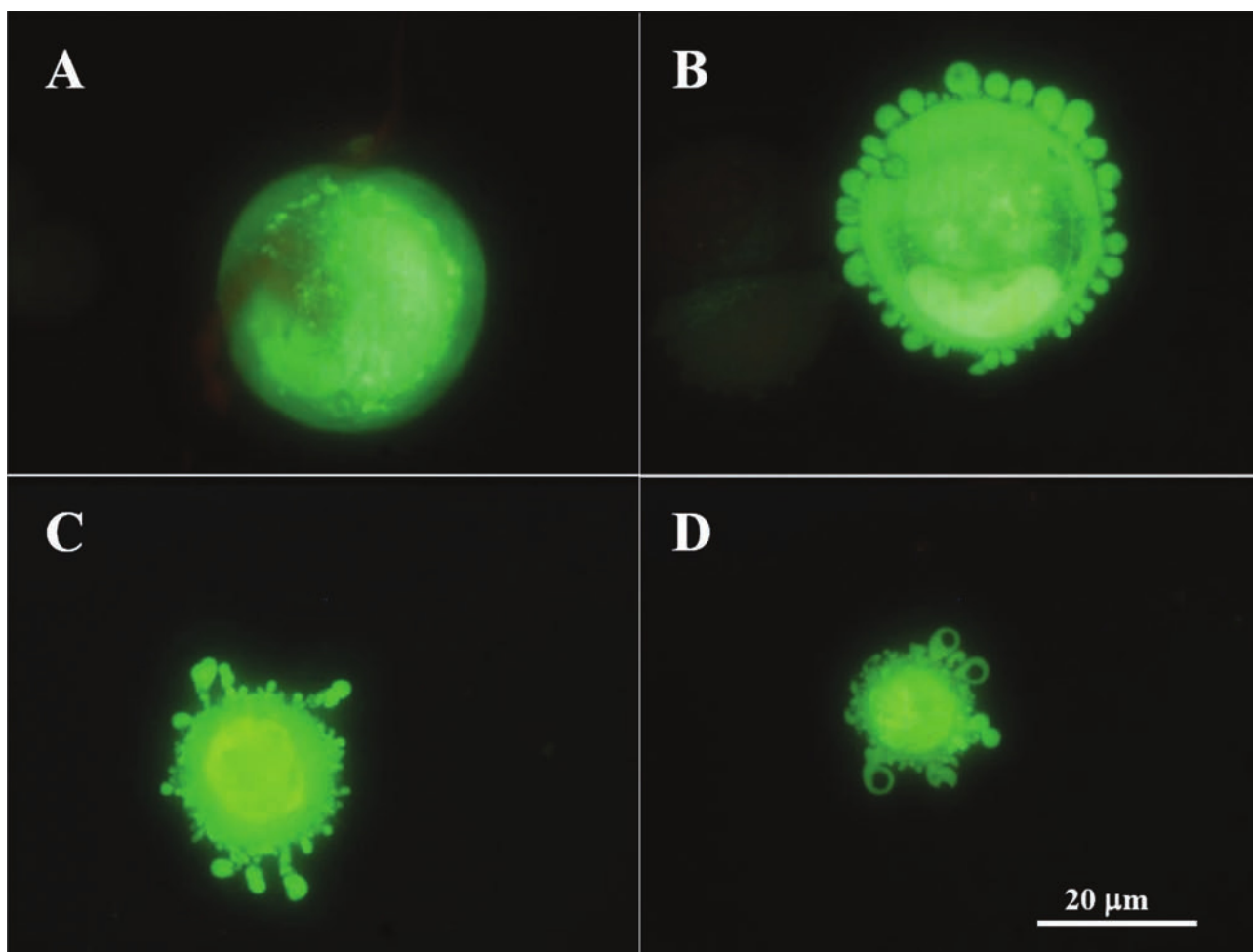
Égett betegek szérumának vizsgálata

Az égésbetegség kapcsán számos patológiás folyamat zajlik, amelyek károsan befolyásolják a betegség kimenetelét. Így a klinikumból jól ismert az a tény, hogy az égést követő idő előrehaladtával azautológ bőr transzplantátum megtapadásának esélye egyre csökken. A jelenség pontos magyarázata nem ismert, de egyre több adat bizonyítja a



1. ábra

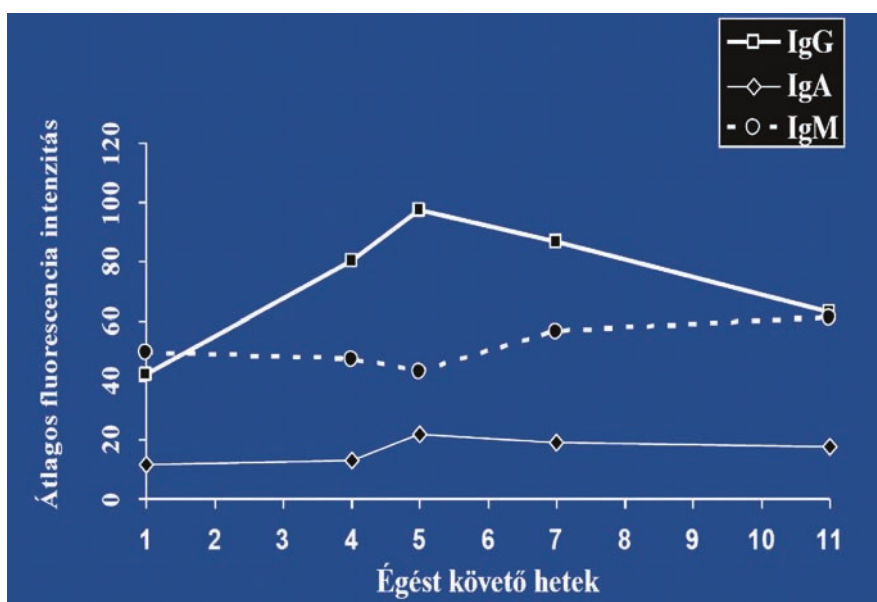
HaCaT sejtkultúrák fluoreszcens mikroszkópos képe. Vitális festés CFSE/EB festékekkel. Az „A” ábrán 100 %-ban vitális denzmonolayer látható. A „B” ábra bal felső sarkában egy nekrotikus sejt látszik. A „C” ábrán a hámsejtek között kialakult intercelluláris kapcsolatok látszanak nagy nagyítással. A „D” ábrán nagy dózisú UVB besugárzás utáni állapot számos apoptotikus és nekrotikus sejttel



2. ábra

Típusos keratinocita apoptózis fluoreszcens mikroszkópos képe. **A-B-C-D** ábrák a folyamat kinetikáját mutatják. CFSE/EB festés

patomechanizmus háttérében álló immunológiai folyamatok szerepét. A beállított sejtmódel segítségével megvizsgáltuk az égést követő keratinocita ellenes antitest termelődésének kinetikáját és az égett szérumból hatását a hámsejtekre. Tekintettel arra, hogy a keratinocyták felszínén Fc-receptor nem expresszálódik, az égett szérumból csak a hámsejt-ellenes antitestek kötődnek a keratinocytákhoz, és az aspecifikus kötődés elhanyagolható. Szolúbilis HaCaT sejtek felhasználásával áramlási citometriával vizsgáltuk a hámsejt-ellenes antitestek mennyiségi és minőségi változását az égést követő 11 hetes periódusban. A HaCaT sejtekre kötődő antitestek típusát IgG, IgM és IgA ellenes második antitesttel történő jelölést követően határoztuk meg, amely módszer lehetővé tette a hámellenes



3. ábra

Keratinocita ellenes antitest termelődés kiterjedt égést követően. Áramlási citometriás mérés HaCaT sejtekkel. A keratinocita ellenes antitest döntően IgG típusú és a titer az 5. hét táján éri el a maximumát

antitest termelődésének kinetikus elemzését is (4, 5, 6, 7, 11, 12). A vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a keratinocyta ellenes antitest termelődés az égést követő 4.-5. héten éri el maximumát és a domináló antitest típus az IgG immunglobulin alosztályba tartozik (3. ábra). A vizsgálatok eredményei magyarázatot adhatnak arra a kérdésre, hogy az égést követő 4.-5. hét táján miért gyakori az autograftok lelökődése. A patomechanizmus pontos tisztázása azonban további vizsgálatokat igényel.

Az égett betegek szérumának vizsgálata azt mutatta, hogy hatásukra a keratinocytákban sejtaktiváció jön létre, amely folyamatot az intracelluláris Ca^{2+} felszabadulása jelzi. A Ca^{2+} release reverzibilis folyamat és 60 sec elteltével szabad intracelluláris Ca^{2+} már nem detektálható. Normál szérum hatására hasonló aktiváció nem figyelhető meg. A hatás kialakulásáért tehát az égés kapcsán keletkező és a szérumban keringő szolúbilis anyag(ok) tehet(ek) felelőssé. A megfigyelt aktiváció, az intracelluláris Ca^{2+} felszabadulás kinetikája ugyan elmarad a kontroll stimulusként alkalmazott ATP hatásától, de pathophysiológiai jelentősége nem hanyagolható el. Az aktivációért felelős szubsztancia azonosítása további vizsgálatokkal lehetséges.

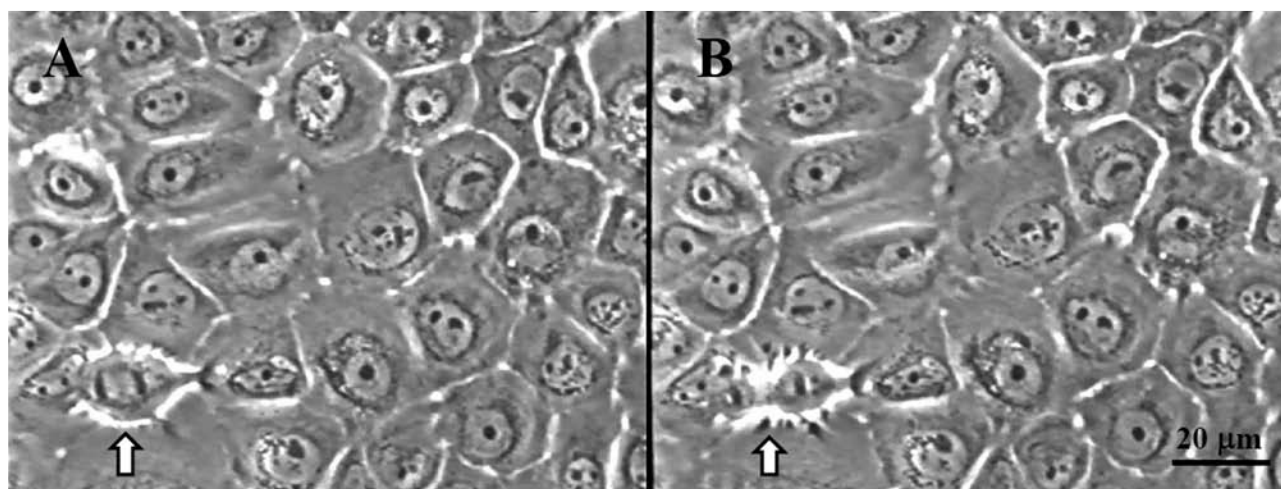
Plasminhatása a keratinocyták működésére

Hunyadi professzor úr vezetése alatt nagy hangsúlyt kapott a sebgyógyulás folyamatának vizsgálata mind a klinikum területén, mind pedig experimentálisan. A vizsgálatok egyik iránya a sebgyógyulás és a vérárvadás közötti összefüggés tanulmányozását célozta meg. A klinikumból ugyanis jól ismert, hogy jó vérrellátású területek sebgyógyulása gyors, és még a krónikus sebek gyógyulása is javítható a sebalap revitalizálásával. Általánosan elfogadott, hogy a vérárvadás kapcsán keletkező fibrinháló fontos szerepet játszik a sebgyógyulás folyamatában, megteremtve az alapot a hámsejtek migrációjához. A két folyamat kinetikája azonban jelentősen eltér: míg a fibrin képződés folyamata gyors, percek alatt lezajlik, addig a sebalap epithelizációja napok alatt következik

be. Továbbá a fibrinképződést a hemosztázis késői fázisában annak lebontása követi, így a sebgyógyulás folyamatában egyéb, a hemosztázis késői fázisaiban keletkező faktoroknak is szerepe lehet. Ezek között fontosnak tűnt a plasminogen-plasmin rendszer, hiszen a „romok” eltakarítása, a teljes szöveti restitutio ad integrum csak s folyamatok komplex szabályozása révén lehetséges. Ilyen megfontolások alapján azt vizsgáltuk, hogy a plasmin milyen szerepet játszik a re-epithelizációt meghatározó keratinocytafolyamatokban, a migráció, a fagocitózis és a ploriferáció során. A sejtmigrációt a keratinocyták agarose gél alatti migrációjával vizsgáltuk, a fagocitózishoz *Candida* spórát használtunk, míg a sejtproliferáció követése $[3\text{H}]$ -thymidineinkorporáció alapján történt. A vizsgálatok eredményei arra utaltak, hogy plasmin hatására specifikusan fokozódik a hámsejtek migrációja és fagocita aktivitása, míg a sejtosztódás csökken. Mindezek alapján arra lehet következtetni, hogy a sebzés során aktiválódó hemosztázis késői fázisában keletkező plasmin, elősegíti a sebgyógyulás re-epithelizációs folyamatát stimulálva a sejtmigrációt és a migráló sejtek útjába eső sejttermelékek fagocitózist, ugyanakkor gátolja a migráló hámsejtek osztódását (13).

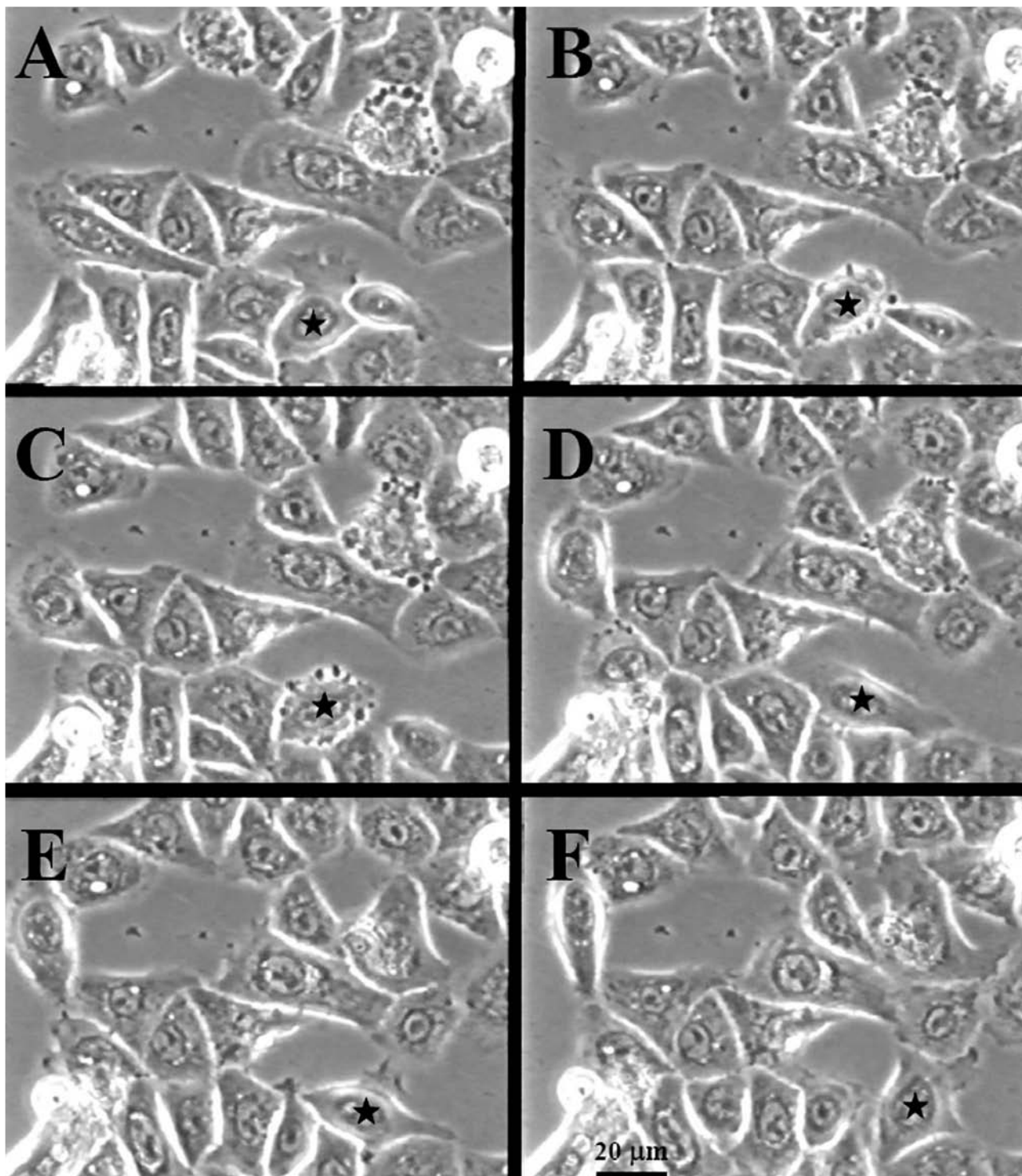
Keratinocyta tenyészetek vizsgálata time-lapse videóval

Az experimentális dermatológiával foglalkozó kutató orvos számára meglepő vizuális élményt jelentettek a sejt kultúrákról time-lapse videóval készített felvételek. A hámsejtkultúrák tenyésztése során, egy a mikroszkópra szerelt kamera segítségével folyamatos felvétel készíthető a hámsejtekről. A felvétel visszajátszásakor az események több százszoros gyorsítás után voltak láthatók, így az igen lassú sejtváltozások az emberi szem számára is érzékelhetővé váltak. Igen érdekes látvány, hogy a sejt-sejt kapcsolat dinamikusan változik, és a hámsejtek (a sejt plazma) akár 4-5-szörös méretre is képesek szétterjedni, hogy a kialakuló monolayer üres terét kitöltsék. A sejtek osztódásakor méretük csökken,



4. ábra

Time-lapse videó felvétel HaCaT sejttenyészetről. Az osztódó sejt nyílal jelölve



5. ábra

Atime-lapse videó felvételeken a csillaggal jelölt sejt migrációja követhető „A-B-C-D-E-F” időrendi sorrendben. A „B-C” ábrákon a sejtadhézió dinamikus változása látszik számos álláb (tappancs) megjelenésével

majd elválnak a szomszédos hámsejtektől. A keletkező 2 utódsejt dinamikus sejt-sejt kapcsolat útján keresi a szomszédos sejtekkel való kapcsolatot (4. ábra). Gyakori jelenség, hogy a hámsejtek különleges morfológia változáson mennek keresztül, amely során az addig a felszínre és a szomszédos sejtekhez tapadt sejtek felválnak, és számos álláb (tappancs) kibocsátásával dinami-

kus „táncba” kezdenek, majd a folyamat végén elterülnek a felszínen, és hogy vitalitásukat bizonyítsák, tovább migrálnak (5. ábra). Ezek a megfigyelések mai ismereteink szerint nehezen értelmezhetőek és fiziológias szerepük sem egyértelmű. A látvány azonban tovább erősíti a dinamikus bőrmodellről kialakított elképzelésünket.

Összefoglalás

Hunyadi János professzor úr irányítása alatt a debreceni Bőrklinika felzárkózott az experimentális dermatológiával foglalkozó hazai kutató központok közé. Kimagasló tudása, sziporkázó ötletgazdagsága, példamutató szorgalma, és nem utolsósorban kiváló személyes adottságai lehetővé tették, hogy egy modern szemléletű bőrgyógyász generáció nőjön fel mellette. Iskolateremtő munkájáért fogadja a tanítványok háláját. Isten éltesse Őt 70. születésnapja alkalmából.

IRODALOM

1. Biró T., Szabó I., Kovács L. és mtsai.: Distinct subpopulations in HaCaT cells as revealed by the characteristics of intracellular calcium release induced by phosphoinositide-coupled agonists. *ArchDermatol Res.* (1998) 290, 270-6.
2. Biró T., Csernoch L., Kovács L. és mtsai.: Calcium transients in a spontaneously immortalized human keratinocyte cell line (HaCaT). 1. The effect of IP3 and cAMPagonists. *Experimental Dermatol.* (1995) 4, 164.
3. Csernoch L., Biró T., Szabó I. és mtsai.: Calcium transients in a spontaneously immortalized human keratinocyte cell line (HaCaT). 2. The effect of growth factors and keratinocytes activators. *Experimental Dermatol.* (1995) 4, 163.
4. Erdei I., Hunyadi J., Kappelmayer J. és mtsai.: Antibody formation against keratinocytes in burned patients. *European Burns Association 6th Congress/ eds. [European Burns Association].* (1995) 282. p
5. Erdei I., Kappelmayer J., Hunyadi J. és mtsai.: Súlyos égési állapot által indukált hámellenes immunreakciók vizsgálata. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia.* (2013) 43, Suppl 1 18 p.
6. Erdei I., Szabó I., Szegedi A. és mtsai.: Keratinocytá ellenes antitest vizsgálata égett betegekben. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle.* (2010) 86, (6) 168 p.
7. Erdei I., Szabo I., Szegedi A. és mtsai.: Antibody formation against keratinocytes in burned patients. *JEADV* (1996) 7, S137.
8. Hunyadi J., Szabó I.: Atópiás dermatitis. *Háziorvos Továbbképző Szemle* (1996) 1, 375-377.
9. Hunyadi J., Szabó I., Simon M. Jr.: A bőr mint immunszerv. *Orvosi Hetilap* (1994) 135, 2749.
10. Hunyadi J., Szabo I.: Morphine treatment can modulate activation process of keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* (1997) 109, 447.
11. I. Erdei, I. Szabo, A. Szegedi, J. és mtsai.: Antibody formation against keratinocytes in burned patients. *Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology* (1996) 7, 137.
12. Szabó I., Erdei I., Hunyadi J.: Égett betegek szérumának hatása a keratinocyták adhéziójára. *Égési konferencia : programfüzet [kiad. a] A Magyar Égési Egyesület és a Magyar Dermatológus Társaság tiszántúli szakcsoportja.* (1998) 3-4, 47 p.
13. Szabo I., Simon M. Jr., Hunyadi J.: Plasmin promotes keratinocyte migration and phagocytic-killing accompanied by suppression of cell proliferation which may facilitate re-epithelialization of wound beds. *ClinDevImmunol.* (2004) 11, 233-40.
14. Szabó I., Biró T., Csernoch L. és mtsai.: Characterisation of intracellular Ca++ mobilization in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* (1997) 109, 447.
15. Szabó I., Simon M. Jr., Hunyadi J.: Functionalactivities of activatedkeratinocytes. *Experimental Dermatol.* (1995) 4, 164.

Érkezett: 2014. 05. 15.

Közlésre elfogadva: 2014. 05. 29.