

A SEJT- ÉS SZÖVETTENYÉSZETEK ÉLETJELENSÉGEI- NEK MEGFIGYELÉSE ÉS MORFOLÓGIAI FELDOLGOZÁ- SÁNAK LEHETŐSÉGEI

RAPPAY GYÖRGY

MTA Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézet, Budapest

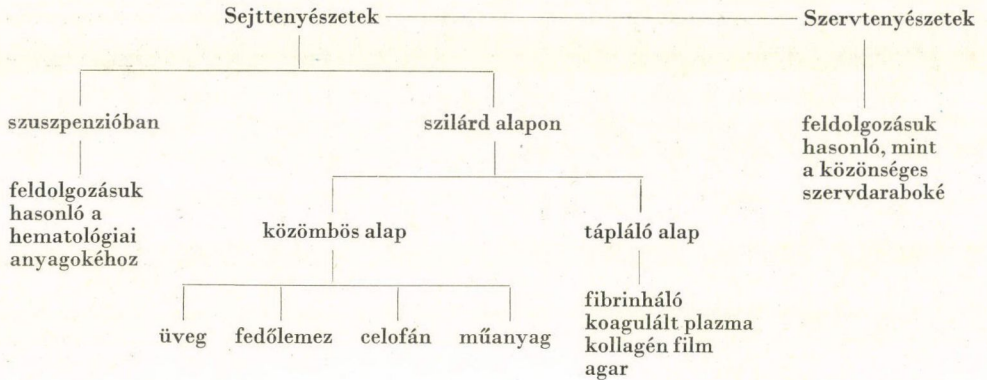
A sejt- és szövettanyésztés a biológiai tudományok alapvető eljárás-
módja, amely a korszerű vizsgálómódszerek helyes és célszerű alkalmazásával
szerkeztani (biontosztatikai), működéstani (biontodynamikai) és viszonyu-
lástan (hipotagológiai) információk egész tömegének feltárására volt képes
az elmúlt évtizedekben és úgy tűnik, ígéretes jövő előtt is áll.

A tenyészetek sejtjeinek életjelenségeit megfigyelő, alaktani — durva
és finomszerkezeti — vonásait leíró kutató elvben mindazokat a módszereket
felhasználhatja információ gyűjtésre, amelyeket a sejt kutatók a nem-tenyész-
tett sejtek vizsgálatára valaha is felhasználtak. Ezért a mi mondanivalónk
újtonságokkal alig vagy egyáltalán nem szolgál. Inkább arra törekedtünk,
hogy egyfajta szubjektív rendszerezés alapján tárgyaljuk az ismert mód-
szereket.

I.

A kultúrák sejtjeinek élő állapotban való szakaszos vagy folyamatos
megfigyelhetősége, majd az aratáskor a további feldolgozás attól függ, hogyan
választottuk a kiültetés módját. A teljesség igénye nélkül állítottuk össze
az első sémát, amelyen a kiültetési módokat foglaltuk össze.

A *szervtenyészetek* élőben való direkt megfigyelése finom mikroszkópos
módszerekkel nem valósítható meg. Feldolgozásuk módja pedig alig vagy
egyáltalán nem különbözik a közönséges szervdarabokétól. Szuszpenziós
sejtenyészetek — akár kis térfogatban, akár nagyobb tömegben kerülnek
kiültetésre — a dolog természeténél fogva szintén alkalmatlanok a mikrosz-
kópos megfigyelésre. Jóllehet az ilyen kultúrák sejtjeinek feldolgozása nagyon
hasonlít azokhoz az eljárásokhoz, amelyeket a hematológiai gyakorlatból
ismerünk, két körülményre felhívjuk azért a figyelmet. Szuszpenziók fény-
mikroszkópos feldolgozásához — megítélésünk szerint — a legkíméletesebb
eljárás a tárgylemezre való ülepítés, amelyet először GAILLRAD és SCHABERG [6]
használt kromoszóma preparálásakor. Elektronmikroszkópos vizsgálatokra az
Intézetünkben kidolgozott eljárást [10] azért tartjuk igen alkalmasnak, mert
megőrzi és jól láthatóvá teszi a sejtek finomszerkezetét; megbízható hiszto-



1. séma. Kiültetési módzatok a tenyésztésben

kémiai reakciókat tesz lehetővé; gazdaságos, egyszerű és könnyen reprodukálható. *Szilárd* (közömbös vagy tápláló) *alapon* *növő sejtenyészetek* a leggyakrabban előforduló példái a tenyésztési gyakorlatnak. Így ezek teszik leginkább próbára a kutató leleményességét, hogy tenyésztett sejtjeinek életképességét, anyagcseréjét és növekedését tanulmányozza és ebből lényeges következtetésre jusson.

II.

A sejtek életképességének megítélése. A tenyésztett sejtek életképességének megítélésében az élő és a fixált sejtek elemzése egyaránt hasznos eljárási mód [21]. Az életképesség egyik legfontosabb jele a sejtek *mozgékony-sága*, bár nem minden tenyésztett sejt fajta képes a helyváltoztatásra. A mozgékony-ság megfigyelése és a sejtek mozgási sebességének mérése viszonylag erős nagyítású fáziskontraszt vagy interferencia-kontraszt mikroszkópot [19], vagy ezeknél is bonyolultabb berendezést: mikrokine-matográfot igényel. (Bővebben lásd: [5].) Minél erősebb nagyítási rendszerben dolgozunk, annál inkább beszűkül a kiültetési módok választéka. Tehát az egyik legfontosabb életképességi jel direkt megfigyelése mindenfajta kultúra vizsgálatában nem lehet rutinszerű tevékenység. A helyváltoztató mozgásra képtelen sejtek életképességének a jele a *sejtek alakváltozása* is lehet, sőt a különféle *sejtorganellumok* lassú vagy gyors *sejten belüli mozgása* is. Akár az egyik, akár a másik jelet kívánjuk vizsgálni, nem kerülhetjük el a bonyolult optikai berendezést, csakúgy mint a motilitás elemzésénél [5].

Az élő sejtek szakaszos vagy folyamatos megfigyelése és a fenti jelek regisztrálása nem sérti a tenyészetek integritását. Bizonyos fajta — főleg szuszpenziós — tenyészetek sejtjeinek életképességét meg lehet ítélni szaka-

szos mintavétellel és a minták sejtjeinek „vitális” festésével vagy sejtszámolással. (Utóbbiról később még beszélünk.) A sejtek „vitális” festésén most a „dye exclusion test”-et értjük, amelyet legalább annyian felhasználnak, mint amennyien elvetnek az életképesség megítélésében. Az eljárás azon a tényen alapszik, hogy az élő sejtek citoplazma-membránja átjárhatatlan poláros színezékekre nézve, így a színezéket csak az elhalt sejtek halmozzák. A festett és festetlen sejtek számából az alábbi képlet szerint számítható ki az életképességi index: [12]

$$\frac{(\text{összes sejtek száma}) - (\text{elhalt sejtek száma})}{(\text{összes sejtek száma})} \times 100\%$$

Megítélhető azonban a sejtek életképessége fixált és festett készítmények elemzése alapján is, amikor a sejtek *morfológiai integritása* az életképesség jele. Ilyen jelek: a citoplazma-membrán épsége, a citoplazma bazofiliája, csekély lipidtartalma, a maghártya érintetlensége, az eukromatin fölénye a heterokromatin felett, a magvaeszkák előtűnése, az osztódó sejtek gyakorisága és egyebek. Ezeknek az ismérveknek az előtűntetésére *rutin festési eljárásokat* alkalmaznak, mint amilyen a jól ismert Giemsa-festés, metilzöld-pironin, gallocianin, Feulgen-festés és egyebek. Receptjeiket kézikönyvek különféle változatokban tartalmazzák [2, 8, 13, 14]. Minthogy egyik fontos vitális jel a citoplazma-membrán épsége és ez nehezen ismerhető fel közönséges fény-mikroszkópban, és mert az inert felszínen növő monolayerek gyakran olyan sűrűségben tartalmazzák a sejteket, hogy azok sejt-membránjának állapota nem egykönnyen ítélnélhető meg, néha szükség van a felületi részleteket jó feloldásban nyújtó *pásztázó elektronmikroszkópos* vizsgálatra [19]. A transzmissziós elektronmikroszkópban az elektronsugár áthatol a tárgyon és a sejtek belső szerkezetének elektronikus képét szolgáltatja. Ehhez minél vékonyabbra metszett tárgyra van szükségünk. A pásztázó mikroszkópban a fixált, nem metszett, arannyal vagy krómmal árnyékolt sejtek felületét cikkcakk vonalban tapogatja le a mintegy 100 Å átmérőjű és a tárgyra különböző hajlásszögben vetülő elektronsugárnyaláb. Ez a „primér” sugárnyaláb a tárgy felszínére esve, onnan „másodlagos” elektron sugarak kibocsátását is eredményezi. Majd mindkettő visszaverődik az egyenetlen felszínről és a visszavert sugarak a készülék érzékelőjébe (detektor) jutnak. Erősítés után, elektromos árammá alakítva modulálnak egy olyan elektronsugarat, amelyet televíziós képcső fluoreszkáló ernyőjére vetítenek. A képernyőn háromdimenziós relief jelenik meg a tenyésztett sejtek felületéről. Minthogy a feloldóképességet főleg a „primér” elektron sugárnyaláb átmérője határozza meg, az említett 100 Å egyben körülbelül a feloldóképességet is jelenti. Elképzelhető, hogy a citoplazmanyúlványok egész sokasága kerül így a vizsgáló szeme elé, amelyből nemcsak a sejtek életképességére, hanem a teljes felületi finomszerkezeti anatómiára kaphatunk értékes információkat.

III.

A sejtek anyagcsereje. A sejtek életképességét nemcsak morfológiai eszközökkel és módszerekkel lehet kimutatni. Sőt, néha egyedüli lehetőség a vitalitás megítélésében a kémiai folyamatok minőségi és mennyiségi elemzése, mert a kiültetési mód nem engedi meg optikai eszközök használatát. A kultúrák sejtjeinek *energiatermelése* a glukóz hasítás eredménye. Ez két lépésben történik: az első szakaszban a glukóz piruváttá bomlik, amely két magas energiájú foszfát kötés felszabadulásával jár. Ez a folyamat az aerob vagy az anaerob körülmények közötti glikolízis. A második szakasz oxigénigényes, amikor piruvát molekulák széndioxiddá és vízzé oxidálódnak. Ebben a szakaszban az előzőhöz képest lényegesen több magas energiájú foszfát kötés szabadul fel. A glikolízis következménye: piroszőlősav és tejsav megjelenése a tápfolyadékban. Ez a *savtermelés* megváltoztatja a médium hidrogénion koncentrációját és az abban lévő indikátor jelzi a pH-eltolódást. A tápfolyadék savanyúságából tehát durva következtetés vonható a kultúra életképességét illetően. Virális, bakteriális vagy gombás fertőzés eseteiben gyakran a lúgos irányba tolódik a tápfolyadék pH-ja, melyet az indikátor színváltozása jelez. Vannak azonban olyan sejt fajták, amelyeknek természetes tulajdonsága a pH 7,4–7,5 környezetben való optimális életképesség, ezért a tápfolyadék lúgosodásából nem okvetlenül következtethetünk fertőzésre. A tenyésztett sejtek anyagcsere folyamatainak objektív mérése az *oxigénfelvétel* vagy a *széndioxid-termelés* alapján „klasszikus” biokémiai vagy mikrokémiai eljárásokkal lehetséges. A sejtek oxigénfelvétele légzésük mértéke, amely vagy Warburg-manometriával [20], Cartesius-búvárban [7] vagy elektrokémiai eljárásokkal [3] egzaktan mérhető. Mindhárom eljárás bonyolult, műszerigényes és csak speciális esetekben lehet rutinná alakítani. A széndioxid-termelés az élő sejtek légzésének következménye, ugyancsak mérhető Warburg-manometriával. Ha a mérőrendszerben nincsen széndioxid abszorbens, a manométerben leolvasott térfogatváltozás az oxigénfogyasztás és a széndioxid-termelés összegét jelenti. Ha az oxigénfogyasztást egyidejűleg mérjük, a széndioxid termelés mértéke kiszámítható. Nemcsak a sejtek anyagcsere termékeinek és a tápfolyadék különféle alkotórészeinek, pl. glukóz, aminosavak, vitaminok stb. méréséből lehet következtetni a sejtek életképességére, hanem a sejten belül lezajló *anyagcsere-reakciók* vizsgálata is mérvadó lehet. Az anyagcsere-reakciók megítélésének egyik módja a sejtek aktív metabolikus anyagkészletéből valamelyik alkotórész kimutatása. Külön előadássorozatot lehetne szentelni ennek a témakörnek, hiszen a lehetőségek szinte korlátlanok. Jelenleg azonban csak néhány ultrastrukturális citokémiai elvre hívjuk fel a figyelmet. Az ultrastrukturális citokémia lehetővé teszi számunkra, hogy természetüknél fogva elektronsugár-elnyelő vagy mesterségesen ilyenné tehető sejt-komponenseket vehessünk vizsgálat alá. A természetes elektron-

sugár-elnyelő anyagok: a szabad vagy kötött nehéz fémsók (pl. vas, ferritin, hemoglobin), bizonyos szervetlen sók (pl. kalciumfoszfát), és nagyszámú szerves vegyület (pl. nukleinsavak), aminok és polipeptidok (pl. katecholaminok, szerotonin, vazopresszin), szekréciós fehérjék (pl. pepszin, hasnyálmirigy enzimek, glukagon, inzulin) [4]. Jelenleg több olyan alapelvet ismerünk, amelyek révén átereszthető alkotórészeket elektronsugár-elnyelővé tehetünk és így intracellulárisan ezek is azonosíthatóvá válnak: (i) olyan fajlagos vegyületeket alkalmazunk, amelyeknek a kimutatandó anyag iránt nagy az affinitásuk és elektronsugár elnyelő csapadékot vagy komplexet alkotnak egymással: a nátrium ionok piroantimonátokkal láthatóvá tehető, ugyanígy a glikogén ólomionokkal, hogy triviális példákat említsünk; (ii) amennyiben a meghatározandó intracelluláris anyag enzim természetű, reagáltatjuk őket megfelelő természetes vagy mesterséges szubsztátumokkal, amelyek denz terméket eredményeznek: foszfatázok, arilszulfatázok, észterázok [11] és egyéb enzimek kimutatása és lokalizálása mindenki számára elérhető rutin eljárásá alakítható; (iii) amennyiben a sejtalkotórész antigén természetű, a vele szemben termeltetett specifikus antitesttel kötve és a komplexet denz markerekkel (pl. feritin vagy peroxidáz) jelölve az elektronmikroszkópban is láthatóvá tehető [1, 9]. A citológiai gyakorlatnak jelenleg a kezdetén álló új eljárási mód, amely a sejtenyészetek morfológiai elemzése mellett egzakt mikrokémiai információkat is nyújt: az *elektronsugár-röntgen-mikroanalízis* (electron probe x-ray microanalysis). A periódusos rendszer minden egyes atomcsaládjára különböző hullámhosszúságú és jellegzetes röntgen sugarat bocsát ki, amikor elektronsugarakkal bombázzák őket. Minél könnyebb egy elem, annál hosszabb karakterisztikus röntgensugárzásának hullámhossza. Ezt az elvet használták fel az analitikai elektronmikroszkóp készítői, amely scanning módon működik. A tárgyról a ráeső elektronsugár hatására kilépő röntgensugarakat kristály-detektor „érezkeleli”. Erősítés és elektromos jellé való alakítás következik. A jel erőssége arányos a kibocsátott sugár erősségével. Ezáltal meghatározható a „sugárforrás”, tehát a tárgyban lévő elem koncentrációja és természetes egyidejű lokalizálása is. Korábban a scanning eljárási mód leírásakor megemlítettük a feloldóképességet, amely 100–200 Å tehát organellum nagyságrendű, és azt is leírtuk, hogy a sejt felszín finomszerkezeti anatómiája minden nehézség nélkül feltárható. Ehhez hozzátehetjük a mikroanalízis „képességét”: a kémiai összetétel térképének elkészítését. Magyarázat nélkül is belátható, milyen biztató jövő felé nézünk, amelynek előjele az MTA Szegedi Biológiai Központjának analitikai elektronmikroszkópja.

A sejtnövekedés. A tenyésztés sikerét nemcsak a sejtek vitalitása, hanem növekedése és szaporodása is jelzi. A növekedésen a protoplazma felszaporodását és ennek következtében a sejtnek vagy fontos alkotórészeinek térfogatnagyságát értjük. A sejtszaporodás pedig a térben és az időben

zajló autonóm folyamat, amelynek során önálló egymagvú sejtek két — körülbelül azonos nagyságú — egyenként a legfontosabb citoplazma-szervecskéket és egymáshoz hasonló egyenértékű sejtmagot tartalmazó utódsejteket hoznak létre [18]. A növekedés önmagában szemmel alig vagy egyáltalán nem követhető, a szaporodás szemmel látható jele a kromoszómák megjelenése.

A *sejtnövekedés* mértékének meghatározására többféle módszert alkalmaznak. Minthogy a növekedés nem egyszerű térfogatbővülés, hanem anyag-többlet is, kézenfekvő a sejtek tömegének mérése, amely például interferencia mikroszkóppal valósítható meg [15, 19]. Pontossága vitathatatlan, nagy munkaigénye miatt azonban nem vált rutin eljárássá. Sokkal inkább alkalmazzák a fehérje- és DNS-szintézis mértékének megítélésére szolgáló *biokémiai méréseket* és *autoradiográfiás módszereket*. Az előbbieken is érdemes a radioaktív izotópok alkalmazása, mert ezek révén nemcsak a kultúrák netto fehérjetermelését vagy a sejtek nukleinsav gyarapodását, hanem a szintézis időösszefüggéseit, valamint egyes kitüntetett molekulák keletkezésének sebességét is mérni lehet [17]. Az autoradiográfiás módszerek ismertetésének korábban külön szimpóziumot szenteltek (pl. 16). Így most csak annyit szeretnénk hangsúlyozni, hogy méltatlanul kevés a szövettenyésztési gyakorlatban a fehérje- és nukleinsav-prekursorok felhasználása. Holott különösen a monolayerek szinte önként kínálják magukat az ilyen feldolgozásra. Őszintén reméljük, hogy az ezután következő kinetikai előadások méltatlankodó ítéletünket megdöntik. A sejt szám gyarapodás megállapításának legegyszerűbb módja a *sejtszámlálás*, amely már a sejt szuszpenziók kiültetésekor lényeges és fontos tevékenység. Később a szubkultiválások idején vagy az aratáskor, vonatkoztatási számként a tenyésztés sikerének mértékadója. Sajnos azonban pontatlan eljárás, akár a legegyszerűbb eszközzel (Bürker-kamra), akár pedig különféle műszerrel (pl. celloszkóp) végezzük. Nem is az eszközök okozzák a pontatlanságot, hanem a rendszeres hibát ez egyszer a sejt szuszpenziók egyenetlenségében kereshetjük: a szuszpenzió például nemcsak egyedi, különálló sejteket, hanem aggregátumokat is tartalmaz, vagy a sejtek nagysága nem egyöntetű és így a műszer mérési küszöbét úgy kell megválasztanunk, hogy az nemcsak ép, hanem törmelék sejteket is számlál. Van azonban még egy inherens hibaforrás, és ez a sérült vagy a holt sejtek jelenléte, amelyek szükségképpen hamis számolási eredményhez vezetnek. A pontos számláláshoz lehetőséget nyújtanak más független eljárások: a „dye exclusion test”, valamelyik enzim aktivitásának egyidejű meghatározása, a mitózis index kiszámítása, a „growth fraction” meghatározása és egyebek. Ezek közül egyesekről a következő előadásokban minden bizonnyal hallani fognak.

V.

A tenyésztett sejtek életjelenségeinek a megfigyelése és a leírása — mint láttuk — nem könnyű és nem is egyszerű feladat. Néha a morfológiai módszerek és eszközök mit sem érnek, máskor éppen ezek használatával derül fény sejtbológiai problémáinkra. Akármelyik eszköz áll is azonban a rendelkezésünkre, egy sem ér semmit, ha nem vagyunk tisztában azzal, mit várhatunk a szövettenyésztési technikától.

IRODALOM

1. BAKER, B. L., PEK, S., MIDGLEY, A. R. Jr., and GERSTEIN, B. E.: Identification of the corticotropin cell in rat hypophyses with peroxidase-labeled antibody. *Anat. Rec.* **166**, 557—568 (1970).
2. BARKA, T. and ANDERSON, P. J.: *Histochemistry. Theory, Practice, and Bibliography.* Harper and Row, New York (1963).
3. CHASE, G. D. and BIERLY, J. N.: Transducers. In: NEWMAN, D. W. (ed.): *Instrumental methods of experimental biology*, Macmillan Co., New York 428—492 (1964).
4. CONSTANTINIDES, P.: *Functional electronic histology.* Elsevier, Amsterdam (1974).
5. FAZEKAS I.: Mikrokinematográfiai vizsgálatok lehetősége és jelentősége sejtenyésztetek vizsgálatában. *MTA Biol. Oszt. Közl.* **20**, 265—271 (1977).
6. GAILLARD, J. L. J. and SCHABERG, A.: A new spreading procedure for human chromosomes. *Exp. Cell. Res.* **36**, 415—417 (1964).
7. GLICK, D.: *Techniques of histo- and cytochemistry.* Interscience Publ. New York (1949).
8. KISZELY GY. és BARKA T.: *Gyakorlati mikrotechnika és hisztokémia*, Medicina (1958).
9. NAKANE, P. K., and PIERCE, G. B., Jr.: Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J. Cell Biol.* **33**, 307—318 (1967).
10. ÖKRÖS I., BÁCSY E. és RAPPAY GY.: Szuszpendált sejtek feldolgozása elektronmikroszkópos enzimcitokémiai vizsgálatokra. *Biol. Közlem.* **18**, 69—74 (1970).
11. ÖKRÖS, I., FAZEKAS, I., BÁCSY, E., RAPPAY, GY., and TÖRÖ, I.: Hydrolytic enzyme activity of rat thymic cells grown in vitro. An electron-microscopic study. *Histochemie* **20**, 108—115 (1969).
12. PAUL, J.: *Cell and tissue culture.* E. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh, 3rd ed. (1965).
13. PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry. Thoretical and Applied. Vol. 1,* Churchill Ltd. London (1968).
14. PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry. Theoretical and Applied. Vol. 2,* Churchill Ltd. London (1972).
15. RAPPAY GY.: Citológiai mérőmódszerek. *MTA Biol. Oszt. Közl.* **7**, 329—340 (1964—65).
16. RAPPAY GY.: A fénymikroszkópos autoradiográfia néhány kérdése. *MTA Biol. Oszt. Közl.* **12**, 99—116 (1969).
17. RAPPAY GY.: A riboszoma-ribonukleinsav mennyiségi megoszlásának citokémiai elemzése. *MTA Biol. Oszt. Közl.* **13**, 235—243 (1970).
18. RAPPAY GY.: A sejtsszaporodás kinetikája. *MTA Biol. Oszt. Közl.* **15**, 197—204 (1972).
19. SZABÓ D.: Modern biológiai mikroszkópos vizsgáló módszerek. A biológia aktuális problémái, *Medicina*, Budapest pp. 9—71 (1975).
20. UMBREIT, W. W.: Manometric devices. In: *Instrumental methods of experimental biology*, ed. NEWMAN, D. W., Macmillan Co., New York 394—404 (1964).
21. WOODLIFF, H. J.: *Blood and bone marrow cell culture.* Eyre and Spottiswoode, London (1964).