

AZ ENDOCITÓZIS CITOKÉMIAI VIZSGÁLATA ARANYHÖRCSÖG MELLÉKVESE KROMAFFIN SEJTJEIN

BENEDECZKY ISTVÁN és SOMOGYI PÉTER

MTA Biológiai Kutatóintézete, Tihany és SOTE I. sz. Anatómiai Intézete, Budapest

Ma már általánosan elfogadott, hogy a legtöbb hormontároló mirigysejt és számos exokrin mirigysejt is exocitózis révén üríti ki a granulákban tárolt szekrétumot. A szekréción végtermék exocitózissal történő kiürítésének alapvető feltétele az, hogy a szekrétum membránnal határolt szemcsék formájában tárolódjon a citoplazmában. Nem véletlen, hogy a szteroid termelő szövetekben — ahol nincs jelentős hormontárolás az exocitózis jelensége sem figyelhető meg. Az exocitózis folyamán a membránnal határolt szubcelluláris részecskék (szekrécións granulák) még kellően nem tisztázott mechanizmus révén a plazmamembránhoz tapadnak — a granulum membránja és a plazmamembrán összeolvad egymással, majd az apikálisan — megnyíló plazmamembránon keresztül — a szekrétum az extracelluláris térbe jut. Az exocitózis jelenségét igen alaposan tanulmányozták biokémiai, élettani és morfológiai szempontból egyaránt, ennek során sok vitatott kérdés tisztázódott az azonban mindmáig kérdéses, mi a sorsa a granulák membránjának, amelyek az exocitózis folyamata alatt a plazmamembránba olvadtak bele. Az nyilvánvaló, hogy az ismétlődő exocitózisok során a sejtthártyába jelentős mennyiségű granulum membrán épül be. Az sem kétséges, hogy ez az anyag többlet megváltoztatja a plazmamembrán összetételét, molekuláris organizációját, fiziko-kémiai sajátosságait egyaránt.

Felmerül a kérdés vajon az exocitózist követően újjászerveződik-e a plazmamembrán, s ha igen, milyen mechanizmus biztosítja a rekonstrukció folyamatát? Morfológiai vizsgálatok [2, 3, 4, 8] azt sugallták, hogy a plazmamembrán exocitózist követő reorganizációja endocitózis révén megy végbe. Az exocitózist kísérő endocitózis folyamatát eddig morfológiai és citokémiai módszerekkel, főleg patkány mellékvesében vizsgálták, ott, ahol maga az exocitózis morfológiai képe is igen szegényes. Mivel az exocitózis legnagyobb gyakorisággal aranyhörcsög mellékvese velőben figyelhető meg [3, 4, 5] indokoltnak láttuk, hogy az exocitózis—endocitózis folyamat összekapcsolt voltát ezen állat egyedein vizsgáljuk meg. Ezen elgondolásból kiindulva — aranyhörcsögnek torma peroxidázt adtunk — és citokémiai reakció segítségével ultrastrukturális szinten követtük a mellékvese kromaffin sejtjeiben a plazmamembrán endocitotikus tevékenységét.

Anyag és módszerek

Kísérleteinkben hím és nőstény aranyhörsögöt használtunk. Az állatok súlya 100—210 g volt. A torma peroxidáz adása előtt az állatokat 1 ml 3.5%-os klorálhidrát — i.p. adása révén altattuk el. A véna juguláris kipreparálása után i.v. 20 mg torma peroxidázt (Schwarz — New York) adtunk az állatoknak 0,5 ml fiz. sóoldatban oldva. A kontroll állatok 0,5 ml élettani konyhasó oldatot kaptak. A peroxidáz adását követően 30—60 és 120 perc múlva az állatok mellkasát megnyitottuk, a szív bal kamrájába kanült vezetünk be, a jobb fülsét egy metszéssel átvágtuk és az állatokat fiziológias konyhasóval perfundáltuk cc 2 percig, amíg a vért kimostuk a vérpályából. Ezt követően a perfúziót 2,5% glutáraldehid + 4% formalin tartalmú rögzítőkeverékkel folytattuk 25 percig. A perfúziós fixálás befejezése után a mellékveséket kiemeltük, zsilettel kettévágtuk és a fenti fixálóban további 1 óráig rögzítettük, jégszekrényben 4 °C-on. A citokémiai vizsgálat céljára szolgáló 70—100 μm -es metszeteket Smith—Farquhar szövetszeletelőn készítettük. A fixáló kimosására a metszeteket hideg (+4 °C) 0,05 M-os Trisz-HCl pufferbe helyeztük (pH 7,65) 1 óra időtartamra. A torma peroxidáz citokémiai kimutatására GRAHAM-KARNOVSZKY módszerét [7] alkalmaztuk. Az inkubálás után a metszeteket 5 percig mostuk 0,05 M-os Trisz-HCl pufferben, majd OsO_4 -ben további 1 óráig rögzítettük. Az alkoholos és propilénoxidos víztelenítés után a mintákat Durcupán ACM-be ágyaztuk be. Az ultravékony metszeteket uranilacetát telített vizes oldatával és ólomcitráttal kontrasztoltuk. A felvételek JEM-100 B és TESLA-413-as elektronmikroszkópon készültek.

Eredmények

30 perccel a torma peroxidáz adását követően, viszonylag kevés reakcióvégterméket észleltünk a mirigysejtekben, ezért ábráink főleg az 1-, ill. 2-órás időpontból származnak.

A peroxidáz helyét és mennyiségét jelző elektrondenz reakcióvégtermék a kapillárisok melletti intercelluláris térben volt a legszembetűnőbb (2. ábra). Jelentős mennyiségű végterméket észleltünk a mirigysejtek laterális sejthártyái közötti intercelluláris térben (1., 4., 5., 8. ábra) is. Kis erősségű nagyítás esetén látható, hogy a peroxidáz a sejtek citoplazmájában mindenütt megfigyelhető, a sejthártyától távol, közvetlen a sejtmag szomszédságában is (1. ábra). A peroxidáz felvétel a sejt felszínén bárhol végbemehet; legnagyobb gyakorisággal azonban a kapillárisok melletti apikális sejtfelszínen figyelhető meg (2. ábra). Az apikális sejthártyán (2. ábra) gyakoriak a mélyreható membrán betüremkedések és tüskésszélű vezikulák, amelyekben jelentős mennyiségű reakció végtermék foglal helyet. Peroxidáz tartalmú, tüskésszélű vezi-

kulák a citoplazma mélyebb területein (2., 6. ábra) és a laterális plazmamembrán mentén is megfigyelhetők (4., 5. ábra).

A sejthártya mentén néha sima felszínű vezikulákban [7, 8] és nagy vakuolákban is lehet látni jelentős mennyiségű elektrondenz reakcióvégtérmeket (1., 3., 5. ábra).

A peroxidáz-felhalmozás legnagyobb gyakorisággal és legnagyobb mennyiségben a multivezikuláris testekben észlelhető. Reakcióvégtérmekekkel teli multivezikuláris testek a plazmamembrán szomszédságában (6., 7., 8. ábra), a sejtmag mellett (1., 6., 8. ábra) és a Golgi-apparátus területén egyaránt megtalálhatók (1. ábra). A multivezikuláris testekben néha az egyedi vezikulák is jól kivehetők (6., 7., 8. ábra). A multivezikuláris testek közvetlen szomszédságában sima felszínű, vagy tüskés felszínű vezikulák láthatók [6, 7] jelentős számban. A Golgi-zóna területén a szakkulusokban nem észleltük a peroxidáz jelenlétét, egyes kis vezikulákban (9. ábra) és multivezikuláris testekben azonban megfigyelhető volt az elektrondenz reakcióvégtérmekek. Egyéb sejtorganellumokban — mint a sejtmag, kromaffin granulák — mitokondriumok, durva felszínű endoplazmás retikulum — nem észleltük a peroxidáz jelenlétét, egyetlen inkubációs időtartam alatt sem.

Az eredmények megbeszélése

A mellékvese velő endocitotikus tevékenységét elsőként HOLTZMAN és DOMINITZ vizsgálták [9] patkányokon, torma peroxidáz adását követően. Szerzők megállapították, hogy a peroxidáz, vezikulákba, tubulusokba és „csésze-szerű” testekbe vevődik fel, mely utóbbiak multivezikuláris testecskeké transzformálódnak. E munkájukban szerzők nem hozták kapcsolatba a mellékvese velő endocitotikus tevékenységét a mirigy exocitotikus tevékenységével, minthogy utóbbi ez idő tájt még nem volt egyértelműen elismert. A szekréció és endocitózis kapcsolatát ABRAHAMS és HOLTZMAN 1973-ban vizsgálták meg [1] inzulinkezelést követően. Bár az exocitózisra vonatkozó megfigyeléseik nem meggyőzőek — ebben az új kísérletben is egyértelműen bizonyítást nyert, hogy a peroxidáz felvétel inzulinkezelést követően igen kifejezett. A peroxidáz tartalmú struktúrák egy része lizoszóma, más része — a felvételt követően fuzionál a lizoszómákkal s ennek eredményeként a felvett exogén fehérje endocitózis révén megemésztődik. Ezen eredmények birtokában szerzők feltételezik, hogy a kromaffin granulák határoló membránja — hasonló mechanizmus segítségével elemésztődik a hormon felszabadulását követően. Az exocitózis—endocitózis összekapcsolt voltára már elég régen, elég sokan gondoltak. Így PALADE [10] 1959-ben felvetette, hogy a kiürült zimogén granulák intakt membránrészletei felhasználódhatnak új szekréciós granulák képződése folyamán, FAWCET [6] viszont ezzel szemben azt állította,

hogy a granulák membránja a szekréción anyag kiürülése után degradálódik. A mellékvese velő vonatkozásában elsőként DINER [4] figyelte meg, hogy az exocitózis során kialakult omega alakú membránképződményeken tüskésszélű vezikulák fejlődnek ki. Elektronmikroszkópos vizsgálatok [2, 3] alapján mi is felvetettük, hogy ezek a tüskésszélű vezikulák szerepet játszhatnak az exocitózis során a plazma membránba beépülő granulum membránok sejttestbe történő visszaszállításában és lizoszómák általi elemésztésében. A tüskésszélű vezikulák thorotrast felvételét DOUGLAS és munkatársai [5] igazolni tudták mind a hipofízisben, mind a mellékvese velőben. Időközben ABRAHAMS és HOLTZMAN [1] is publikálta adatait patkány mellékvese velő peroxidáz felvételére vonatkozóan — így csupán az aranyhörsög mellékvese endocitotikus tevékenysége maradt továbbra is tisztázatlan. Minthogy az aranyhörsög mellékvese velő az exocitózis vizsgálatok klasszikus objektumává vált, alapvető fontosságúnak véltük annak megvizsgálását, miként viselkednek a kromaffin sejtek egy exogén fehérje bevitelét követően. Amint azt az eredményekben részletesen leírtuk, megállapítható volt, hogy tüskésszélű vezikulák, sima felszínű vezikulák egyaránt képesek felvenni és tárolni az exogén peroxidázt. Egy-egy kromaffin sejten néha igen magas volt a peroxidázzal teli sejtorganelumok száma, ami arra enged következtetni, hogy a mirigysejtek endocitotikus kapacitása igen nagy. A peroxidáz tartalmú struktúrák eloszlását vizsgálva azt láttuk, hogy nemcsak a plazmamembrán mentén, hanem a Golgi-arcában, és a sejtmag közelségében egyaránt jelentős számú peroxidáz tartalmú sejtorganelum van, s ez arra utal, hogy a peroxidáz transzport a kromaffin sejtekben igen erőteljes. Az a tény viszont, hogy 2 órával a peroxid adása után a legtöbb reakcióvégerterméket a multivezikuláris testekben láttuk, amellet szől, hogy az exogén fehérje végső sorsa; lizoszómális enzimekkel történő elemésztés.

Vizsgálatunk eredménye teljesen megegyezik ABRAHAMS és DOMINITZ patkányon tett megállapításaival [1], s ennek alapján az a következtetés tehető, hogy a patkány és aranyhörsög mellékvese kromaffin sejteinek endocitotikus tevékenysége lényegében megegyező annak ellenére is, hogy az exocitózis morfológiai képében vannak jelentős különbségek.

IRODALOM

1. ABRAHAMS, S. J., HOLTZMAN, E.: Secretion and endocytosis in insulin-stimulated rat adrenal medulla cells. *J. Cell. Biol.* **56**, 540—558 (1973).
2. BENEDECZKY, I., SMITH, A. D.: Ultrastructural studies on the formation and release of secretory material in the adrenal medulla of the golden hamster. *J. Physiol. (Lond.)* **218**, 15—16 (1971).
3. BENEDECZKY, I., SMITH, A. D.: Ultrastructural studies on the adrenal medulla of golden hamster: origin and fate of secretory granules. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **124**, 367—386 (1972).
4. DINER, O.: L'expulsion des granules de la médullo-surrénale chez le Hamster. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **265**, 616—619 (1967).

5. DOUGLAS, W. W., NAGASAWA, J.: Membrane vesiculation at sites of exocytosis in the neurohypophysis, adenohypophysis and adrenal medulla: A device for membrane conservation. *J. Physiol. (Lond.)* **213**, 94–95 (1971).
6. FAWCETT, D. W.: Physiologically significant specializations of the cell surface. *Circulation* **26**, 1105 (1962).
7. GRAHAM, R. C., KARNOVSKY, M. J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of the mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 291–302 (1966).
8. GRYSZPAN-WINOGRAD, O.: Morphological aspect of exocytosis in the adrenal medulla. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **261**, 291–292 (1971).
9. HOLTZMAN, E., DOMINITZ, R.: Cytochemical studies of lysosomes, Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in secretion and protein uptake by adrenal medulla cells of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* **16**, 320–336 (1968).
10. PALADE, G. E.: Functional changes in the structure of cell components. In: *Subcellular Particles*. T. Hayashi, ed. The Ronald Press Company, New York. p. 64 (1959).