

Budapesti Orvostudományi Egyetem Szövetteni és Fejlődéstani Intézetének (igazgató: dr. Törő Imre egyet. tanár, akadémikus)

és

Magyar Tudományos Akadémia, Kísérletes Orvostudományi Kutatóintézet Kísérleti Morfológiai Osztályának (osztályvezető: dr. Törő Imre akadémikus) közleménye

CITOKÉMIAI VIZSGÁLATOK ÉHEZŐ ÉS ETETETT AMÓBÁKON

MÜLLER MIKLÓS és RAPPAY GYÖRGY

Bevezetés

Az intracelluláris emésztés, a fagocitált táplálék lebontása és hasznosítása a sejtek anyagcseréjének egyik igen érdekes kérdése. Az idevágó problémák tanulmányozására jó objektumok a nagyméretű amőbafajok (*Amoeba proteus*, *Chaos chaos* stb.), amelyek lehetővé teszik több kérdés morfológiai és citokémiai vizsgálatát is. Az említett fajok citológiájával [1, 8], citokémiájával [2, 4, 8], a táplálékfelvétel és emésztés kérdéseivel [1, 5, 6, 7] már sokan foglalkoztak. Tudomásunk szerint azonban modern citokémiai módszerekkel még nem próbálták követni a felvett táplálékban levő anyagok sorsát. MAST [5] neutrális zsírokat tartalmazó táplálék etetése után nílusképszulfáttal szabad zsírsavakat mutatott ki az emésztővakuolumban, amiből a zsírok emésztésére következtetett. PAPPAS [8] FEULGEN-reakció segítségével megfigyelte, hogy DNS idősebb emésztővakuolumokban levő, erősen emésztett táplálékban is kimutatható. A jelenséghez azonban nem fűzött további magyarázatot. Jelen munkánkban vizsgálataink első szakaszáról számolunk be, amelynek során elsősorban a fehérjék, nukleinsavak és poliszacharidák kimutatására törekedtünk.

Anyag és módszer

Vizsgálati objektumunk a könnyen tenyészthető és nagyméretű *Amoeba proteus** volt. Az állatokat üveg lepárlócsészékben igen híg, mindössze 1,2 mg% ásványi anyagot tartalmazó oldatban (PRESCOTT-oldat) tartottuk és 1% pepton-oldatban tenyésztett *Tetrahymena pyriformis*szal etettük [9].

A vizsgálatra szánt amőbákat 24–48 óráig tiszta PRESCOTT-oldatban éhezettük. A Petri-csészébe helyezett egyedekhez sok *Tetrahymenát* adtunk. 30 perc múlva a fel nem vett táplálékstruktúrákat ismételt folyadékcserevel eltávolítottuk a csészéből. Az etetés után 12 órán keresztül óránként, majd további 12 órán keresztül 2 óránként rögzítettük az állatokat formol-alkoholban (1 : 9). Más kísérletekben élő egyedeket vizsgáltunk.

* Az *Amoeba proteus* törzseket J. F. DANIELLI professzortól (London) és H. HOLTER doktortól (Koppenhága), a *Tetrahymena pyriformis* LG törzset O. JIROVEC professzortól (Prága) kaptuk. A vizsgálati anyag szívés átengedéséért ezúton is köszönetet mondunk.

A rögzített anyagot részben totálkészítményekben (celloidincsapda módszer [8]), részben paraffinmetszetekben vizsgáltuk. A citológiai kép tanulmányozására hematoxilin-eozin festést végeztünk. A nukleinsavakat FEULGEN-reakcióval (DNS) és metilzöld-pyronin festéssel (DNS és RNS), a fehérjéket a DANIELLI-féle diazoniumreakcióval, a poliszacharidákat perjósav-SCHIFF reakcióval mutattuk ki. Egyes esetekben még Giemsa-oldattal is festettünk és elvégeztük az alkálikus és savas foszfátáze reakciót. Az utóbbiak azonban nem adtak értékelhető eredményeket.

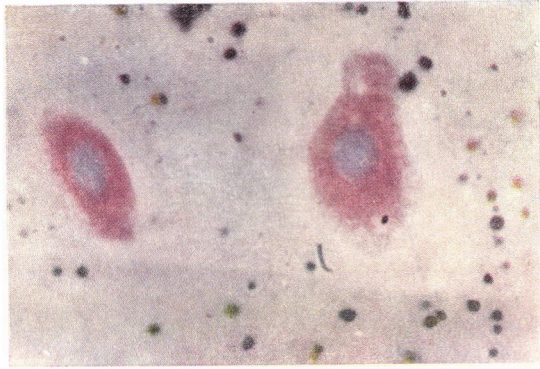
A közölt mikrofelveleteken minden bemutatott eljárással három jellemző időpontban készült metszet képét mutatjuk. Az első időpontban, az etetés után 30 perccel a bekebelezési vakuolumot láthatjuk. A táplálékszervezet ilyenkor még él vagy csak nemrégén pusztult el, és ellenőrző citokémiai megfigyeléseink tanúsága szerint a vizsgált citokémiai jellegek tekintetében nem különbözik az ép egyedektől. A bekebelezési vakuolumban levő egyedeket tehát nyugodtan azonosíthatjuk a kiindulástádiummal. A második időpont, a 6. óra az emésztővakuolumot mutatja működése teljében, a 20. órában viszont többnyire már csak defekációs vakuolumokat találunk az állat testében.

Eredmények és megvitatásuk

A nem etetett állatok citokémiájának és citológiájának ismeretéhez saját vizsgálataink alig adtak újat. Idevágó megfigyeléseinkről csupán a további tárgyalás megkönnyítésére emlékezünk meg röviden.

Az állat testét hematoxilinnal feltűnően festődő vékony pellikula borítja. Ez a képlet PAS-reakcióval vékony, de erős reakciót adó vonal alakjában tűnik fel. A pozitív reakció okai PAPPAS [8] szerint mukopoliszacharidák. A citoplazma szemcsés, hálózatos szerkezetű (a struktúra kialakulásához valószínűleg a mikrotechnikai kezelés is hozzájárul), erős fehérjereakciót, RNS-tartalma következtében [2] gyenge pyroninofiliát mutat és — valószínűleg glikogéntartalma miatt [2] — gyengén PAS-pozitív. Az ovális mag hártványához nagyszámú magvacska fekszik. A mag közepén erősen zsugorodott karyosoma foglal helyet. A mag különböző elemei erős fehérjereakciót adnak, a magvacskák erősen pyroninofilek. A karyosoma metilzölddel és FEULGEN-reakcióval igen halványan festődik, ami kicsiny DNS-tartalmával magyarázható [4].

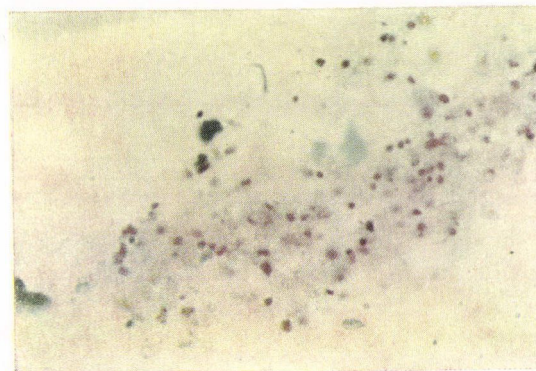
Az állat táplálékfelvétele és az emésztés az élő egyedek megfigyelése alapján a következőképpen játszódik le. Az állat a táplálékát állábaival oly módon veszi körül, hogy a bekebelezett egyed körül egy nagy (a felvett táplálékszervezet méreteit 2—5-szörösen meghaladó) ún. bekebelezési vagy ingestációs vakuolum jön létre. *Tetrahymenával* etetett amóbák vakuolumaiban egy, ritkábban két egyedet találunk. A táplálékszervezetek a vakuolumok-



1

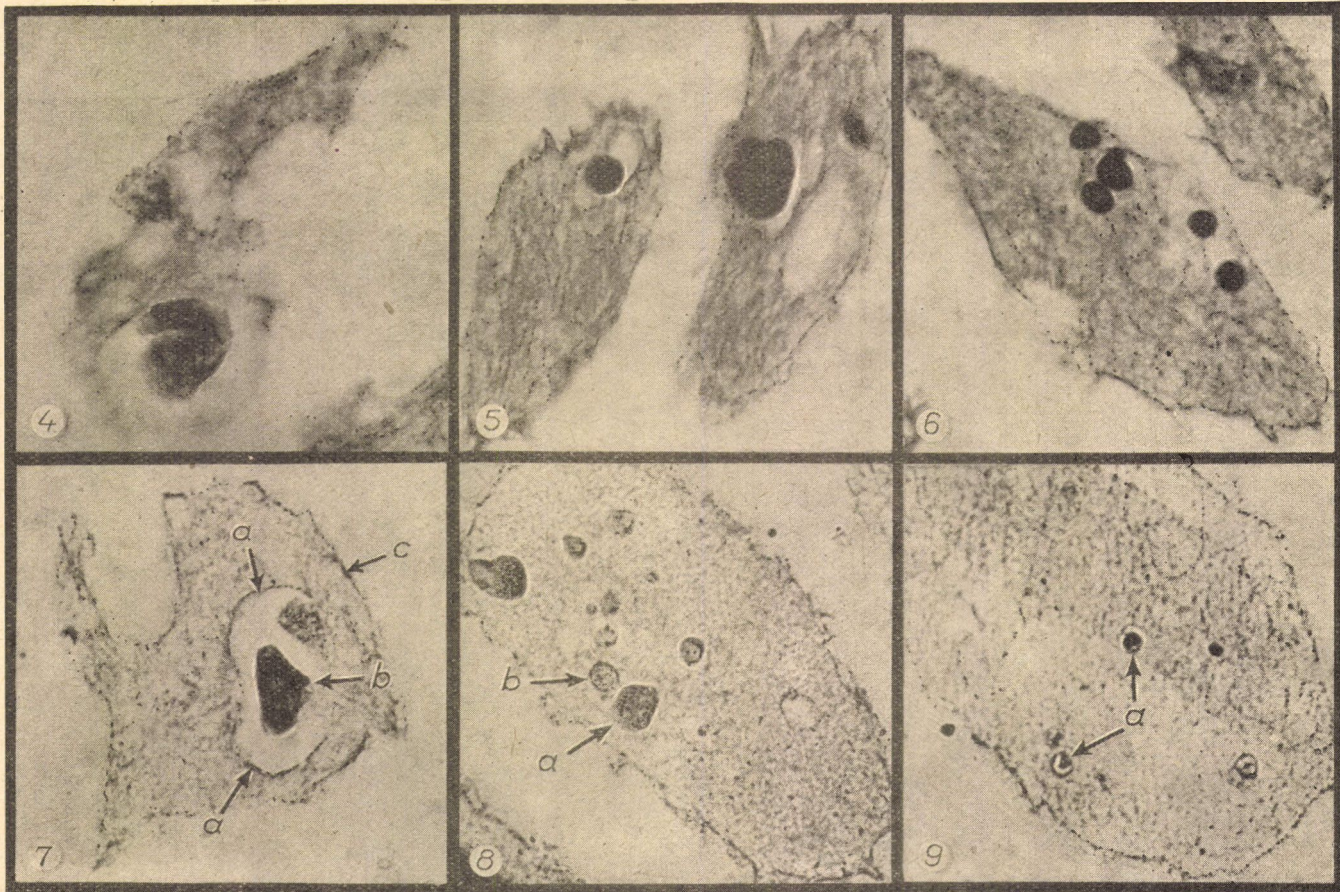


2



3

1—3. ábra. *Tetrahymena pyriformis*-szal etetett *Amoeba proteus* etetés után 30 perccel (1. ábra), 6 órával (2. ábra) és 20 órával (3. ábra). A nyilak metszéspontján a táplálék metilzölddel még festődő makronukleusa. Paraffinbeágyazás, metilzöld-pyronin festés



4—9. ábra. *Tetrahymena pyriformis*szal etetett *Amoeba proteus* etetés után 30 perccel (4. és 7. ábra), 6 órával (5. és 8. ábra) és 20 órával (6. és 9. ábra). Paraffinbeágyazás, DANIELLI-féle fehérjereakció (4—6. ábra), PAS-reakció (7—9. ábra). 7. ábra. *a* — vakuolum PAS-pozitív fala, *b* — táplálék *c* sejtfal, 8. ábra. *a* — kevéssé, *b* — igen erősen emésztett táplálék. 9. ábra. *a* — igen erősen emésztett táplálék

ban még 15—25 percig életben vannak, igen élénken mozognak, lüktető vakuolumuk működése is jól megfigyelhető. A bekebelezési vakuolum a táplálékkal együtt körülzárt vizet átadja a protoplazmának, fokozatosan összehúzódik és végül emésztővakuolummá alakulva szorosan körülveszi a már elpusztult táplálékot. Az élő objektumok vizsgálatakor is megfigyelhető, hogy az emésztővakuolum fala a bekebelezési vakuolum falánál gyengébben látható. Az emésztővakuolum, feltételezhetően a plazma aktív kontrakciója következtében több ízben befűződik és kisebb, általában egyenlő nagyságú leányvakuolumokra darabolódik. Irodalmi adatok szerint az emésztővakuolumok az aktívan áramló test hátsó végén foglalnak helyet. Saját megfigyeléseink is azt mutatták, hogy a vakuolumok általában hátul foglalnak helyet, azonban igen gyakran láttuk, hogy azokat a plazmaáramlás a rendszerint középen fekvő mag elé, sőt az elöl újonnan képződő állabak tövébe is elsodorta. A kezdetben durván szemcsézettnek tűnő táplálék szemcséi fokozatosan finomabbak lesznek. Az emésztővakuolum az emésztés befejeztével ismét kitágul, defekációs vakuolummá alakul, a pellikulához fekszik és megnyilva emésztetlen tartalmát kilöki.

Az emésztés lefolyásának pontos időrendjét eddigi megfigyeléseink alapján még nem tudtuk összeállítani, annyit azonban máris megállapíthatunk, hogy esetünkben 18—20° hőmérsékleten a táplálékfelvétel, emésztés és salakleadás a felvett táplálék mennyiségétől és a kialakult vakuolumok számától függően 15—24 óra alatt lejártszódik.

A nukleinsavak kimutatására szolgáló FEULGEN-reakció és a metilzöld-pyronin festés eredményei szerint a táplálékul szolgáló *T. pyriformis* makronukleusa DNS-ben és RNS-ben, citoplazmája RNS-ben igen gazdag (1. ábra). Az RNS szemcsés állapotban van jelen, később homogén festődést mutat (2. ábra). Az RNS az emésztés végén a táplálékból rendszerint teljesen eltűnik és a vakuolumban csak nem festődő maradék található. DNS jelenlétére utaló metilzöld festődést azonban gyakran találunk a defekációs vakuolumokban is (3. ábra). FEULGEN-reakcióval kezelt metszeteink is hasonló képet mutatnak. PAPPAS is megfigyelte FEULGEN-pozitív rögök jelenlétét az emésztés késői stádiumaiban [8]. Feltételezésünk szerint az amőba, amelynek magja csak kevés DNS-t tartalmaz, valószínűleg nem képes a táplálék nagy mennyiségű DNS-ét maradéktalanul lebontani. Ezt a morfológiai képen alapuló elképzelésünket természetesen más módszerekkel kell majd eldönteni.

A bekebelezett és még élő állapotban rögzített táplálékstruktúrák szemcsés fehérjereakciót mutatnak (4. ábra). Ez a struktúráltság az emésztés folyamán teljesen eltűnik és az emésztővakuolum tartalma homogén lesz (5. ábra). A defekációs vakuolumban levő, kilökésre kerülő részecskék is sötétre festődnek (6. ábra). Reakciót nem adó részecskéket a legidősebb vakuolumokban is csak ritkán találtunk. Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy a felvett fehérjék részben emésztetlenül távoznak.

A poliszacharidákat kimutató PAS-reakció az emésztetlen táplálékban szemcsés jellegű (7. ábra), majd hamarosan homogénné válik (8. ábra), gyorsan halványodik (9. ábra) és az emésztés végére általában eltűnik. A *T. pyriformis* nagy mennyiségű glikogént tartalmaz és így a megfigyelt jelenség valószínűleg a glikogén lebontásának felel meg.

Morfológiai és citokémiai vizsgálatok alapján biokémiai következtetéseket nehéz levonni. Fenti eredményeinket egyelőre még korai lenne az *A. proteus* eddig megismert emésztőfermentumaival [2] kapcsolatba hoznunk. További vizsgálatok szükségesek, míg a két kutatási irány összekapcsolására mód nyílik.

A bekebelezési vakuolum fala fehérjereakcióval vékony vonal alakjában mutatható ki (4. ábra), PAS-reakcióval erősen festődik (7. ábra), éppúgy, mint a pellikula. Ez a tény a két struktúra genetikus kapcsolatával könnyen magyarázható, hiszen a vakuolum fala tulajdonképpen a sejt belsejébe türemkedett sejtfelszín. Az emésztés megindulása után a vakuolum falának fehérjereakciója nem változik észrevehetően, PAS-reakciója azonban erősen csökken (8. ábra). A reakció csökkenése, a gyengébb fénytörés in vivo arra mutatnak, hogy az emésztés folyamatával kapcsolatban nemcsak a bekebelezett táplálékban, hanem a vakuolum falában és esetleg környékén is jelentős strukturális és kémiai változások következnek be. A bekebelezési és emésztővakuolum falának szerkezetében elektronmikroszkóppal is sikerült különbségeket kimutatni [3].

Összefoglalás

Az *Amoeba proteus* emésztésének morfológiai és citokémiai tanulmányozására éheztetett és etetett egyedeket vizsgáltunk in vivo és rögzített készítményeken. Az amóbákat *Tetrahymena pyriformis*szal etettük. Az éhező állatok szolgáltak kontroll állatokként. A rögzített készítményeken a nukleinsavakat FEÜLGEN-reakcióval és metilzöld-pyronin festéssel, a fehérjéket a DANIELLI-féle diazoniumreakcióval, a poliszacharidákat a perjódsvav-SCHIFF reakcióval mutattuk ki. A bekebelezési vakuolum fala ugyanolyan feltűnő, mint a pellikula és erős PAS-reakciót ad. Az emésztővakuolum fala viszont alig látható és majdnem PAS-negatív. Ezek a tények arra mutatnak, hogy a vakuolum falában az emésztés megindulásakor mélyreható változások következnek be. A bekebelezett táplálék fokozatosan felaprózódik. A ribonukleinsav, a fehérjék és poliszacharidák kezdetben szemcsés reakciót adnak, amely később homogénné válik. A citokémiai reakciók arra engednek következtetni, hogy az amóba felhasználja a táplálékszervezetek teljes ribonukleinsav és poliszacharida tartalmát. A dezoxiribonukleinsav és a proteinek csak részben emésztődnek meg és egy részük kiürül.

IRODALOM

1. ANDRESEN, N.: Cytological investigations on the giant amoeba, *Chaos chaos*. C. R. Lab. Carlsberg, Sér. chim., 29, 435—555, 1956.
2. BRACHET, J.: Biochemical cytology. Academic Press, New York. 1957.
3. GREIDER, M. H., KOSTIR, W. J., FRAJOLA, W. J.: Electron microscopy of *Amoeba proteus*. J. Protozool., 5, 139—146, 1958.
4. HELLER, I. M., KOPAC, M. J.: Cytochemical reactions of normal and starving *Amoeba proteus*. I. Localisation of thiols, DNA, RNA and other organic phosphates. Exp. Cell Res., 8, 62—75, 1955.
5. MAST, S. O.: Digestion of fat in *Amoeba proteus*. Biol. Bull., 75, 389—394, 1938.
6. MAST, S. O.: The hydrogen ion concentration of the content of food vacuoles and the cytoplasm in *Amoeba* and other phenomena concerning the food vacuoles. Biol. Bull., 83, 173—204, 1942.
7. MAST, S. O., HAHNERT, W. F.: Feeding, digestion and starvation in *Amoeba proteus* (LEIDY). Physiol. Zool., 8, 255—272, 1935.
8. PAPPAS, G. D.: Structural and cytochemical studies of the cytoplasm in the family Amoebidae. Ohio J. Sci., 54, 195—222, 1954.
9. PRESCOTT, D. M.: Mass and clone culturing of *Amoeba proteus* and *Chaos chaos*. C. R. Lab. Carlsberg, Sér. chim., 30, 1—12, 1956.