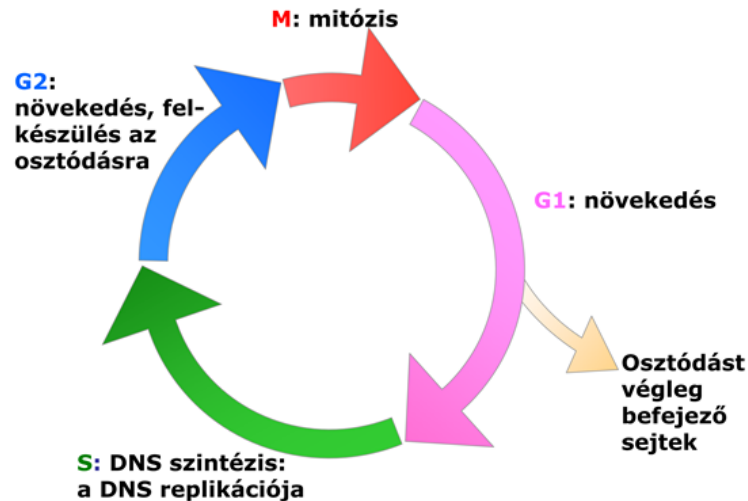


Időigényes sejtbioológiai kutatás digitális bemutatása

Szabó Péter – Barla Ferenc
Széchenyi István Egyetem, Győr

1. Bevezetés

A növényi sejtek osztódása a sejtciklus fázisai szerint történik. A G1 fázisban a sejtek növekednek és végzik megadott élettani feladatukat. Az S fázisban a sejtmagjukban lévő örökítő anyag, a DNS mennyisége megduplázódik, hogy majdan az osztódáskor minden utódsejt részesülhessen a teljes genetikai anyagból. A G2 fázisban a sejtek tovább növekednek és végül az M fázisban bekövetkezik az osztódás, amely a vizsgált esetben mitózis, vagyis számtartó osztódás lesz. Az eukarióta sejtek osztódási ciklusát szoros időrendben lejátszódó és szigorúan szabályozott folyamatok sorozata jellemzi. E folyamatok meghatározott sorrendben visszafordíthatatlan változásokat generálnak a ciklusban lévő sejtekben. A soksejtűek esetében a sejtek ciklusba lépéséhez nélkülözhetetlen a mitogén hatást biztosító növekedési faktorok jelenléte, melyek jelátviteli útvonalak közvetítésével aktiválják a ciklus beindításához szükséges géneket (szérumfüggőség). A sejtípusok többsége csak akkor képes osztódni, ha a sejtthártya integrin molekulái közvetítésével kapcsolatot tudnak kialakítani az extracelluláris mátrix megfelelő komponenseivel (laminin, fibronectin). Az ún. fokális kontaktusok a fokális adhéziós kinázokat aktiválva, jelátviteli folyamatokat elindítva indukálják a sejtek osztódását (letapadás függőség). A sejt-sejt kapcsolatok kialakulása (szintén szignalizációs útvonalakon keresztül) a normális működésű sejtekben gátolja a ciklust. Ennek eredményeképpen a sejtek a rendelkezésre álló felületet beborítják, kitöltik, majd az osztódás leáll (denzitásfüggő osztódásgátlás). Ebben szerepe lehet annak is, hogy a rendelkezésre álló növekedési faktorok hozzáférhetősége korlátos. A soksejtű szervezetekben az osztódások/ciklusok száma limitált. Szövettenyészetekben kimutatható, hogy a normál sejtek esetében a ciklusszám fajra jellemző. Például ember esetében embrionális fibroblasztok szövettenyészetében a sejtek kb. 50 sejtcikluson mehetnek át. Ezt követően G0 fázisba lépnek, mitogén hatásokra már nem reagálnak, majd elpusztulnak. E jelenség hátterében a kromoszómák végdarabja, a telomera ciklusról-ciklusra történő rövidülése áll. A ciklus meghatározott pontjain molekuláris mechanizmusokon alapuló ún. ellenőrző pontok működnek. Szerepük az, hogy a ciklusban való továbblépést csak az adott szakaszra jellemző részfolyamatok teljesítését követően engedélyezik. Mutációs eredetű hibák a sejtciklus szabályozásának felborulását eredményezhetik. Kialakulhatnak szérumfüggetlen, letapadás független, akár korlátlanul osztódó, ún. immortális sejtek/sejtvonalak. A szabályozás felfüggesztése a sejtek kontrollálatlan osztódásához, sejtburjánzás kialakulásához vezethet. Az egysejtű és többsejtű eukarióta szervezeteket, illetve a soksejtűek különböző sejtjeit vizsgálva felállítható egy általánosított eukarióta sejtciklus modell, de számos esetben a jellemző eltérések alapján különböző sejtciklus-típusok írhatók le (1. sz. ábra).



1. sz. ábra: A sejtciklus fázisai

A mitózis számtartó osztódás, azaz nem jár a kromoszómaszám megváltozásával. Az osztódás négy szakaszra bontható (Haraszty 1979).

Az osztódás előszakaszában a kromoszómák fehérjemolekulák közreműködésével feltekerednek, kialakulnak a transzportkromoszómák. A citoplazmában létrejön a kromoszómák mozgását irányító, fehérjefonalakból álló rendszer, az osztódási orsó. A kromoszómák befűződési pontjuknál kapcsolódnak az osztódási orsó fonalaival. Megkezdődik a maghártya feldarabolódása.

A középszakaszban a kromoszómák az osztódási orsó húzófonalainak közreműködésével a sejt középső síkjába rendeződnek. A maghártya eltűnik.

Az utószakaszban a kromoszómák kromatidái a befűződési pontnál elválnak egymástól, és a húzófonalak segítségével a sejt ellentétes pólusaira vándorolnak.

A végszakaszban a két pólusra került kromoszómák körül kialakul a két sejtmaghártya, majd ezt követően megtörténik a citoplazma kettéválása is.

A mitózis végeredménye két egyforma, a kiindulási sejttel megegyező kromoszómaszámú utódsejt. A folyamat lényege, hogy a sejtciklus nyugalmi szakaszában megkettőződött DNS tartalmú kromoszómák kromatidái elválnak egymástól, és megosznak a két utódsejt között.

Mitózissal osztódnak például az egysejtű eukarióta élőlények sejtjei, a hajtásos növények osztódószövetének sejtjei és az állatok szöveti sejtjei.

A szöveti sejtek mitózissal történő osztódása biztosítja a szervezet előregedett, működésképtelenné vált sejtjeinek pótlását, vagy a sejtek számának gyarapodását a növekedési, fejlődési életszakaszokban.

Jelen vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogy a sejtek osztódása milyen mértékben szinkronizált? Tapasztalhatunk-e az osztódó sejtek arányában 24 óra alatt valamilyen gyakorisági eltérést, cirkadián ritmust?

2. Anyag és módszer

A vizsgálathoz fénymikroszkópos festést alkalmazunk. Minden sejt vagy szövettani készítményt (leszámítva a pigment tartalmú sejteket) vizsgálat előtt, a vizsgálat kívánalmainak megfelelően meg kell festeni. Mivel a mikrotechnikában használt festékek túlnyomó többsége vizes oldat, a paraffinblokkból készült metszeteket festés előtt előkezelésnek kell alávetni, festés után pedig gondoskodni kell arról, hogy a festett preparátum vizsgálatra alkalmas és tárolható legyen. A festett preparátumot fényvel szemben megfelelő törésmutatójú és egyben

tartósítást is biztosító közegbe kell vinni. A paraffinos metszetek előkezelésének első lépése a deparaffinálás. A festékoldatokkal nem elegyedő paraffinnak metszetekből való kioldása rendszerint xilollal történik. Ezután a paraffin oldószerének eltávolítására és a metszetek vízzel történő átitatására van szükség, amit az ún. leszálló alkoholsor különböző koncentrációjú tagjainak (abs., 96%, 60%, 50% etilalkohol) egymás után történő cseréjével érünk el, és közvetlenül festés előtt desztillált vizes öblítést alkalmazunk. A gyakorlatban ez úgy történik, hogy a lemezen lévő metszeteket visszük keresztül az oldószereket tartalmazó festőküveték sorozatán. A festési időt a gyakorlatban empiriával kell meghatározni. Egy adott festékanyaggal való színeződés sok esetben kizárólagos egy specifikus makromolekulát tartalmazó struktúrára vagy organellumra nézve. Egy adott struktúraelem, valamely festékkel történő specifikus színeződésének mechanizmusa lehet kémiai vagy fizikai alapon jól definiálható, de lehet kevésbé ismert, vagy tisztázatlan is. Például az Orange G nevű festék a citoplazmában található valamennyi organellumot megfesti. A sejtek vagy szövetek savas természetű (hozzáférhető negatív gyököket tartalmazó) komponensei a kationokban gazdag ún. bázikus festékekkel (szerves bázisokkal) festődnek. A bázisos festékekkel színeződő struktúrákat összefoglaló néven bazofil anyagoknak nevezzük, a reakció látható, pozitív eredményét pedig bazofiliának. A bazofília függ a festékoldat pH-tól. Alacsony pH-n (2–3) csak az erősen savas, magasabb pH (4–5) mellett az összes savas anyagok, míg semleges és gyengén savas pH mellett sok egyéb anyag is specifikusan festődik. A legismertebb bázikus festékek a hematoxin, a toluidin és a metilénkék. Vannak továbbá a szövetekben acidofil anyagok is, amelyek savas jellegű festékekkel történő festődése az acidofília jelensége. A savas festékek közül az eozinnal történő színeződést külön is szokás megkülönböztetni: ez az eozinofília. Az acidofília is Ph-függő jelenség. Savas pH mellett csak a bázikus komponensek, míg lúgos pH mellett sokkal több anyag festhető savanyú festékekkel. Szöveti festésekhez általában nem egyetlen festékoldatot, hanem kettőt–hármát használunk egymás után. (ún. szukcedán festés). Ilyen a hematoxin–eozinnal történő ún. mag–plazma festés. Ez esetben a hematoxinnal előbb bazofília festést végzünk. Ekkor a DNS-t és RNS-t tartalmazó sejt-komponensek és ha jelen vannak a savanyú mukopoliszacharidok festődnek. Ezután vizes eozinnal közel semleges pH mellett általános, ún. plazmafestést végzünk. A mag és a riboszóma tömegek (pl. durva felszínű ER) a felvett hematoxintól lilásbarnára, míg a többi anyagok rózsaszínűre (eozin–vörösre) színeződnek. 16 Hasonló gyakran használt kombinált szöveti festés az Azan–festés (Azokarmin–Anilin kék). Ez esetben előbb az azokarminnal magfestést, majd az ún. Mallory oldattal (anilin kék+Orange G) kötőszöveti és plazmafestést végzünk. A magok, a vörösvérsejtek és a nyálka kárminpirosra, a kötőszövet kollagén rostjai kékre vagy sárgára színeződnek. A Mallory–festést, mivel különböző festékeket egyazon oldatban tartalmazza, a szimultán festések közé sorolják. A legtöbb festék a saját színével megegyező színűre festi a vele kapcsolatba lépő komponenseket, amit ortokromatikus színeződésnek (ortokromázia) nevezünk. Ezzel szemben, ha a festék saját színétől eltérő színben tüntet fel valamely struktúrát a metakromázia jelenségéről van szó. Vannak festékek, melyek bizonyos struktúrákat ortokromatikus, másokat viszont metakromatikus festenek: ilyen pl. a bázikus toluidin, amely oldatának pH-jától függően, vagy csak a nukleinsav tartalmú komponenseket színezi kékre, vagy magasabb pH-n azokkal együtt savas fehérjéket is, viszont a savas proteoglikánokat és sok más struktúrát pl. a növényi sejtek cellulóztartalmú sejt-falát vörös ibolya, a fásodott sejt-falakat viszont zöld színben tünteti föl. A metakromatikus festőanyagok közül ismertebb még a tionin és az Azur–A. A metakromatikus festődés mechanizmusa feltehetően az, hogy egyes makromolekulák felületükön festékmolekulákat adszorbeálnak. Ha a makromolekulák felületi festékkötő helyeinek rendeződése olyan, hogy a festékmolekulák aggregálódását is lehetővé teszik, a festékmolekulák adszorpciós polimerizálódása következik be. A metakromázia tehát bizonyos szabad gyökök periodikus felületi elrendeződéséhez kötött jelenség. Fizikai alapja az, hogy a polimerizált festékmolekula és a monomerek oldatának

fényabszorpciós maximuma egymástól eltérő. A toluidinkék esetében a metakromázia foka függ a negatív gyökök termé-szetétől. Legerősebben a szulfátcsoporttal rendelkező vegyületek (pl. a savas proteoglikánok, mucin, hialuronsav, a porcállományban a kondroitin– szulfát, heparin stb.), majd a foszfát–, karboxil–, végül a karbometil–csoporttal rendelkező vegyületek adják. A festési módszer progresszív jellegű, ha a metszet által felvett festék mennyiségét a festés idejével szabályozzuk. Regresszív a festés, ha a metszetet erősen túlfestjük, majd a felesleget megfelelő oldattal kivonjuk belőle. Mivel ilyenkor a különböző sejtalkotókból különböző mennyiségben oldódik ki a festék, a festék kivonást differenciálásnak nevezzük. Bizonyos mértékű differenciálódás majdnem mindig lezajlik a festést követő víztelenítés alatt. A leggyakrabban alkalmazott regresszív festékek a Mallory–, az Azan– és a Papanicolau–festés.

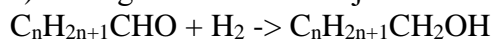
Annak érdekében, hogy az osztódás folyamata látható legyen a növényi szövetet hisztokémiai eljárással meg kell tehát festenünk. A Schiff-Feulgen reakció az aldehidek addíciós képességére vezethető vissza. A kénessavval elszíntelenített bázikus fukszin (parafukszin) oldat, ha aldehidekkel reagál ibolyás-vörös színű vegyületet ad (Szalai–Frenyó 1962). A bázikus fukszin a trifenil-metánszínezékek családjába tartozik és triamino-trifenil-metánból állítható elő. E vegyület szénatomjának hidrogénje lecserélhető hidroxilcsoporttal. Majd ásványi sav hatására ez sóképzési reakció útján színes vegyületté alakul át. Az egyik gyűrűben kinoid kötési rendszer jön létre, amitől pozitív polározottság, ibolyás-vörös szín jön létre. A színes molekula kénessavval elszínteleníthető. Amennyiben aldehyd molekula jelenik meg a rendszerben a kénessavval elszíntelenített parafukszin központi szénatomjáról kénessav válik le, és a színes kinoid szerkezet visszaalakul.

A DNS savas hidrolízise hatására a nukleinsav molekuláról purin-bázisok válnak le. Ezel leválása hatására a dezoxiribóz komponens egy része szabaddá válik és az eredetileg furanóz formában jelenlévő dezoxiribóz aldehydcukorra alakul át.

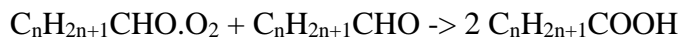
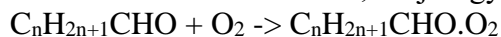
Az aldehidek olyan szerves vegyületek, amelyek molekulájában egy vagy több formilcsoport (aldehydcsoport) található. A formilcsoport egy oxigénatomból, egy szénatomból és egy hidrogénatomból áll.

A formaldehyd szobahőmérsékleten szúrós szagú gáz, az acetaldehyd szobahőmérsékleten forró (fp. 20,8 °C) folyadék. A következő tagok forráspontja egyre inkább emelkedik, illatuk kellemes. Igen reakcióképesek, könnyen polimerizálódnak, vagy oxidálódnak. Már ultraibolya sugarakkal megvilágítva bomlanak, CO távozással szénhidrogénekké. A karbonil általában könnyen reagál. Az *aldehidek* kémiai reakciói közül az alábbiakat kell megemlíteni:

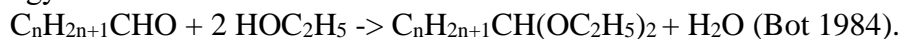
a) Hidrogénnel katalizátor jelenlétében alkohollá redukálhatók:



b) Oxidáció könnyen savakká alakítja az *aldehideket*. Már levegőn is oxigént vesznek fel, előbb addíciós termék keletkezik, majd egy második *aldehyd* molekulához csatlakozva karbonsav:



c) Alkoholokkal az *aldehidek* vízmentes ásványi savak jelenlétében kettős étereket, úgynevezett acetálokat alkotnak:



Az aldehydcsoporttal reagál a Schiff-Feulgen reagens. A citokémiai reakció során így a DNS ibolyás-vörösre színeződik és láthatóvá válik a mikroszkóp alatt.

A cirkadián ritmus kimutatásához a vöröshagyma növényt választottuk. A növény a Liliaceae - liliomfélék családjába tartozik. Más rendszerek az Amaryllidaceae családba helyezik. Az egész Földön megtalálható a család. Maradványait a harmadkor óta ismerjük. A régebbi rendszerek a Liliales és Asparagales számos más családját is a Liliaceae családba sorolták.

Hagymás geofitonok (azaz tápanyagraktározó, földbeli módosult hajtásuk van). Vegetatívan sarjhagymákkal is szaporodhatnak. Levélállásuk szórt vagy örvös, gyakori a tölévélrózsa, de a hajtáson legalább egy szárlevél található. Rendszerint színes, leplek (szabad vagy forrt) virágtakarójú kétivarú virágaik vannak. A virágok aktinomorf szimmetriájúak, ötkörösek (pentaciklikus), hármas tagolódásúak (trimer). Hat különálló porzójuk van. A magház három termőlevélből összeforrt, felsőállású. $\{ *P3+3v(3+3) A3+3 G(3) \}$. Virágzatuk magányos virágok, vagy fürtvirágzatból áll. Megporzásuk rovarokkal történik. Termésük lokulicid tok vagy bogyó.

A vöröshagyma származási helye Irán keleti része, Afganisztán, a Pamír hegység. Már kb. 5000 éve ismert, az egyiptomiak is termesztették. Honfoglaló őseink már magukkal hozták a Kárpát-medencébe, azóta folyik termesztése. Hazánk legnagyobb és legnevesebb hagymatermő vidéke Makó és környéke. A konyhakertekben is megtalálható, a családi konyhák ellátására termesztik. A fokhagyma Ázsiából származik, Egyiptom és Mezopotámia ismert növénye volt. Hazánk zöldségtermelő vidékein, Makó környékén termesztik. Ismerjük és használjuk a zöldhagymát (mely a tavaszi retek mellett az első tavaszi íz), a fehér színű főzőhagymát (mely a lila hagymához hasonlóan kevésbé erős), a főként savanyúsággént használt, ecetes vízben eltett apró gyöngyhagymát, és az apróra vágott, levesek díszeként, ízesítőként használt snidlinget is. A hagyma minden formájában ételünk jellegzetes ízadója, nyersen, főzve, savanyítva, porított formában is használjuk. A vöröshagyma napjainkra a világ fontos, nélkülözhetetlen élelmiszernövényévé vált. A burgonya és a paradicsom után ma már a harmadik legnagyobb felületen termesztett zöldségféle. Termőterülete 1985-ben még csak 1,5 millió hektár volt, 2015-ben pedig már a világ 134 országában 3,5 millió hektárról 60 millió tonna termést takarítottak be. Legnagyobb termelők Kína 20,5 millió tonna, India 13,3 millió tonna, valamint az Egyesült Államok 3,3 millió tonna nagyságrenddel. Jelentős még Egyiptom, Irán, Törökország, Pakisztán, Brazília, Oroszország és Dél-Korea, egyenként 1-2 millió tonnás termelése. A felsorolt 7 ország összes termelése eléri a 12 millió tonnát, amely a világtermelés 5 %-a. A világ átlagtermés 17-18 t/ha, de több országban ennél lényegesen több, 40-60 t/ha, sőt egyes termőhelyeken 100 t/ha feletti értékeket is elérnek. Magyarországon 2014-ben 2474 hektárról 61 813 tonna termést takarítottak be, ez azonban a hazai szükségletet sem fedezte, mert 9000 tonna importra is szükség volt.

A vizsgálat alanyául az *Allium cepa* raktározó földbeli hajtásának, hagymájának homorhizás gyökércsúcsát választottuk (Sárkány–Szalai 1957). Csúcsmerisztémák a hajtástenyészócsúcson és a gyökerek csúcsi régiójában található osztódó szövetek Zömmel elsődleges osztódó szövetek, amelyekből az adott növényi test különböző szövetei alakulnak ki /hisztogének/. Ezek mellett a központi régióban iniciális multipotens ősméristéma sejtek csoportjai fordulnak még elő. A sejtek szorosan illeszkednek egymáshoz, általában kocka alakúak -izodiametrikusak- és sejtközötti, intercelluláris tereket nem látunk a szövetben. A sejtekben a nagy központi vakuólumok még nem alakultak ki. A sejt belső terében jól festődő nagy gömb alakú sejtmagok és osztódó sejtekben a fajra jellemző kromoszómák jól tanulmányozhatók.

A vizsgálat napjának minden órájában az alany gyökércsúcsának 4 mm hosszú darabját fixálóba helyeztük (2. sz. ábra). A mintaegyedeket sötétkamrában csíráztattuk. A nagyjából egyforma hosszúságú gyökérszalakból választottuk ki a mintákat.



2. sz. ábra: Az *Allium cepa* gyökércsúcsa

A vizsgálatot öt párhuzamos sorozatban végeztük. Fixálásra Carnoy-fixálót használtunk (96%-os alkohol és ecetsav keveréke). A fixálás után savas hidrolízist alkalmaztunk (Kasten 1960). Ehhez 1n sósavat alkalmaztunk 59 Celsius fokon, 8 percig. Ezek után a mintákat Schiff-Feulgen reagensbe merítettük 30 percre. A festett készítményeket kénessavas vízben átmostuk. A preparátumokat fedőlemez alatt szétosztatva vizsgáltuk (Sharma 1972).

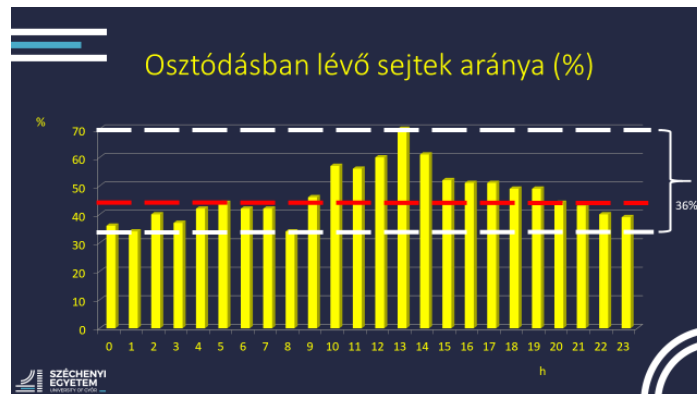
2. Eredmények

Óránkénti mintavételt eszközöltünk az *A. cepa* gyökérmerisztéma csúcsból. Ecetsavas fixálás után festettük a mintát bázikus fuxinnal, majd megállapítottuk az osztódó és nem osztódó sejtek arányát.

Mintavétel, óra: Osztódó sejtek aránya (%):

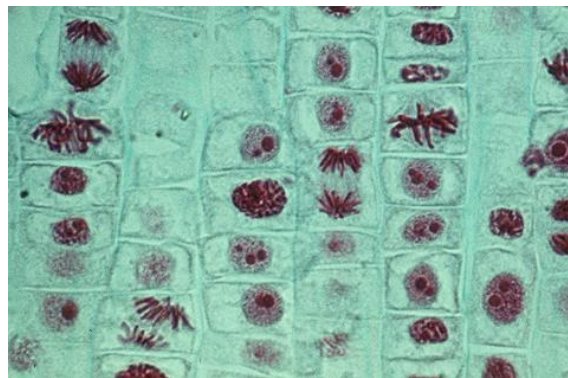
0	36
1	34
2	40
3	37
4	42
5	44
6	42
7	42
8	34
9	46
10	57
11	56
12	60
13	70
14	61
15	52
16	51
17	51
18	49
19	49
20	44
21	43
22	40
23	39

Megállapítottuk, hogy az osztódásnak van cirkadián ritmusa. Grafikonon ábrázolva az alábbi eredmények adódtak (3. sz. ábra).



3. sz. ábra: Az osztódásban lévő sejtek aránya (%)

Átlagosan a mintákban a sejtek 46,6%-a volt osztódásban. A legalacsonyabb osztódási ráta éjjel 23 és 03 óra között volt tapasztalható. A lemagasabb osztódási értékeket 10 és 16 óra között kaptuk (4. sz. ábra):



4. sz. ábra: A mitózis különböző fázisaiban lévő sejtek

Az élőlények egy része testére vagy egyes szerveikre jellemző lehet a *sejtállandóság*, vagyis, hogy ezen élőlények, illetve egyes szerveik ugyanazon faj különböző egyedein azonos sejtszámúak. Sejtállandóságot mutatnak pl. a fonálférgék. Ők az egyik legnagyobb gerinctelen csoport. Testük hengeres, fonalszerűen megnyúlt. Nagyságuk a mikroszkopikus méret és a 8 méter között változik (pl. a bálnákban élő *Placantonema gigas*). Kültakarójuk többretegű, meglehetősen merev kutikula. Testükre vagy egyes szerveikre jellemző a sejtállandóság, vagyis, hogy e szervek ugyanazon faj különböző egyedein azonos sejtszámúak. A szájníylás csúcsi, a végbélníylás csúcs alatti elhelyezkedésű. A végbélníylás mögötti részt farokrésznek nevezzük. Keringési és légzőkészülékkel nem rendelkeznek. Váltivarúak és általában ivaroson szaporodnak, bár néhány csoportjuknál a szűznemzés is előfordul. A petékből kikelő lárvák a felnőtt egyedekre hasonlítanak, és négy vedlésen átesve érik el a kifejlett ivarérett állapotot. A harmadik stádiumú lárva a fertőző forma. Feltehetően tengeri eredetű a csoport, de szárazföldön és édesvízben is nagyon gyakoriak. Szabodon élők, növény- és állatparaziták, valamint lebontók egyaránt vannak közöttük. Azon kevés állatcsoportok közé tartoznak, amelyeknél a csoport tagjait maguk a csoport tagjai is parazitálhatják. Körülbelül 10000 fajuk ismert.

A sejtállandóságot nem mutató soksejtű szervezetekben egy időben általában a sejteknek csak mintegy öt százaléka osztódik, a többi interfázisban van (Bakonyi et al. 2003).

Irodalom

- Bakonyi G.–Juhász L.–Kiss I. –Palotás G. 2003. *Állattan*. Budapest: Mezőgazda Kiadó.
- Bot Gy. 1984. *A szerves kémia alapjai*. Budapest: Medicina Könyvkiadó.
- Haraszty Á. 1979. *Növény szerkezettan és növényélettan*. Budapest: Tankönyvkiadó.
- Kasten, F.H. 1960. *The chemistry of Schiff's reagent*. International Review of Cytology, 10.
- Sárkány S.–Szalai I. 1957. *Növény szerkezettani gyakorlatok*. Budapest: Tankönyvkiadó.
- Sharma, A.K.–Sharma, A. 1972. *Chromosome techniques*. Theory and practice, London, Butterworth.
- Szalai I.–Frenyó V. 1962. *Növényélettani kísérletek*. Budapest: Tankönyvkiadó.