

M. T. A. Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézetének Morphologiai Osztálya.  
(Igazgató : Dr. Törő Imre egyetemi tanár, akadémikus)

és a

Budapesti Orvostudományi Egyetem Szövet- és Fejlődéstani Intézete  
(Igazgató : Dr. Törő Imre egyetemi tanár)

## SARJSZÖVET VISELKEDÉSE SZÖVETTENYÉSZETEKBEN

PÁLYI IRÉN és TÖRŐ IMRE

Régen ismeretes, hogy az embryonalis kötőszövet egyike a tenyészetekben legjobban növő szöveteknek, míg a felnőtt szervezetből kivett kötőszövet igen gyenge növekedési tendenciát mutat. A felnőtt szervezet kötőszöve is visszanyeri azonban szaporodási és növekedési képességét, ha valamilyen inger hatására, pl. sebzéskor, sarjszövetes átalakuláson megy át. Kísérleteinkben vizsgálni kívántuk, hogy megfigyelhetők-e döntő különbségek az embryonalis kötőszövet és a sarjszövet-tenyészetek viselkedése között?

Az irodalom szerint kifejlett állatból származó kötőszövet csak különleges módon tenyészthető jól. Így *Schade* [13] a tenyésztőközeg összetételének és pH-jának különleges megválasztásával, *Bartha-Petrovics* [3], *Murray-Murray* [11] lép- és csontvelő kivonat, *Murray-Staut* [12] placentaszérum, *Gey* [7] a placentaszérum mellett borjúkivonat használatával, *Earle* [5] pedig a lószérum alkalmazásával ért el sikeres tenyésztési eredményeket. *Bauer* [4] tengerimalac hasüregében kova-homokot juttatott és annak behatására keletkezett granulomák tenyészeit figyelte meg.

A gyengén növekvő felnőtt szövet nagy regenerációs képességet nyer, ha benne szövetroncsolás lép fel nemcsak élőben, hanem in vitro körülmények között is. Így *Fardon* [6] azt találta, hogy csirkebél tenyésztése esetén a növekedés aktívabb azon a szöveti részen, melyet vágással megsértett. Ugyancsak jó növekedést mutat a sebgyógyulás sarjszöve, melyet ebből a szempontból az embryonális szövethez szoktak hasonlítani. *Layton* [9] vizsgálata hisztokémiailag is rámutat erre, amennyiben kimutatta, hogy az izomsebből nyert granulációs szövet sulfat megkötő képessége ugyanolyan mértékű, mint a 17 napos csirkeembryo izomzaté.

### Methodika

Kísérleteinkben idegen test hatására kialakuló sarjszövetet használtunk. 150—160 grammos fehér patkány bőr alatti kötőszövetébe 2×2 mm-es rézlemezt ültettünk steril körülmények között. A rézlemezt már 24 óra múlva egy vékony sarjszövetből álló tok veszi körül, mely egyre vastagabbá válik a 3. hétig, majd

ettől kezdve mennyisége nem nő. Ezzel az eljárással nagy mennyiségű és egyenletesen gyarapodó sarjszövet nyerhető. A rézlemez beültetése után különböző idő múlva (1—30 nap) a sebet megnyitottuk, és szigorúan steril körülmények között kiemeltük a betokolódott és környezetétől jól elkülönült lemezt. A lemezről jól lepreparálható tok egy részét szövettanilag dolgoztuk fel. Paraffin beágyazás után haematoxylin-eosin és methylzöld-pyronin festéssel figyeltük a különböző korú sarjszövetek állapotát, illetve cytológiai képét. A tok másik részét függő cseppben csillámon tenyésztettük úgy, hogy a belső csillámlemezkén volt a tenyészet (kettős fedőlemez tenyészet). Táptalajul tyúkplazmát, csirkeembryoletet és emberi placentaszérumot használtunk. A kultúrákat a belső csillámlemezzel együtt 3 naponként mostuk  $\frac{1}{2}$  órán át köldökszérum és embryólé 7:3 arányú keverékében. A kultúrákat 21 napig figyeltük meg, részben nativan, részben festett készítményekben.

Carnoy fixálás után Giemsa és methylzöld-pyronin festést alkalmaztunk. Kontrollképen ugyancsak 150—160 grammos fehér patkány bőr alatti kötőszövetét tenyésztettük.

### Kísérleti eredmények

A könnyebb kiértékelhetőség szempontjából tenyészeinket 3 csoportba osztottuk, a granulatio szövet kora szerint.

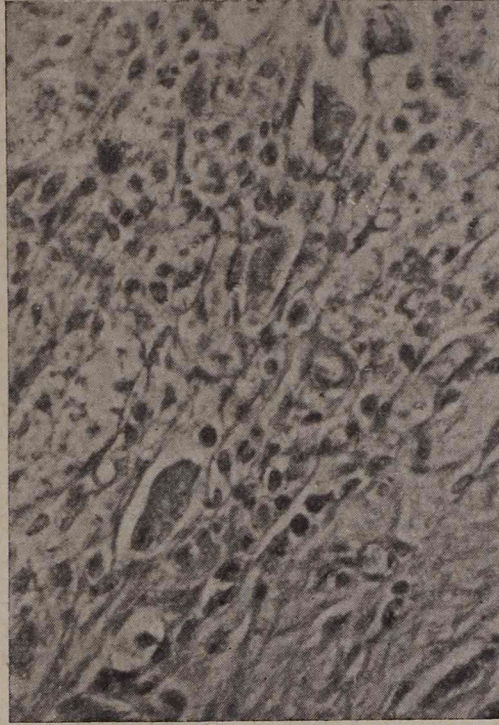
#### 1. 1—6 napos fiatal sarjszövet.

A fiatal sarjszövet hisztológiai képére elsősorban a hypercapillarizáció jellemző (1. ábra). A sejtkepben az érfalon kilépett granulocyták dominálnak, sok fibrocyta és histiocyta fordul elő. Methylzöld-pyroninnal a sejtdús sarjszövet igen élénken festődik. A sejtek protoplazmája pyroninophyl-szemcsékben gazdag, ugyancsak erős pyroninophyliát mutatnak a nukleolusok is. A világosan festődő mag laza chromatin hálózata jól kivehető.

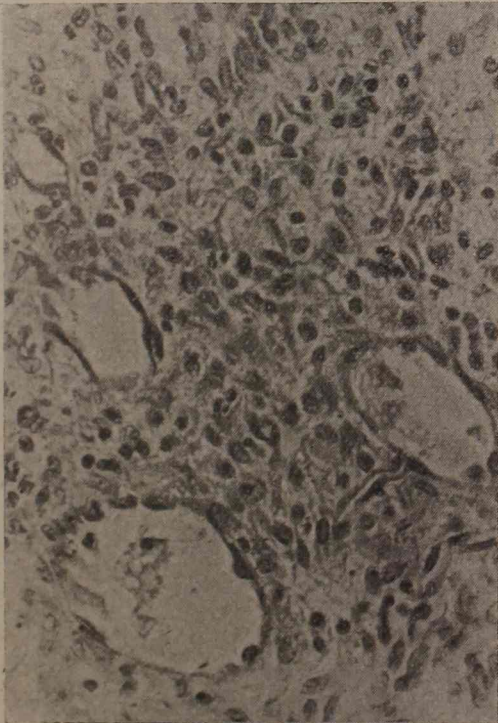
Ezekből a fiatal sarjszövetekből készített kulturákban a következő megfigyeléseket tettük: már 12 óra múlva megindul a növekedés. Először a *makrophagok* vándorolnak ki, ezek kb. 8—10 mikron nagyságú sejtek, élénk mozgásúak, kevés nyúlvánnyal rendelkeznek, alakjuk igen változó. Hyperchromasiás magjuk centrálisan vagy periferiásan helyezkedik el. 20 óra múlva megindul a *fibroblast* növekedés is, a típusos vékony, elnyúlt plazmájú fibroblastokat látjuk, köztük kevés és soknyúlványú sejtek ismerhetők fel. Jellemző ezenkívül az anyakultúrából gazdagon kinövő kapilláris endothel hálózat. Ugyanekkor jelennek meg az *izgalmi histiocyta*k (2. ábra) Ezek 7—9 mikron nagyságú, lekerekedett sejtek, hyperchromasiás maggal és erős acidophyl plazmával. 48 óra múlva az élénk mozgású makrophagok a növekedési zóna szélére jutva, gyűrűszerűen veszik körül a lassabban növekvő fibroblastokat. Így egy külső makrophag és egy belső fibroblast zóna különíthető el. A két zóna határán helyezkednek el az izgalmi histiocyta. A későbbiek folyamán is ugyanezek a sejtek találhatók meg, de az



2. ábra. Egy napos granulációs szövet hatnapos tényészeté. Izzalmi sejtek a növekedési zónában



4. ábra. Középidős sarjszövet hisztológiai képe



1. ábra. Fiatal sarjszövet hisztológiai képe



3. ábra. 5 napos granulációs szövet hatnapos tényészeté.  
Mitosisok

egyhetes kultúrákban már sok a degenerációs jel. Ez egyre fokozódik és a sejtek aránya a fibroblastok javára tolódik el. Feltűnő a sejtek homogén plazmája, ami megkülönbözteti a sarjszövet fibroblastjait az embryonális kötőszöveti sejtektől. Feltűnő továbbá a mitosisok nagy száma (3. ábra), melyek filmfelvételeken azt mutatják, hogy az embryonális fibroblastoknál az ana- és telofázisban található felületi feszültség egyenetlenség a sarjszövet sejtjeinek oszlásánál sokkal kisebbfokú. 14–21 napos kultúrákban már ép sejt alig fordul elő, lekerekedett lipid szemcsékkel kitöltött plazmájú sejtek, sőt széteső sejtek találhatók.

### 2. 7–15 napos középidoős sarjszövet.

A középidoős sarjszövet már jóval vastagabb tokot alkot a rézlemez körül. A sejtkep megegyezik a fiatal sarjszövetével, a különbség csak az, hogy itt nagy számban találhatók idegen test óriássejtek. (4. ábra) Ezek nagy, 20–25 mikron nagyságú acidophyl plazmájú sejtek. 5–10 magjuk koszorú alakban a sejt perifériáján helyezkedik el. Methylzöld-pyronin festéssel nem az egész tok, hanem csak a rézlemez körüli keskenyebb, sejtduzsabb zóna mutatja az intenzív festődést.

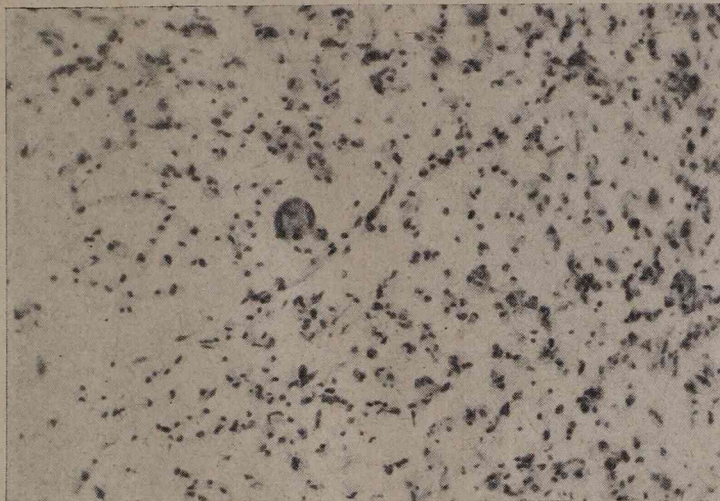
Ezeknek a kultúráiban is 12 óra múlva megindul a növekedés. Itt jellegzetes az, hogy a sejtkepet már kezdetben is a *fibroblastok* uralják, melyek a kisebb számban kinövő *makrophagok*kal és *histiocyttakkal* egy időben vándorolnak ki az anyadarabból. 24 óra múlva szorososan az anyadarab körül *óriássejtek* jelennek meg, melyek morfológiailag megfelelnek a sarjszövet metszetben látott óriássejteknek (5. ábra). Egy hét után a kép nem változik, csak a fibroblastok száma szaporodik. A 2. héttől kezdve degenerációs jelek mutatkoznak. Egyre több a vakuolizált lekerekedett sejt. A 2. hét végén a növekedési zóna széli részein is látunk óriássejteket, ezek hasonlóak a már előbb említett alakokhoz. A 2. hét végén klasmatozist mutató sejtek figyelhetők meg a növekedési zóna széli részén. Ezek nagy, változó alakú sejtek, melyeknek plasmájában szemcsék találhatók. A szemcsék a plasma széli részein csoportosulnak és a plasmanyúlványokba tömörülnek. Sikerült megfigyelnünk a szemcsékkel telített nyúlványok lefűződését a sejtről (6. ábra). A 3. héten a tenyészetben levő sejtek fokozatos degenerációs jeleket mutatnak.

### 3. 16–30 napos idős sarjszövet.

16–30 nap után már igen kifejezett, vastag sarjszövetes tok veszi körül a lemezt. A histológiai képben az előbbieken leírt sejtfeleségek láthatók. Domináló sejtalkok a fibrocytták. A tok körül minden esetben egy hízósejtekben gazdag zóna figyelhető meg (7. ábra). A methylzöld-pyroninnal festődő zóna kifejezetten keskenyebb, mint az előző stádiumban.

A kultúrákban itt is megindult a növekedés 12 óra múlva, de kisebb fokban, mint a fiatal sarjszövet esetében. Ekkor még csak fibroblastok jelennek meg, majd 24 óra múlva néhány *makrophag* és *histiocyta* is megfigyelhető. Ezek azonban igen kis számban találhatók. *Óriás sejteket* nem sikerült megfigyelni. A fibro-

blastok nem a jellegzetes vékony, hosszukás sejt alakot mutatják, hanem szélesebb plazmájúak, az egész sejt lándzsa alakú s a világos duzzadt magban élénken előtűnnek a polárisan elhelyezkedő nukleolusok. A második héten a fibroblastok szorosan egymás mellett helyezkednek el, elvesztik lándzsa alakjukat és hám-



5. ábra. Hétnapos granulációs szövet 14 napos tenyésztete. Óriássejt a növekedési zónában



6. ábra. Nyolcnapos granulációs szövet tenyésztete. Klastmatocita növekedési zónában

szerű membránt alkotva nőnek (8. ábra). Ez az epitheloid növekedés rendkívül jellemző az idős sarjszövet tenyészteteire. Degenerációs jelek a tenyésztés 21. napján sem láthatók. Az epitheloid membrán sejtjei ekkor is épek és jól festődnek.

A kontrollképpen használt felnőtt kötőszövetes kultúrák csak 48–72 óra múlva mutatnak igen gyenge növekedést. A sejtkepeket izoláltan növekvő fibroblastok uralják és elvéve látható egy-két makrophag és histiocyta. Általában a kultúrák sejtszegények és jellemző, hogy már igen hamar a 2. hét elején nagyfokú



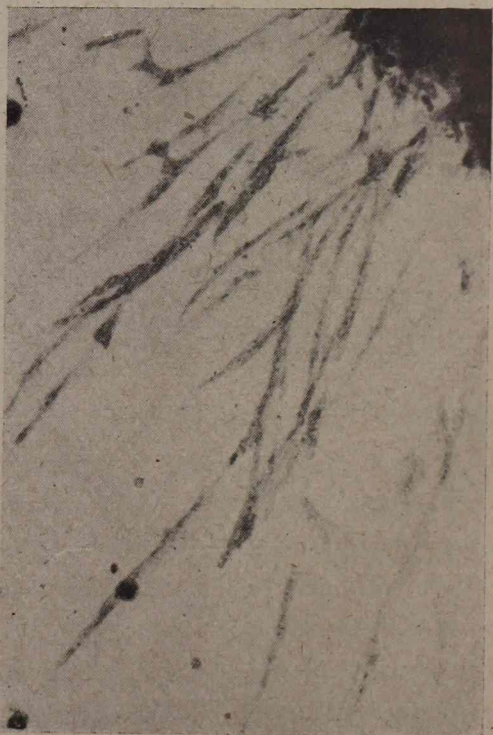
8. ábra. 30 napos granulációs szövet 14 napos tenyésztete. Epitheloid szövet növekedése



10. ábra. 150 g-os patkány bőralatti kötőszövetéből készült 14 napos kultúra



7. ábra. Idős sarjszövet histológiai képe



9. ábra. 150 g-os patkány bőralatti kötőszövetéből készült hét napos kultúra

a degeneráció. (9.—10. ábra). Igen fontos különbség a sarjszövettel szemben az, hogy míg a sarjszövetből explantált kultúrák mindegyike mutatott növekedést, addig a normál felnőtt kötőszövetes kultúrák 25—30%-a nem indult növekedésnek.

### Discussio

A fenti kísérletekben a sarjszövet kultúrákban látottak nemcsak a felnőtt kötőszövetnek a sarjadzás állapotában létrejövő változásaira mutatnak rá, hanem bizonyos fokig a sebgyógyulás cytologiai folyamataiba is betekintést engednek. Hueck szerint [8] ugyanis az idegen test hatására kialakuló sarjszövet azonosnak vehető a sebgyógyulás folyamán kialakuló sarjszövettel. Így kell értékelni a kultúrákban kezdetben megjelenő izgalmi sejt alakokat, majd óriás sejteket és végül az epitheloid sejtek növekedését, melyek párhuzamba hozhatók a sebgyógyulás folyamán megjelenő hasonló sejt alakokkal. Különösen feltűnő az embryonalis kötőszövetes kultúrákkal szemben a sejtoszlások gyakorisága, ami arra mutat, hogy a sarjszövet regenerációja és szaporodása még az embryonalis kötőszövetét is felülmúlja.

Vizsgálatainkhoz hasonló kísérletet végzett, mint már említettük Bauer [4], aki kovahomok hatására létrejövő granulómák tenyészeiben a sejtek átalakulási képességeit vizsgálta. Ő speciális kis organoid képleteket ültetett ki és figyelte meg azoknak viselkedését. Ezeknél természetesen a potenciális viszonyok mások. Megállapította, hogy tenyészetben ezek úgy viselkednek, mint a kiültetett lépdarabkákból kitenyésztett kultúrák. Vizsgálatainkban mi Bauer megfigyeléseihez hasonló sejtelemeket figyelhettünk meg. Jellegzetes megfigyelést tehettünk azonban a kötőszövetes sejtek viselkedésére a sarjszövet öregedésével kapcsolatban. Ez különös fontossággal bír a kötőszövet öregedésének kérdésében. De eltért Bauer kísérlete a mienktől azért is, mert ő 4 naponként transzplantálta a tenyészeteit és ez a methodikai különbség nagyfokú eltérést okozott a sejtpopulációban, s a sarjszövet viselkedésénél kevésbé értékelhető.

Míg a fiatal sarjszövet izoláltan növvő keskeny elnyúlt plazmájú fibroblastjai az embryonalis fibroblastokhoz hasonlóak, addig az idős sarjszövetben teljesen más képet mutató szélesebb, epitheloid kollektív növekedési képességgel rendelkező fibroblastok dominálnak, melyeknek plasmájában a vakuolaképződés és a degeneratív jelenségek nem találhatók meg. Úgy látszik, hogy a sarjszövetképzés és az ezzel kapcsolatos környezeti hatások in vivo minél hosszabb ideig állanak fenn, a sejtek ellenállóképességének fokozódása annál inkább nő. Ez nyilvánul abban, hogy az embryonalis típusú fibroblastok már 10—12 nap után degenerálódnak, míg az epitheloid fibroblastok még a tenyésztés 21. napján sem mutatnak degenerációs jelenségeket. A fiatalabb sarjszövet sejtjei igen sok szétesési termékkel telítődnek, melyek bomlástermékei degenerációjukat eredményezi. Ez összhangban áll azzal, hogy a korai sarjszövetből legnagyobb mértékben makrophagok nőnek ki. Ezek a makrophagok phagocytáló

képességgel rendelkező sejtek, melyek *in vitro* igen aktívak, élénk mozgásúak, és plazmájukban gyakran figyelhetők meg phagocytált sejtörmelékek. Ezeknek és az izgalmi hystiocytáknak száma azonban egyre csökken a sarjszövet korának előrehaladásával. Bár a klasmatosist minden korú sarjszövetben találunk, a klasmatosis mégis az idősebb, már degenerálódó kultúrákban jelenik meg nagyobb számban, és valószínű hogy ez a jelenség a degenerációs folyamatokkal áll kapcsolatban minden olyan sejtben, ahol a mag nyugalmi stádiumban van.

A tenyésztés első hetében az anyadarab mellett megjelenő óriás sejtek nyilvánvalóan innen vándoroltak ki. A második hét végén a növekedési zóna szélén megjelenő óriás sejtek eredete vitás. Minden bizonnyal ezek a kultúrában alakultak ki a fibroblastokból, bár nekünk *Lewis*-sel [10] ellentétben nem sikerült az óriás sejt kialakulásának minden stádiumát megfigyelni, mégis néhány sejtkep alapján úgy gondoljuk, hogy ezek amitosis útján kialakult plasmodiumoknak tekinthetők.

Megfigyeltük, hogy azok a kultúrák, melyek az idős sarjszövetes tok hízósejtekben gazdag perifériás részéből készültek, növekedést vagy egyáltalán nem, vagy csak igen kis mértékben mutattak. Ez *Balázs*- és *Holmgren* [1] teoriájával magyarázható, akik szerint a hízósejtekben található heparin anti-mitotikus hatást fejt ki. A regenerációs képesség és az *in vitro* körülmények közötti növekedés nem mindég halad párhuzamosan. Ezt tapasztaljuk más kísérletekben a felnőtt máj és jelenleg a felnőtt kötőszövet esetében. Kísérleteinkben a sarjszövet, mely a felnőtt kötőszövet származéka, nemcsak *in vivo*, hanem *in vitro* is igen élénk növekedést mutatott. Ez azt mutatja, hogy az említett kísérleti feltételekkel a felnőtt kötőszövet anyagcseréjében mélyreható változást sikerült előidézni. Az inger által okozott sejtváltozás az organizmuson kívül *in vitro* is megmarad. Az a tény, hogy a felnőtt szervezetből kivett kötőszövet nem, de a sarjszövet kötőszöve *in vitro* tovább nő, arra mutat, hogy a sejtek a szervezetben a sarjszövet kialakulása folyamán kapták meg azokat a képességeket, amelyek *in vitro* növekedésükhöz szükségesek.

A májszöveten végzett hasonló vizsgálatok [2], melyeknek célja annak felderítése volt, hogy miért nő *in vitro* az embryonális máj, és miért nem nő a felnőtt máj, arra a megállapításra vezettek, hogy csak az a szövet növekszik, melyben megmarad *in vitro* is a ribonukleinsav szintézis, ami előfeltétele a fehérjeszintézisnek. A regenerációs máj viszont növekszik tenyészetben, tehát ebből a szempontból az embryonális és regenerációs májszövet hasonlóan viselkedik. Ez összhangban van azzal, hogy a felnőtt kötőszövet, mely a növekedés szempontjából nyugalomban van, és melyet *Warbourg* [14] a stationaer szövetek közé sorolt, *in vitro* gyengén, de bizonyos behatások után tenyészetben élénk proliferációval válaszol és az embryonális szövethez hasonlóan növekedési potenciákkal rendelkezik. Mind a májjal kapcsolatos vizsgálatok, mind jelen vizsgálatunkban az embryonális, felnőtt kötőszövet- és sarjszövetből készített kultúrák viselkedésének alapján meg lehet állapítani, hogy a növekedési képes-



ség és a sejtek szaporodásának emelkedése a sejtek ribonukleinsav szintetizáló képességével van összefüggésben. Ezt mutatják a metylzöld-pyroninnal festett tenyészetek is.

A fiatal sarjszövetből vett tenyészetekben a sejtkep még változatos, míg az idősebbek tenyésztése folytán kapott kultúrákban lassanként egyforma fibroblast sejtek lépnek fel, a sejtek uniformizálódnak, dedifferenciálódnak, ami, úgy látszik, azonos a nukleinsav szintetizálás képességének visszanyerésével. A dedifferenciálódás eredményezi, hogy a sejtek visszanyerik korábbi fejlődési állapotuknak megfelelő képességüket. Ez teszi a sarjszövetet alkalmassá arra, hogy még felnőtt szervezetben is újabb differenciálódási irányt legyen képes felvenni.

### Összefoglalás

1. Fehér patkány bőr alatti kötőszövetébe ültetett rézlemez körül kialakult sarjszövetes tokot tenyésztettünk.

2. A sarjszövet 12 órás latentia idő után már növekedésnek indul, szemben a kontrollképpen használt felnőtt patkány kötőszövettel, mely csak 48—72 órás latentia idő után kezd sokkal gyérebben nőni.

3. Az 1—6 napos fiatal sarjszövet kultúráiban a fibroblastokon kívül izgalmi sejt alakok dominálnak (Histiocytá, vér- és szöveti makrophagok). Ezek a kultúrák kététhetes tenyésztés után erős degenerációt mutatnak.

4. A 7—15 napos középido sarjszövet explantátumaiban óriás sejtek jelennek meg.

5. A 16—30 napos idős sarjszövetre az epitheloid fibroblastos növekedés jellemző. Ezek a kultúrák a tenyésztés 21. napján sem mutatnak degenerációt.

6. A szövetroncsolások által okozott környezeti behatások morfológiai és potenciális változásokat hoznak létre a sejteken.

7. Ezek a potenciális változások az embryonális sejt-képességek visszaterését (dedifferenciálódás) jelentik.

### IRODALOM

1. Balázs A., Holmgren H. J. : *Exper. Cell. Res.* 1. 206. 1950
2. Barka T., Törő I., Pósalaky Z. : *Acta Morph.* 3. 437. 1953
3. Bartha E., Petrovics L. : *Arch. Exper. Zellforsch.* 6. 81. 1928
4. Bauer K. : *Zschr. J. Mikr. Anat. Forsch.* 40. 119. 1936
5. Earle G. O. : *Methods in medical research.* Vischer. Chic. 1951
6. Fardon J. C., Sullivan W. A., Andrus M. B. : *Stud. Inst. Divi Thomae Cincinnati* 2. 233. 1940
7. Gey G. O. : cit. Cameron G. *Tissue culture technique* Akad. Press Inc. Publ. 1950 New York 78.
8. Hueck W. : *Morphologische Pathologie.* Thime Leipzig. 1953
9. Layton L. L. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73. 570. 1950
10. Lewis W. H. : *Amer. Rev. of Tuberculosis* 15. 616. 1927
11. Murray M. R., Murray C. R. : *Anat. Rec.* 60. 39. 1934
12. Murray M. R., Staut A. P. : *Am. J. Path.* 18. 183. 1942
13. Schade H. : *Arch. Exper. Zellforsch.* 14. 631. 1933
14. Warbourg O. : *Biochem Zeitschr.* 184. 484. 1927