B 5049

MORPHOLOGIAI ÉS BIOKÉMIAI VIZSGÁLATOK HIDEG- ÉS MELEG SHOCK-KEZELT TETRAHYMENA PYRIFORMIS GL TÖRZSÉN

Irta

Németh Gábor

tanársegéd

Egyetemi Könyvtár SZTE SZEGED 14.

Készült

a Szegedi Orvostudományi Egyetem Biológiai Intézetében

Igazgató: Dr.Kiszely György

- 1964 -

B 5048
SZTE Egyetemi Könyvtár 14 SZEGED
ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM KÖNYVTÁRA Szeged
E 1.124

T a r t a l o m

Az egysejtűek tisztatenyészetének jelentősége..... 1

A Tetrahymena pyriformis rendszertani helye és a vele végzett kisérletek eredményeinek jelentősége..... 6

A Tetrahymena pyriformis osztódásának hőhatásra történő synchronizálása..... 12

Kisérleti rész

Szaporodási és morfológiai vizsgálatok a hideg- és meleg- kezelt Tetrahymenákon..... 21

A hideg- és meleg- shock hatás alkalmazása..... 23

A hideg- és meleg- kezelt állatok szaporodása..... 26

A hideg- és meleg- kezelt állatok sejtméretei..... 32

Enzimaktivititási vizsgálatok a hideg- és meleg- kezelt Tetrahymenákon..... 38

A kisérleti eredmények megvitatása..... 49

Összefoglalás..... 58

Az egysejtűek tisztatenyészetének jelentősége

1893-ban OGATA /63/ japán kutató volt az első, akinek sikerült egysejtűeket - melyek addig természetes körülmények között éltek - baktériummentesen tisztán kitenyészteni. Az ő kisérleti és vizsgálatai nyomán indultak meg azok a munkák szerte a világon, amelyeket egysejtű tiszta tenyészetekkel végeztek. Ő már akkor látta munkája eredményének jelentőségét és meg is állapitja közleményében, hogy az általa kidolgozott módon tisztán kitenyésztett egysejtűek különösen alkalmassá váltak fiziológiás vizsgálatokhoz.

A protozoonok irányában kifejtett nagy érdeklődést abban kell keresnünk, hogy sejtjeikben megtaláljuk az összes alapvető életfolyamatokat, különböző fajokban igen változatos formában. Az élőanyaggal kapcsolatos számtalan kérdés tanulmányozható rajtuk cellularis szinten anélkül, hogy a soksejtű szervezetek bonyolult sejtközötti kapcsolatai, hormonális és idegi integrációi azokat befolyásolnák. Több különböző faj összehasonlitásával betekintést nyerhetünk az anyagcsere és más fiziológiai folyamatok evolucionális utjaiba. Az igy kapott eredmények gyakorta vonatkoztathatók magasabbrendü állatcsoportokra is /66/. Az egysejtűekkel végzett vizsgálatok annál jobb és pontosabb eredményekkel kecsegtetnek minél tisztább tenyészet áll a kutató rendelkezésére. Anyagcsere- fiziológiai és biokémiai kérdéseket megbizható módon kizárólag csak

tiszta tenyészetekkel vizsgálhatunk. A bakteriológiában már régóta előfeltétele a kutatásnak a vizsgált baktérium tiszta tenyészete és ez az igény egyre inkább előtérbe kerül a protozoológiában is. A tiszta tenyészet megvalósitásával ugyan kiszakitjuk az élőlényt a környezetéből, ami egyes összefüggések tisztázásában komoly nehézségeket okozhat, de ugyanakkor egy sor nehezen ellenőrizhető tényezőt állandósitunk és az analitikus munkát sokkal pontosabbá tudjuk tenni.

A tiszta tenyészetek megvalósitása gyakorlati szempontból sem közömbös. A számtalan orvosi vonatkozáson kivül megemlithetjük, hogy az egysejtűek tápanyag igényeinek pontos ismerete tette lehetővé egyes biológiailag fontos anyagok mennyiségi meghatározását. Ilyen eljárás a cobalamin titrálása az Euglena gracilis különböző változataival /30,34/, pteridinek meghatározása Chritidia fasciculatával /58/, de más anyagok protozoonokkal történő meghatározására is történtek javaslatok /28,38/. Egyes fajok mint pl. a Tetrahymena pyriformis sejtjei sok méregre a magasabbrendűek sejtjeihez hasonlóan érzékenyek és ezért uj pharmakológiai preparátumok toxicitásának gyors tájékozódó megállapitására kiválóan alkalmasak /55/.

A tiszta tenyészetek létrehozására történt erőfeszitések eredményeképpen különböző tisztaságu tenyészeteket állitottak elő megfelelő módszerekkel. A kutatók igyekeztek megközelitení az ideális célt, a kérdéses faj tiszta /axenikus/ tenyészetét, azonban ezt ezideig csak nagyon kevés faj esetében sikerült megvalósitani. A kutatók

jórésze még napjainkban is a régi nomenklatura szerinti u.n. nyers tenyészetekkel /Rohkultur /5// dolgozik. A tápoldat itt általában szerves anyagok /tej, széna, vér, ürülék stb./ vizes öntete. A cél ebben az esetben csak a kérdéses faj elszaporitása. Pontos vizsgálatokhoz kevés előnyt nyujt az a forma is, amikor a kivánt fajt baktériumokkal együtt tenyésztjük /Culture pure mixte /52//. Agnotobiotikus tenyészetekkel 1944-ben végzett NASTIUKOVA /57/ vizsgálatokat. Vizsgálatának a célja az volt, hogy rákos betegek vérszérumából egysejtüek szaporodás változásán keresztül fehérje természetü toxikus anyagokat mutasson ki. Testobjektumként Paramécium tenyészetet alkalmazott. Ezeket a vizsgálatokat később ROSKIN /62/ ismételte meg és az eredmények valóban elfogadhatónak látszottak. Ezen kezdeti kisérletek alapján schizophréniás betegek vérében, liquorában és viseletében feltételezett cytotoxikus anyagok kimutatására is történtek kisérletek /20,32,88/. Az összes fenti kisérletekhez szalmafőzetből készitett, valamint a megfelelő testfolyadékból higitott táptalajon tenyésztett Paramécíumok szaporodás intenzitását hasonlitották össze. Meg kell azt azonban emliteni, hogy már 1948-ban HARRISSON /29/, aki megismételte a kisérleteket kételkedett az eredmények pontosságában és megbizhatóságában, mert a legtöbb egészséges ember vérsavója is gátolhatja az állatkák szaporodását. Hasonló kisérletekben Paramécíumot alkalmazva, én is azt tapasztaltam, hogy két különböző tenyészedényből vett állatok szaporodási ritmusa sem egyezik meg, mert a két különböző tenyészedényben is

mások lehetnek a tenyészfeltételek már akkor is, ha csak a kulturákban lévő ismeretlen élőlényeket vesszük eltérőnek. Ha az egysejtűt sikerül elkülöníteni a környezetében élő összes élőlényektől, akkor ezeket az elkülönített egyedeket esetleg táplálhatjuk más egysejtűekkel algákkal, vagy baktériumokkal is. Ezek az u.n. monaxenikus tenyészetek, vagyis a tenyészetben ismertek az összes élő fajok. Bizonyos fajokat azután később sikerült tápoldatokkal vagy formált szilárd táplálékkal is fenntartani, tehát így sikerült az axenikus tenyésztést megvalósítani. Ezeket a tenyészetekot steril, vagy absolut tiszta tenyészeteknek /absolute Reinoultur /5/, pure culture sensu strioto /45// nevezték. A tenyészetek áttekintéséről és a tenyészetek nomenklaturájáról DOUGHERTHY dolgozata ad felvilágositást /16/, melynek a kiegészitését és bővitett formáját MÜLLER /55/ közölte.

A tiszta tenyészetek megvalósitása három uton érhető el: mosással, ami lényegében a higitás elvén alapszik; vándoroltatással, amikor a baktériumok elmaradnak az aktivan és gyorsan mozgó egysejtűek mögött, végül a harmadik elv az antibiotikumok alkalmazásán alapszik. Lényegében az antibiotikumok felfedezése jelentett fordulópontott a tiszta tenyészetekkel végzett munkák területén. 1945-től jelentek meg egymás után közlemények azokról a sikeres munkákról, melyek szerint antibiotikumokkal egyes egysejtű fajokat sterilizáltak /16,39,54,69,86/. A számtalan kisérleti adat lehetővé tette az antibiotikumok optimális koncentrációjának megválasztását. Ma már általában an-

tibiotikum keverékek kerülnek alkalmazásra. Hazánkban ilyen módszerekkel BARTHA Trichomonas fetust /3/, FELFÖLDY és KALKO pedig nagyszámu algatörzset izolált /17/.

Az axenikus kulturákkal folytatott munkákban természetesen igen fontos a sterilitás pontos betartása. A legkisebb fertőzés már nem kontrollálható ismeretlen tényezőt jelent és komoly zavarokat okozhat. Ha a tenyészet tisztának látszik is még nem jelenti azt, hogy axenikus. Sok baktérium jelen lehet csak éppen a protozoonok nem engedik meg, hogy elszaporodjanak. A sterilitás ellenőrzésére a bakteriológiában használt módszereket kell alkalmaznunk /1/.

Az axenikus tenyésztés előfeltétele, hogy a tápfolyadék tartalmazza mindazokat a tápanyagokat, amelyekre az állatnak szüksége van. Komoly nehézségeket okozhat az, hogy sok faj csak élő szervezettel képes táplálkozni és ha a táplálékul szolgáló élőlényeket megöljük pl.hővel, már nem tudják biztositani a kérdéses faj szaporodását és életfunkcióit. Ilyen esetekben valószinü, hogy az élőlények életbenmaradásához, szaporodásához nagyon labilis vegyületekre van szükség, melyek enyhe hatásokra is tönkremennek. Az axenikus tenyészetekkel kapcsolatban sok értékes gondolatot vet fel HALL /26/, KIDDER /43/, és SLATER /71/. Különösebb problémát nem jelent a diffuzió utján táplálkozó növényi ostorosok axenikus tenyésztése. A legtöbb növényi ostoros szaporodását biztositja a HUTNER és PROVASOLI által készült szintetikus táptalaj /33/. Az állati ostorosok tenyésztése is könnyü lehet egyes esetekben, de természetesen itt

komplexebb tápanyagokra van szükség. Sokkal nehezebb a fagetrof csillósok axenikus tenyésztése /87/. Ezek közül csak egyket faj pl. a Tetrahymena képes diffusió utján táplálkozni. Legtöbb egysejtünek,- legyen bármennyire is teljesértékü a tápoldat, szüksége van fehérje molekuláris /Colpidium campylum/vagy peptidekre /Glaucoma scintillans /47//.

Az axenikus tenyészetekkel kapcsolatban ki kell emelni a Tetrahymena pyriformis /synonim: Glaucoma pyriformis, Tetrahymena geleii/ nevü csillós fajt. Természetes körülmények között ez a faj is baktériumokkal táplálkozik. 1923-ban LWOFF izolálta elősör /51/ és mosási technikával axenikus egyedeket kapott, amelyeket azután sikerült hővel sterilizált ismert összetételü tápoldatban tovább szaporitani. Ez a törzs a Tetrahymena pyriformis GL törzse, mely ma is életben van. Azóta igen sok axenikus törzsét izolálták szerte a világon /12/.

A Tetrahymena pyriformis rendszertani helye és a vele végzett kisérletek eredményeinek jelentősége

A Tetrahymena pyriformis pontos helye a protozoonok törzsében sokáig ismeretlen volt. A számtalan vizsgálat eredményeképpen, melyeket az utolsó évtizedben végeztek az állaton, tisztázta a pontos rendszertani helyét és CORLISS közleményének megjelenése óta /10/, a következőképpen jelölik meg a helyét a határozók és kézikönyvek/14/:

PHYLUM - Protozoa

SUBPHYLUM - Ciliophora

CLASSIS - Euciliata

SUBCLASSIS - Infusoria

ORDO - Holotricha

SUBORDO- Hymenostomata

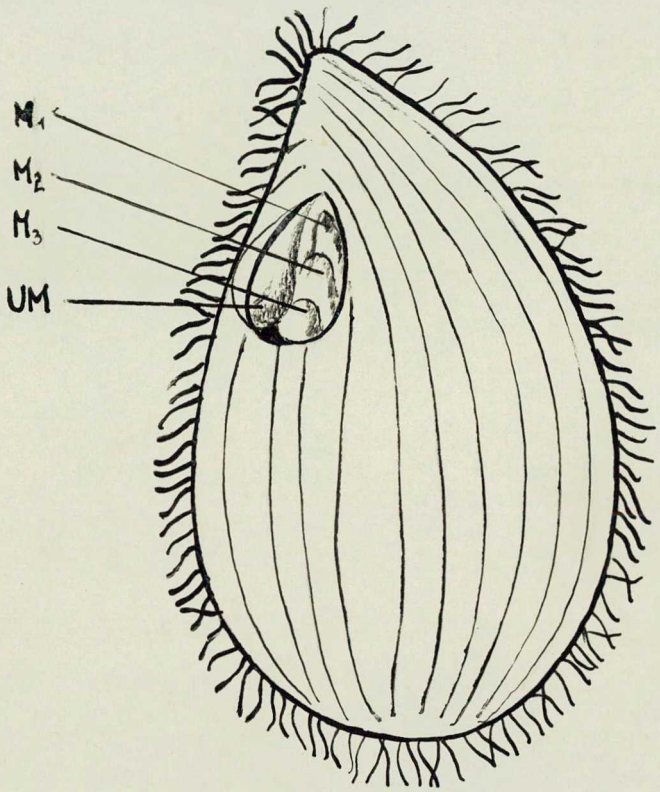
FAMILIA - Tetrahymenidae

SPECIES- Tetrahymena pyriformis

A családba tartozóságát az határozta meg, hogy a cytostomát segélyező csillók összenőve négy hártyaszerü képletet alkotnak, melyek közül három kisebb /membranellák/, és egy nagyobb /undulálo membrán/. /1. Ábra/ Az állatnak a genus és species neve magában foglalja a morphológiai és rendszertani sajátságait.

Napjainkban a Tetrahymenáknak számtalan törzse ismeretes, igy a GL törzs, amely a legrégebben ismert, ezen kivül az E,H,S,W,WH-6, Y stb. törzse is. Érdekesség az, hogy egyes törzsek mint a GL törzs csak macronucleussal rendelkezik és igy amitotikusan osztódik, addig a többi törzseknek van makro és mikro-nukleussa is. A Tetrahymenákon elvégzett számtalan vizsgálat azt mutatja, hogy a GL törzs a legkedveltebb, bár egyes kisérletekhez /pl. ivaros szaporodási vizsgálat, mitózis, stb./ kétségtelenül a kétféle sejtmaggal rendelkező törzsek kerülnek inkább előtérbe.

A Tetrahymenák fenntartására alkalmas táptalajok közül legegyszerübb az agy, vagy máj táptalaj.



1. Ábra

A Tetrahymena pyriformis vázlatos rajza./Corliss nyomán/
M_1, M_2, M_3: membranellák, UM: undulláló membrán.

Ennek az elkészitése ugy történik, hogy kémcsőbe helyezett kb. 1/4 ml nagyságu agy, vagy máj darabkákhoz 10 ml desztillált vizet adunk, a csöveket dugózzuk és autoklávban sterilizáljuk /51,55/. Ez a törzstáptalaj, melyen az állat kisérleteken kivül huzamosabb ideig fenntartható. Közvetlen kisérletekhez erről a táptalajról nem célszerü állatokat alkalmazni, mert a máj és agy minőségétől függően bizonyos táplálkozási faktorok hibákat okozhatnak a kisérleti eredményekben. A KIDDER iskola által kidolgozott és megállapitott alap táptalajt tekintetbe véve kiderül, hogy ha az állatokat szintetikus táptalajon tenyésztjük és teljes értékü táptalajt akarunk alkalmazni az állatok zavartalan életfunkcióihoz 16 féle aminosav, 16 féle vitamin és vitaminhatásu szervesanyag, valamint szénhidrát, és legalább 9 féle szervetlen só szükséges /13,46/. Már ebből is világosan látható, hogy az állat anyagcseréje bonyolult és ennek megfelelően igen érzékeny különböző táplálkozási faktorokra és ezzel kapcsolatosan egyéb tényezőkre is /pl. hőmérséklet/. Az állatok tenyésztéséhez gyakran használnak 0,8 - 2 %-os vizes pepton oldatot /pH 6,5/. A peptonnak a koncentrációja függ a pepton gyártmányától. A peptonoldathoz általában még szoktak adni néhány csepp élesztő, vagy májkivonatot és sterilizálják. Ezt a táptalajt, mivel összetétele egyszerü és igy könnyen ellenőrizhető, már különböző fiziológiai kisérletekben is eredményesen használhatjuk. A tenyésztés ilyen egyszerüségét és az állatok gyors szaporodását tekintve /59,55/a Tetrahymena kedvelt laboratóriumi objektummá vált és igy a vele

foglalkozó irodalom is igen bőséges /11/. A csillósok, sőt az izolált állati sejt táplálkozásáról és anyagcseréjéről nyert ismereteink jórészét a rajta végzett vizsgálatoknak köszönhetjük /44,45,52,68/.

Különböző célokra irányuló kísérletek számos, a Tetrahymenával kapcsolatos kérdésre adtak feleletet. Így megvizsgálták a hőmérséklet hatását és megállapították azt, hogy a hőmérséklet kismérvű ingadozása is nagymértékben befolyásolja az állatok sejtméreteit /56/, szaporodását azt, hogy adott hőmérsékleten mennyi az állatok generációs ideje /59/, valamint azt is, hogy a táptalaj hidrogénion-koncentráció változásakor hogyan viselkednek az állatok /89/. Igen sok vizsgálatot végeztek az antibiotikumok hatásával kapcsolatban is a Tetrahymenákon. Az antibiotikumok jelentősége főképpen az axenikus tenyészetek létrehozásában van. Optimális koncentrációban ezek valóban alkalmasak baktériummentesitésre, főleg keverékek formájában /55,70/, de alkalmazásuk bizonyos veszéllyel jár, mert kis koncentrációban sem teljesen hatástalanok, amit az is mutat, hogy a szaporodást serkenthetik /9,36,37,40,59/, és befolyásolhatják a sejtméretet is /56/. Az antibiotikumok hatásmechanizmusából eredő eredményeket igen nehéz volt összehasonlitani, ezért GROSS /23/ megállapitotta az összehasonlitás kritériumait és igy vizsgálta az aureomycin, terramycin és chloromycetin hatását. Az antibiotikumok alkalmazásával kapcsolatban fel kell hivni a figyelmet arra is, hogy a sejtekben megváltozik a DNS/RNS hányados értéke, amely még akkor is eltér a

kontroll állatokban talált értéktől, ha a táptalaj már 5 napja nem tartalmaz penicillint /84/. Érzékeny az állat az UV sugarakra is. Az UV besugárzás hatására egyes enzimek destrukcióit szenvednek /4,61,81/ Az enzim destrukció miatt a normális anyagcsere lefutásában zavar keletkezik és ez a zavar a normális sejtstrukturát rosszintetizáló rendszeren keresztül kihat az állatok alakjára is. Kémiai anyagok is zavart idézhetnek elő az állatok életfunkcióiában. Nagyon kis koncentrációban alkalmazott colchicin hatására zavarok jönnek létre az állatok szaporodásában és mellette a sejtméretek is megváltoznak /61/. A Tetrahymenák tenyészfolyadékához adott sok purin bázis és ennek származékainak hatása is, számtalan vizsgálat tárgyát képezte. Legtöbb vizsgálat folyamán a guanint és ennek analógjait mint a deazoguanint, 8-azoguanint, valamint az adenint és a deazoadenint, illetve ezeknek a sorsát kisérték figyelemmel az állatok anyagcsere ciklusában. Ezek az anyagok antagonisták a Tetrahymenák növekedésében /48,49,66/.

A felsorolt néhány irodalmi adat csak felszinesen mutatja meg azoknak a morfológiai, fiziológiai, biokémiai és egyéb kisérleteknek a széles skáláját, melyeken keresztül lemérhető az állatok jelentősége a tudományos kutatás számára. A Tetrahymenákkal foglalkozó irodalomból napjainkban egyre inkább az derül ki, hogy a vizsgálatok iránya exltolódik a molekuláris és ultrastrukturális szintre és fel lehet tételezni azt is, hogy ujabb, a Tetrahymenával kapcsolatos vizsgálatok során egy egész sor fon-

tos eredmény fog a felszinre kerülni.

A Tetrahymena osztódásának hőhatásra történő synchronizálása

Egyes vizsgálatok során, ahol az állatok tömegtenyészete került alkalmazásra, gyakran szükségessé vált, hogy a tenyészfolyadékban lévő állatok, vagy nagy százalékuk egyszerre osztódjék. A tenyészetek osztódásának a synchronizálása a mikrobiológiában már régebben ismeretes volt, a Tetrahymenák esetében először SCHERBAUM és ZEUTHEN dolgozta ki /77/. Azonban hamarosan kiderült, hogy a synchronizáláskor alkalmazott hőmérséklet megváltoztatja a sejtek életciklusát és ugyanolyan specifikus hatást vált ki mint egyes kémiai anyagok /79/.

A synchronizálásnak a lényeg az, hogy az élőlények optimális tenyészhőmérsékletét felemelve - ez az ugynevezett egyszerű shock - egyszeri synchronban történő osztódást eredményez. Többször megismételve a hőkezelést a synchron osztódás több generációban bekövetkezik. Az egyszerű hőmérsékleti shock hatását ZEUTHEN /79/ dolgozta ki. A Tetrahymenákat 22 ^{o}C-on tenyésztette majd ezeket alacsony hőmérsékletre /6 C^{o}-ra/ helyezte 16 óra 30 percre. A hidegre való kihelyezés ideje alatt a sejtosztódás üteme csökkent. A tenyészeteket visszahelyezve 22 C^{o}-ra a populáció egyedeinek a száma 2 óra elteltével a fokozott szaporo-

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14.

dás miatt 20-30 %-al nőtt. Az alacsony hőmérséklet többszöri alkalmazásával sem tudta a szerző elérni azt, hogy a sejteknek 30 %-nál nagyobb része osztódjon egyszerre.

Ha ismételt hideg, vagy meleg kezelést alkalmaznk és az ismétlődő kezelések közötti időt optimálisan választjuk meg, el tudjuk érni, hogy a sejtek az optimális hőmérsékleten nem tudnak belépni az osztódási szakaszba. A Tetrahymenák tömegkulturáját 29 C°-on tenyésztve a szaporodás exponenciális fázisától kezdődően hét hőmérsékleti shockot alkalmaznk 30-34 C°-on 30 percig. Ezeket a shockokat az alaphőmérsékletre való helyezéssel szakitjuk meg szintén 30 perc időtartamokkal. A kezelés időtartama alatt a sejtek nem osztódnak, hanem sejttömegük két háromszorosára növekszik. Az utolsó meleg shock-kezelés után a sejteket visszahelyezve az optimális tenyészhőmérsékletre a sejtek synchronban osztódnak 2-3 generáción keresztül, majd fokozatosan visszatérnek az asynchron osztódáshoz /78/.

SCHERBAUM és társai megállapitották /75/, hogy a tenyészeteken négy jellegzetes szaporodási szakasz található. Az első az u.n. lag fázis, amikor a sejtek egyre fokozottabb ütemben kezdenek osztódni. A második az exponenciális szakasz, amikor az állatoknak a szaporodása logaritmikusan történik. Harmadik fázis a stacioner fázis, amikor az osztódás és a pusztulás egyensulyban van, végül az utolsó fázis a pusztulás fázisa. A melegkezelt állatokon a fázisok a következőképpen módo-

sulnak. A tenyészeteknek a szaporodása itt is a lag fázissal kezdődik, majd innen eljut a logaritmikus vagy exponenciális fázisba. /Általában ebben a fázisban szokták alkalmazni a hőmérsékleti kezelést/ A harmadik fázis a shock kezelés utáni állapot, aminek a jellegzetessége az, hogy a sejtek mérete itt többszörösére nő, a negyedik az első synchron osztódásnak a fázisa és az utolsó a stacioner fázis. Ezeket a besorolásokat azért szükséges alkalmazni, mert az állatok ezekben a szakaszokban alakilag is és fiziológiailag is másképpen viselkednek.

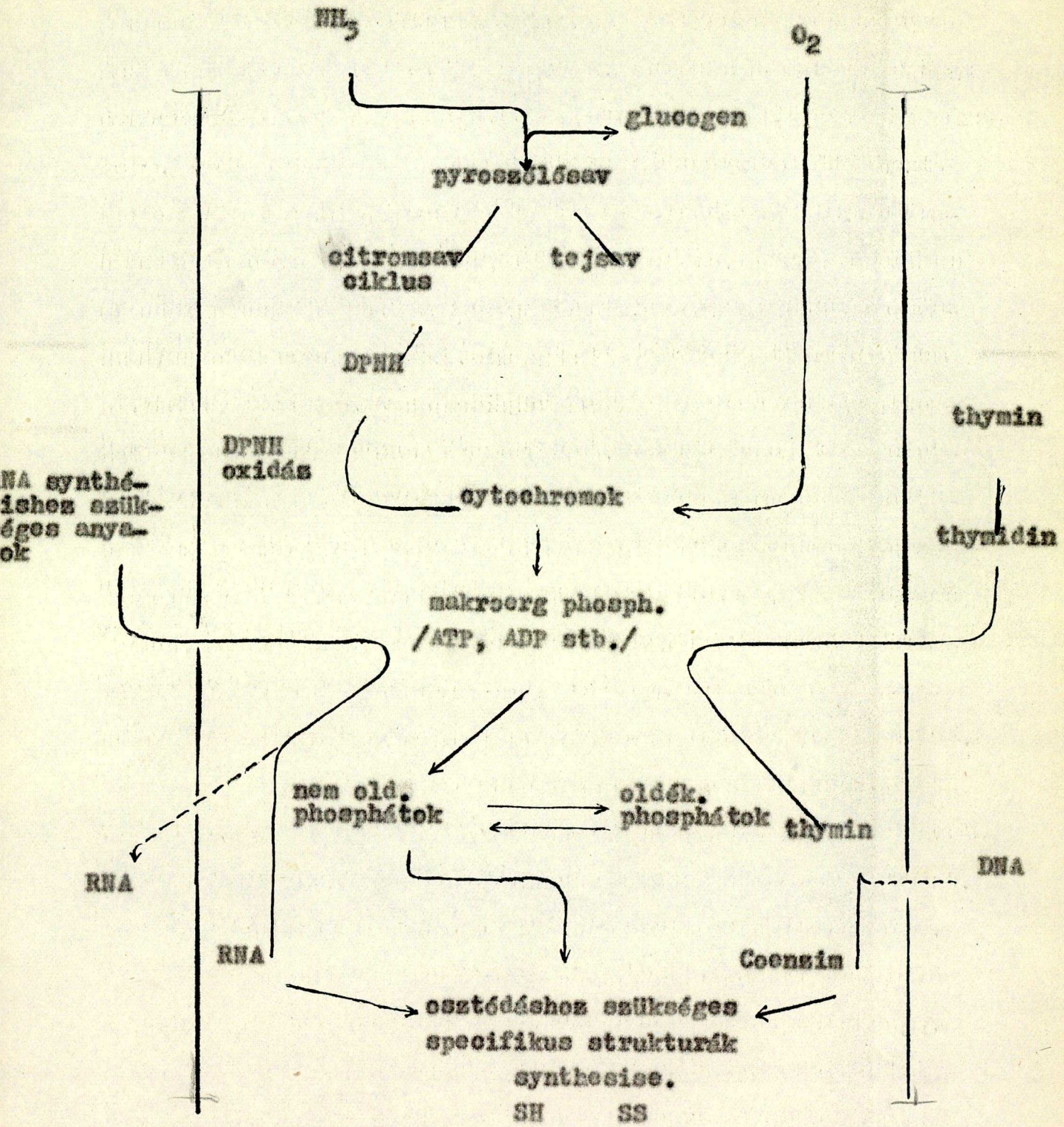
CHRISTENSON /7/ azt tapasztalta, hogy struktur-proteineknek a synthesise szünetel a shock kezelés alatt és fokozottabb az optimális tenyészhőmérsékleten. A hőmérsékleti kezelések intervallumai között amikor az állatok a megszokott tenyész hőmérsékletükön szaporodnak, fokozott a protein synthesis és ilyenkor megnövekszik a sejteknek a solubilis protein tartalma. Amikor a sejt tömegének a gyarapodása miatt bekövetkezne az osztódás, ismét alkalmazunk egy meleg shockot és ilyenkor a felhalmozódott soldbilis proteinek insolubilis proteinekké alakulnak át. Ezt bizonyitják az izotop szénnel és kénnel végzett vizsgálatok. Ezekkel az elemekkel jelzett alanint és methionint adva a tenyész táptalajhoz ezeknek az aminosavaknak a beépitése az alacsonyabb hőmérsékleteken igen gyorsan megtörtént, mig szünetelt illetve csökkent a magasabb hőmérsékleteken és ezzel szemben a kontroll tenyészetekben ez egyenletesen történt /79/. Az anyagcsere ta-

nulmányok ezzel kapcsolatosan mind arra mutatnak, hogy mind a meleg hatás, mind a hideg hatás az állatokban egy hőmérséklet érzékeny rendszert károsit meg /114/.

A Tetrahymenában megtalálták ezt az érzékeny rendszert, amely nem más, mint a DPNH-oxidáz, mely 10 perc alatt 40 C^0-on inaktiválódik. Egy másik ilyen hőérzékeny rendszer a tejsav-oxidáz, mely ugyanezen a hőmérsékleten már 6 perc alatt is inaktiválódhat. Ezzel nem magyarázhatók meg tökéletesen a hőmérséklet okozta változások az állatokban, mert a struktur protein synthezis utja az élőszervezetben sokkal bonyolultabb még az egysejtüekben is, hogysem ilyen egyszerüen meg lehessen magyarázni. Mindenesetre kétségtelen, hogy a DPNH-oxidáz részleges, vagy teljes inaktiválódásakor a substrát felhalmozódik és ez más blokkolatlan utakon hasznositható. Ezzel magyarázható meg a shock kezelt állatoknak az oxigén igénye, amely szintén arra mutat, hogy ilyenkor az oxidativ folyamatok kerülnek tulsulyba és azok közül is azok, amelyekhez közvetlenül a levegő oxigénje szükséges /80/. Ez magyarázza meg azt a jelenséget is, hogy a meleg kezelés után amikor a sejtosztódás szünetel, az állatokban felhalmozódik a sejt glukogén /82/. Ebben az esetben csökken a makroerg foszfátoknak /ATP, ADP stb./ mennyisége és keletkezésük szünetel, megáll a pyroszőlősavnak az oxidálása is és ilyenkor a pyroszőlősav a glukoneogenézishez használódik fel. A sejtosztódás szünetelés a glykogén felhalmozás összefüggését igen jól szemlélteti SCHERBAUM ábrája /80/, ahol

a specialis sejtstrukturát létrehozó különböző rendszerek összefüggését figyelhetjük meg. /2.ÁBRA/ Ez a mitogenetikus csatorna lényegében az anyagcsere lefutásának egyik kis részlete, amelyből kiderül, hogy az állatok szaporodásához, s a normális strukturának a reprodukálásához sokféle, különböző anyagokra érzékeny rendszer szükséges. A rendszernek az egyes pontjai érzékenyek hőmérsékletre, kémiai anyagokra és besugárzásokra. Pl. ha gátoljuk az oxidativ utakat pl. meleg shockal, vagy oxigént nem kap a rendszer, a makroerg foszfátok mennyisége csökken, ezen keresztül zavar történik a fehérje reprodukálásban, ugyanakkor egy más nem gátolt uton egy uj folyamat indul meg és ebben az irányban használódik fel a felhalmozódott substrát, vagyis a pyroszőlősavból glukogen synthetizálódik és az oxidativ deszaminálás miatt ammonia szabadul fel. Az ammoniának a felszabadulását ilyen esetekben többször megfigyelték /79/.

SCHERBAUM és ZEUTHEN /73/ rámutattak arra, hogy az optimális és a subletális hőmérséklet váltakozása milyen módon hozza synchron osztódásba a sejteket. A subletális hőmérsékleten az élőlények nem osztódnak és, ha visszahelyezzük az optimális tenyészhőmérsékletre a fokozott protein synthesis miatt megindulna a sejtosztódás, de mire ez bekövetkezne ujabb shockot alkalmazunk. Ezt ismételjük meg hétszer egymás után és mivel a hőmérsékleti kezelések között 29 C^{o}-on, az optimális hőmérsékleten az állatok csak gyarapodnak tömegükben és osztódás nem történik, méretük és sejttömegük két háromszorosára növekszik



2. ÁBRA

A specifikus sejtstrukturát létrehozó rendszer egységeinek összefüggése./SCHERBAUM nyomán/

és ez a jelenség ami a synchron osztódás magyarázatát adja a hőmérsékleti kezelések utáni intervallumban.

A fehérje anyagcsere a meleg kezelés alatt 3 periódusra oszlik /7/. Az első periódus lényegében tart a hetedik meleg kezelésig, illetve azzal bezárólag. Ezt a szakaszt az jellemzi, hogy az alacsonyabb hőmérsékleten az élőlények gyorsan felveszik az aminosavakat és azt solubilis proteinekké synthetizálják. Magasabb hőmérsékleten ezek a solubilis proteinek átalakulnak insolubilis proteinekké. Ez az átalakulás valószínűleg az élőlényeknek a hőmérsékleti denaturációval szembeni védekezése. Ilyenkor szünetel az aminosav felvétel a tenyészfolyadékból és ezeknek a fehérjévé való synthesise. A fehérje synthesis második periódusa az utolsó hőkezelést az első synchron osztódásig követő időszak. Itt a hőhatás elveszti blokk jellegét. Azonban még itt is tovább folyik a protein stabilizáció egy ideig, de már ugyanakkor ismét megindul a solubilis proteineknek a synthesise a táptalajból felvett aminosavnak a segitségével. A harmadik periódusban az insolubilis proteinek átmennek solubilis proteinekbe. Egyes feltételezések szerint még az osztódás előtti időszakban a struktur proteinek teljes synthesise még nem indul meg csak részlegesen, ezt bizonyitja a sejtekből meghatározott totálprotein frakciók analisise is /7/.

NORMAN és munkatársai /62/ megvizsgálták a magszerkezeteket a meleg kezelés különböző stádiumaiban, s kiderült, hogy a synchronizálás során a magok meg-

nőnek és a hetedik shock után méretük kb. háromszorosa a kontrollénak. A synchron osztódások után a sejtmagok nagysága ismét csökken, de a stacioner fázisban a sejtmagok kisebbek, mint a kezdeti kezelés előtti lag fázisban. A sejtmag megkisebbedése bekövetkezik már az első osztódáskor, majd a második osztódás előtti időszakban tömege ismét növekszik, végül az utolsó synchron osztódás után a negyedik generációban tömege az előbb említett nagyságot éri el.

1876-ban BÜTSCHLI /6/ leirta a csillósokban a kétféle sejtmagot, amelyet makro és mikro nukleusnak neveztek el. A két sejtmagnak különböző funkciója van, melyet 1889-ben HERTWIG /31/ irt le, majd később GOLDSCHMIDT /22/ és POPOFF /64/ egészitett ki. Ezek a szerzők különbséget tettek a genetikailag fontos idiochromatin és a sejt anyagcseréjében szerepet játszó somochromatin között. Az egy sejtmaggal rendelkező protozoonokban az egyetlen sejtmag végzi el a két funkciót. SONNEBORN /82/ később kimutatta, hogy a ciliátták makro nukleusza több kisebb sub nukleuszból áll. Ezeket a subnukleuszokat, melyek a makronukleuszt alkotják SCHERBAUM és munkatársai subnukleáris agregátumoknak /SNAs/ nevezték el. Ezek előfordulhatnak a protoplazmában is, mint Feulgen pozitiv szemcsék. Ezeket többek között leirták más egysejtü élőlényekben is, igy az Ancistruma isseli-ben /41/ az Ichtyophtirius multifiliis-ben /24/ Colpidium colpodában /42/. Hasonló jelenséget tapasztalt FURGASON 1940-ben a Tetrahymena pyriformis T törzsén /19/ és McDONALD a Tetrahymena pyriformis H tör-

zsén /53/. A subnukleáris agregátumok változását a meleg kezelés során SCHERBAUM /77/ quantitative vizsgálta. A sejteket 7 hőmérsékleti ciklusban kezelte félóránkénti hideg és meleg változtatással és az utolsó kezelést követően, amikor az állatok 85-90 %-a synchronban osztódott, megvizsgálta a sejtekben a subnukleáris agregátumokat. Érdekes hogy a sejtek SNA tartalma 55 %-el nőtt a kontroll állatokhoz viszonyitva, s ezenkivül az SNA/nukleus térfogat arány 0,72 %-ról 2,8 %-ra emelkedett. Ugyanezen szerző egy másik vizsgálatának eredményéből az is kiderült, hogy ezzel párhuzamosan emelkedik a Tetrahymenák mérete is /75/. Kontroll tenyészetekben a logaritmikus fázisban a sejtméretek gyors osztódás miatt 50 %-al csökkennek. Azonban a meleg kezelés tartama alatt ez az érték 300 %-ra emelkedik, majd az utolsó kezelés után 5 órával ismét a kontrollhoz hasonló értéket vesz fel /74/. Más vizsgálatok is kimutatták, hogy a mikroorganizmusok sejtméretét mind a meleg, mind a hideg hatások megváltoztatják /74,78,79/. A meleg kezelésen átvitt Tetrahymenák száma a meleg kezelés alatt 65 %-al csökken a kontrollhoz viszonyitva /75/ és ugyanakkor a sejtméret is megnagyobbodik, ami arra utal, hogy egy hőérzékeny rendszer működése gátolttá válik. A szerző kimutatta, hogy ez a hőérzékeny rendszer egy enzimrendszerrel azonos, mely a shock kezelés folyamán /76/ denaturálódik. Ez támogatja ZEUTHEN korábbi feltételezését is /114/.

Kisérleti rész

Szaporodási és morfológiai vizsgálatok a hideg- és meleg-kezelt Tetrahymenákon

SCHERBAUM és más szerzők is utaltak arra, hogy a synchronizálás céljából történt hőkezelések - legyenek azok hideg vagy meleg shock hatások ugyanolyan módon hatnak mint más specifikus jellegü kémiai anyagok, vagy esetleg rádióaktiv sugárzás, vagy UV sugárzás. A szerzők azt is megemlitik, hogy az állatok alakja az utolsó hőkezelést követő 5 óra elteltével normális nagyságu lesz, a szaporodás ismét asynchronná válik és a protein synthesis is a normális szinten fut. Az irodalmi adatokból azonban nem lehet feleletet kapni arra vonatkozóan, hogy a hideg vagy meleg kezelés hatására a szaporodási intensitás absolut értékét tekintve mikor válik annyira hasonlóvá a kontroll állatokhoz, hogy a különbség közöttük már nem signifikáns. A hőkezelés után a sejt méreteit tekintve szintén helyreáll a normális sejt hosszuság és szélesség. Ezek az adatok főképpen tenyészetben lévő összsejt térfogat, valamint adott mennyiségü tenyészfolyadékban levő sejtszám értékek alapján kerültek felszinre. Absolut értéket tekintve azonban az irodalomban erre sem találunk adatot. A kezelés során megváltozott anyagcserét figyelembe véve nem lehet leegyszerüsiteni a kezelés okozta változásokat arra, hogy DPNH oxidáz mint termolabilis vegyület károsul a kezeléskor, mert ez

valójában sokkal bonyolultabb folyamat. Hiba lehetőséget jelent már az is, hogy a DPNH-oxidáz és a tejsav oxidáz aktivitását csak in vitro vizsgálták meg az adott hőmérsékleteken és ezzel mintegy kiszakítva az enzimeket a környezetükből, az eredmények megbeszélésekor bizonyos hibalehetőségre adtak alkalmat. Az irodalomból az sem derül ki, hogy ha valóban a DPNH-oxidáz és a tejsav oxidáz károsodik a hőmérsékleti kezeléskor, akkor a kisebb részanyagcsere folyamatok következtében mi történik más enzimekkel. SCHERBAUM feltételezése szerint a hőkezelésekor inaktiválódó DPNH-oxydaz és tejsav oxydáz károsodik, és ezeknek az inaktiválódása miatt a gluconeogenesis kerül előtérbe. Ennek egyik kisérő jelensége lehet, hogy ammonia keletkezése közben a glutaminsav, és más aminosavak is deaminálódnak. Ez a normálistól eltérő uton lefutó anyagcsere valószinü, hogy egyes enzimeknek a működését különösen fontossá teszi és más enzimek pedig kevésbé fontos szerepet kapnak mint a normális anyagcsere lefutásában.

A Tetrahymenák synchronizálásával már foglalkoztunk az intézetünkben és a Tetrahymenával egy néhány vizsgálatot is elvégeztünk. Ez, valamint az irodalmi adatok idevonatkozó többé-kevésbé hiányos volta adta az ötletet, hogy néhány adattal hozzájáruljak a Tetrahymenák hideg- és meleg - hatás okozta változásaira vonatkozó ismereteinkhez.

Kisérleteimben elsősorban azt volt szándékomban kideriteni, hogy a hőmérsékleti hatások, amelyek bizonyos változásokat hoznak létre az állatok szaporodásában, sejtméreteiben és különböző enzimek aktivitásában, mikor szünnek meg teljesen olyan értelemben, hogy az állatok szaporodása és testmérete, valamint ezeknek az enzimeknek az aktivitása signifikánsan nem különbözik többé a kontroll állatokétól. Ezeknek a kérdéseknek az eldöntése abból a szempontból sem közömbös, hogy az állatokat, ha még nem történt meg a szaporodásbeli testméretbeli és fiziológiai normalisálódás, nem lehet felhasználni különböző kisérletekhez, mert ellenkező esetben eltorzitott eredményeket kaphatunk.

Az irodalomban található adatok szerint a normális hőmérséklettől eltérő - 6 °C hőmérsékletet mint hideg shockot és a + 35 °C hőmérsékletet mint meleg shockot alkalmazzák a synchronizáláshoz. Kisérletemben nem ezeket az értékeket alkalmaztam, hanem - 25 °C hőmérsékletet, ahol az állatok gyorsan befagynak a tenyészfolyadékba és a forrásban levő viz hőmérsékletét. A kezelések után megvizsgáltam az állatok méreteit, szaporodási intenzitásukat és néhány dehydrogenáz enzimnek az aktivitását.

A hideg- és meleg - shock hatás alkalmazása

A Tetrahymena tenyésztésekor az általánosan használt és bevált módszereket alkalmaztam. Az állatokat kisérleten kivül májfőzet, illetve agyfőzet táptalajon tartottam /19/, melyen átoltás nélkül hosszabb ideig tenyészt-

hetők az állatok.

Az irodalmi adatok közt gyakran találkozunk a Tetrahymenák tenyésztéséhez felhasznált anyagok közül 1-2 %-os vizes pepton táptalajjal, melyhez kevés élesztő, vagy májkivonatot adnak. Ezek a peptonok különböző gyártmányuak /Difco-pepton, bacto-pepton, stb./ és a pepton gyártmányától függ az optimális koncentráció. Számunkra legjobbnak bizonyul a Richter gyártmányu pepton 0,85 %-os vizes oldata /2/, melynek literéhez 0,005 mg aneurint, 0,001 mg riboflavint, 0,005 mg nicotinsav amidot és 0,005 mg pyridoxint adtunk.

A hőmérsékleti kezeléseket egysejt kulturával végeztem ugy, hogy a kisérletek előtt az állatokat 3 napos időközönként 5 alkalommal 0,85 %-os vizes pepton táptalajra oltottam, majd a populációt az 5-ik pepton táptalajra való oltás után egy állatból tenyésztettem ki. Az állat szaporodása lévén létrejött populációból 1 ml. tenyészfolyadékban levő állatot oltottam 10 ml pepton tápoldatot tartalmazó kémcsövekbe, amelyeket előzetesen a táptalajjal együtt autoklávban sterilizáltam. A leoltást követő negyedik napon végeztem el a hőmérséklettel való kezelést az állatokon. A leoltást követő 4-ik nap azért alkalmas a vizsgálathoz, mert az állatok szaporodása ekkor történik exponenciálisan és ekkor már megfelelő egyedszámu populáció áll rendelkezésünkre. Az irodalmi adatok általában 29 C^{o}-t jelölik meg optimális hőmérsékletként a Tetrahymena pyriformis GL törzsének tenyésztéséhez. Ekkor az állatok szaporodásának az exponenciális szakasza a leoltás után kb. 3 nap

elteltével következik be /60/. Előző vizsgálataimban 25 C°-on tenyésztettem mindig a Tetrahymenákat és jelen vizsgálatokban sem változtattam meg a korábban használt tenyészhőmérsékletet. Az összes tenyészetet tehát a kontrollokat is 25 C° /± 0,3/ hőmérsékletü termosztátban inkubáltam sötétben. A lecltást követő 4-ik napon a 10 ml tenyészfolyadékot és a populációt tartalmazó kémcsövek közül 15-t forrásban lévő vizbe helyeztem 4 másodpercre, majd másik 15 kémcsövet mélyhütőbe - 25 C°-ra. A meleg shockot kapott állatok jórésze elpusztult a kezelés alkalmával. Méréseim azt bizonyitják, hogy az állatoknak csak 10-15 %-a maradt életben. A populációk egyedeinek a számát tájékozódó meghatározásra Bürker-kamra segitségével állapitottam meg. Ezeket az állatokat a melyek meleg- kezelést kaptak, visszahelyeztem a termosztátba és 3 óra elteltével, amikor a tenyészfolyadék visszanyerte eredeti hőmérsékletét és az elpusztult állatok leülepedtek, az életben maradt állatokat friss táptalajra oltottam át. A mélyhütőbe helyezett tenyészfolyadék 30 perc elteltével az állatokkal együtt megfagyott. A befagyott tenyészeteket először olvadó jég közé helyeztem, majd mikor a jég elolvadt, visszahelyeztem termosztátba és 3 óra elteltével az igy életben maradt állatokat is átvittem friss táptalajt tartalmazó kémcsövekbe. Ebben az esetben a tulélési arány a Bürker-kamrával történő sejtszám megállapitás szerint sokkal nagyobb volt, az állatoknak 35-40 %-a maradt életben. A kezelt tenyészetekkel párhuzamosan kezeletlen tenyészeteket is tartottam mindvégig 25 C°-os termosztátban, melyek a kisérleteim során a kontroll tenyészeteket képeztek.

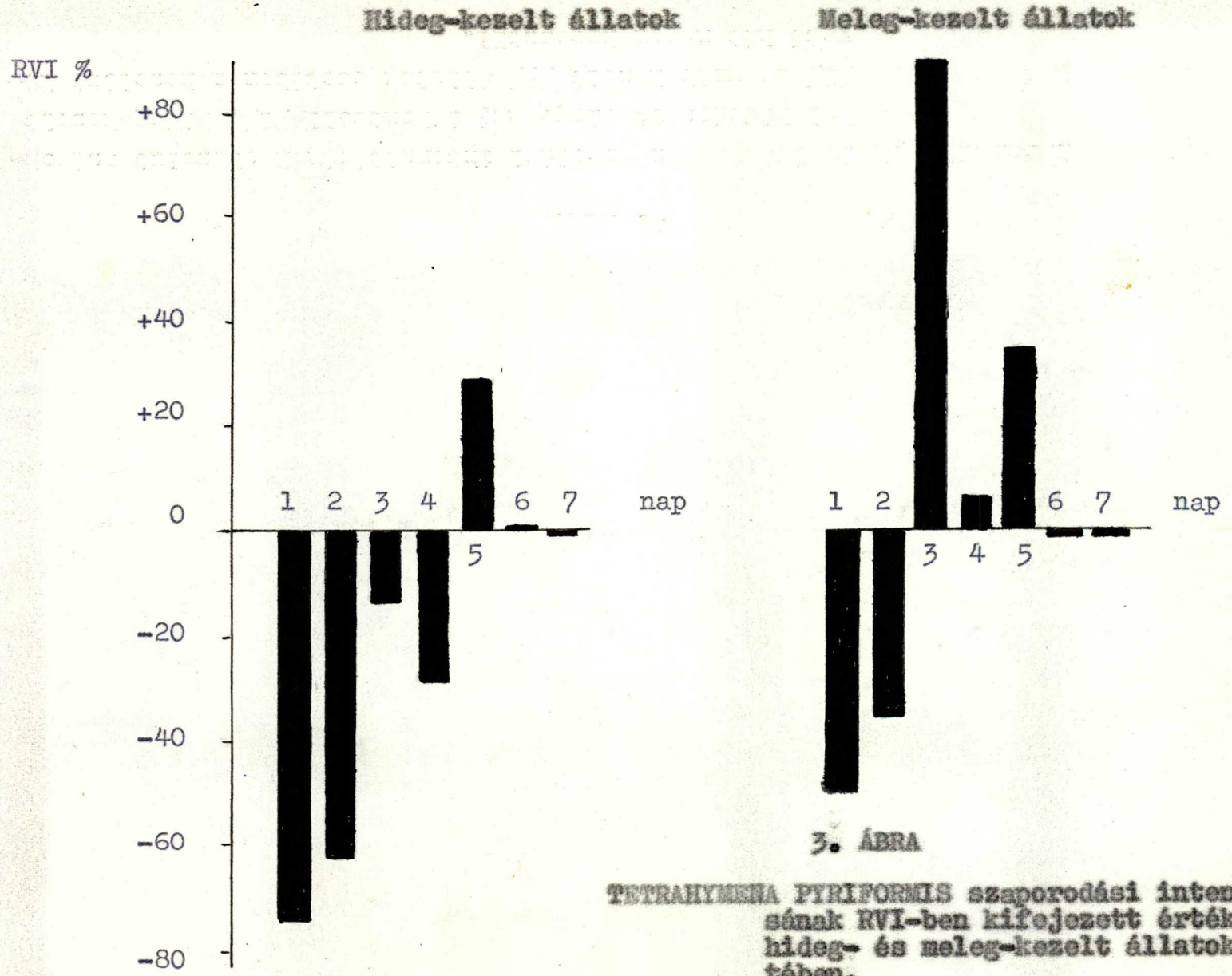
SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14.

A hideg- és meleg - kezelt állatok szaporodása

A kezelést követő 24 óra eltoltével 8 napon keresztül minden nap megállapitottam az állatok szaporodásának az intenzitását.

A tiszta tenyészetekkel végzett vizsgálatok során egyik leggyakoribb feladat az egyedek számának megállapitása és a szaporodás objektiv mérése. Különösen akkor válik ez szükségessé valahányszor a tenyésztett faj tápanyag igényét, vagy a szaporodást serkentő, vagy gátló anyagok hatását vizsgáljuk. Ezért a Tetrahymenával foglalkozó irodalom bőséges adatot hoz fel a szaporodás mérésre. Az alkalmazott módszerek közül az egyik az, hogy a tenyészetben megállapitjuk az egyedek számát, a másik módszer szerint a sejtek összetömegét határozzuk meg /65/.

Ha a tenyészetből időnként mintát veszünk ki, könnyen megvalósitható a közvetlen sejtszámolás módszere. Ilyenkor ismert mennyiségü tenyészetet ismert mennyiségü formaldehyddel rögzitünk és alapos felrázás után Bürker-kamra segitségével megszámoljuk az állatokat /27/. Ha egy vagy csupán néhány egyedet oltunk a kivánt tápoldatot tartalmazó kapillárisba, vagy nagyon vékony kémcsőbe, akkor binokuláris mikroszkóp vagy lupe alatt meghatározott időközökben megállapithatjuk a sejtek számát mindaddig, míg 40-50 fölé nem emelkedik. Igy közvetlenül regisztrálhatjuk a szaporodást /21/. A sejtek tömegének meghatározására a hematokrit elvét alkalmazzák /8/: beosztott kémcsőbe helye-



3. ÁBRA

TETRAHYMENA PYRIFORMIS szaporodási intenzitásának RVI-ben kifejezett értékei hideg- és meleg-kezelt állatok esetében.

zett tenyészetet centrifugálva a sejtek elkülönülnek és térfogatuk közvetlenül leolvasható. A fenti módszerek könnyen előforduló hibája az, hogy a vizsgáló egyén eltévesztí a számolást és eredmény pontatlanná válik. A szaporodás mérésére célszerűnek láttam más módszert alkalmazni, melynek segítségével biztosan, hibalehetőség nélkül, az egyedek száma adott időben megállapítható.

Az általam használt módszer lényege az, hogy előzetesen autoklávban sterilizált vájt tárgylemezekre 0,2 ml steril vízcseppen táptalajra 2-2 állatot helyeztem el lupe alatt. Ezt minden nap megismételtem a kezelést követő 7 napon keresztül. A hideg- és meleg- kezelt állatokból beállított kis tenyészkulturákkal párhuzamosan ugyanígy nem kezelt állatokat is készítettem elő vizsgálatra, mint kontrollokat. A tárgylemezeket ezután steril nedveskamrába helyeztem, a nedveskamrát pedig 25 C° hőmérsékletű termosztátba. 8 óra elteltével az állatokat 1-1 csepp jégecettel fixáltam és az állatok abszolut számát kulturánként mikroszkóppal megállapítottam. A hideg és melegkezelt, valamint kontroll állatokból 50-50 vájt tárgylemezt állítottam be. A számoláskor kapott eredményeket középértékeltem.

A kapott eredmények összehasonlítására igen alkalmas NASTIUKOVÁNAK /57/ és ROSKINNAK /67/ a módszere. A módszer szerint a kontroll állatok szaporodását összehasonlítjuk a kezelt állatok szaporodásával, így kapjuk meg a Relativ Vitális Indexet /RVI/. Az RVI kiszámítható a

$$RVI = \frac{N_o - N_x}{N_o} \times 100 \text{ /\%-ban/}$$

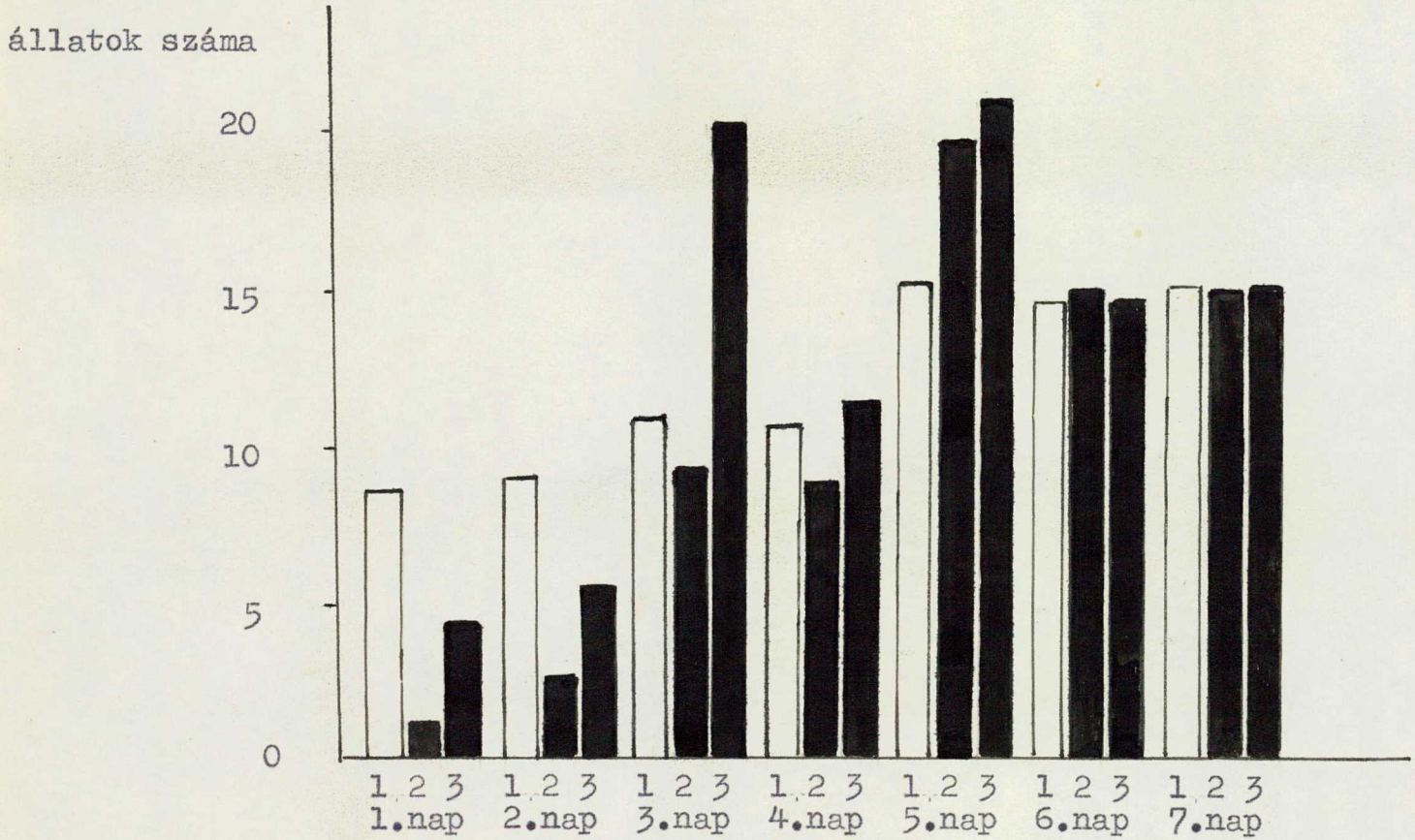
Kezelést követő napok száma	Kontrol állatok szaporodása	Hidegkezelt állatok szaporodása	Melegkezelt állatok szaporodása	RVI %	
				Hidegkezelt állatok	Melegkezelt állatok
1	8,5 ± 0,50	1,2 ± 0,09	4,4 ± 0,22	-74,11	-48,20
2	8,8 ± 0,13	2,7 ± 0,98	5,5 ± 0,11	-63,90	-37,50
3	10,7 ± 2,97	9,2 ± 0,84	20,3 ± 1,71	-14,01	+89,71
4	10,6 ± 0,89	8,6 ± 0,72	11,2 ± 0,73	-28,30	+5,88
5	15,0 ± 1,80	19,5 ± 0,87	20,6 ± 0,84	+30,00	+37,33
6	14,5 ± 1,81	14,7 ± 1,29	14,4 ± 0,42	+0,68	-0,68
7	14,8 ± 1,70	14,6 ± 0,88	14,7 ± 0,44	-1,30	-0,65

1. TÁBLA

A TETRAHYMENA PYRIFORMIS szaporodási intenzitása abszolut értékekben és Relativ Vitális Indexben kifejezve a hideg- és melegkezelést követő hét napon keresztül.

képlet segitségével, ahol RVI egyenlő a Relativ Vitális Indexxel, N_c a kontroll állatok számát, N_x pedig kezelt állatok számát jelenti. Állandó időt véve alapul a vizsgálathoz és a képletbe az értékeket behelyettesitve kiderül, hogy a kezelt állatok a kontroll állatokhoz viszonyitva gyorsabban vagy lassabban szaporodnak-e, illetve hány %-al csökkent vagy növekedett a kezelt állatok szaporodási intenzitása a kontrollhoz viszonyitva. Ezeket az értékeket figyelhetjük meg a 3.sz.ábrán. A szaporodási kisérlet eredményeiből megállapitható, hogy a hirtelen hideg és meleg hatás egyaránt gátolja az állatok szaporodását, a kontrollhoz viszonyitva különösen a hütött állatok szaporodási üteme alacsony a kezelést követő napon. A második napon a szaporodás már intenzivebb és az ötödik napon eléri, sőt tulhaladja a kontroll állatok szaporodását, majd a hatodik és hetedik napon a szaporodás ritmusa a kontroll állatokhoz hasonló. A meleg- kezelt állatok szaporodása a harmadik napon ugrásszerüen tulhaladja a hideg-kezelt állatok, de a kontroll állatok szaporodását is, a negyedik napon ez nagymértékben csökken, az ötödik napon ismét gyorsabban szaporodik, mint a kontroll állatok, végül a hatodik és hetedik napon visszatér a normális szaporodási ritmus./4.ábra/ Ezeket az eredményeket szemlélteti az 1.sz. Tábla is, ahol a kontroll a hideg- és melegkezelt állatok szaporodásának absolut értékeit /középérték/ ábrázoltam.

Szaporodási eredményeket számadatokban szemlélteti az 1.sz.tábla, ahol 50 vájt tárgylemezen megszámolt Tetrahymenák számának középértékeit láthatjuk a



4. ÁBRA

A TETRAHYMENA PYRIFORMIS szaporodási intenzitásának abszolut számokkal kifejezett diagrammjai kontroll /1/, hideg-kezelt /2/ és melegkezelt /3/ állatok esetében a kezelést követő hét napon keresztül.

a közepes hibával. Ezeket az eredményeket fejtjük ki az RVI-ben is, ahol a negativ, ill. pozitiv előjelű számok azt mutatják, hogy a megfelelő napon a kontrollhoz viszonyitva milyen mértékü volt a gátlás /-/, vagy tulszaporodás /+/ %-ban kifejezve.

A hideg- és meleg - kezelt állatok sejtméretei

Azok a szerzők, akik foglalkoztak a Tetrahymenák osztódásának a synchronizálásával, mindig megemlitik közleményükben azt, hogy a sejtméretek a többször alkalmazott shock-hatások alatt megnövekednek és a synchron osztódás alatt, amikor az állatok két-három generáción keresztül egyszerre osztódnak, a sejtméretek normalizálódnak.

Kisérletem következő részében azt tüztem ki célul, hogy megvizsgálom az állatok sejtméreteinek /hosszuság, szélesség/ alakulását az általam alkalmazott hőmérsékleti kezelés utáni napokon. A Tetrahymenákat hasonló módon készitettem elő a vizsgálatokhoz, mint a szaporodási kisérletekben. A már ismertetett módon egysejt kulturát hoztam létre, és az ebből tenyésztett kulturákat helyeztem -25 °C hőmérsékletü hütőbe, illetve forrásban levő vizbe. Az állatokat ebben az esetben is átoltottam friss táptalajra, miután az elpusztult állatok leülepedtek, és a tenyészfolyadék felvette a +25 °C hőmérsékletet. A kémcsövekből azután

a kezelést követő 24 óra elteltével állatokat vittem tárgylemezre és mozgásukat 1 %-os $Ni/NH_4/_2/SO_4/_2$ oldat néhány cseppjével megbénitottam, majd fedőlemezzel lefedve, mind a hideg, meleg mind a kontroll állatok közül 300-300 Tetrahymenának megmértem a hosszuságát és a szélességét.

A $Ni/NH_4/_2/SO_4/_2$ és általában a nikkel sói azért jók a csillások fixálására, mert a csillókat feloldja és ezzel az állatok mozgását megbénitja, de ugyanakkor az állatok a mérések alatt még életben vannak és igy nem történik szugorodás. A méréseket okulármikrométer segitségével végeztem 0,01 u pontossággal 600 x nagyitással. A hideg- melegkezelt és a kontroll állatokból csak 300-300 méretet tudtam csak megállapitani, mert megfelelő gyakorlottsággal naponta csak kb. 800-1000 mérést lehet elvégezni.

A méréseket a kezelést követő 8 napon át minden nap elvégeztem és igy összehasonlitásokat tudtam tenni a kezelés utáni időszakban az állatok méretalakulásaiban részben a kontrollhoz hasonlitva a kezelt állatokat, részben pedig az egyes napok közötti méretváltozásokat hasonlitva össze.

A morphológiai vizsgálataim eredményeit tekintve, ha összehasonlitjuk a kontroll valamint a hideg- ill. melegkezelt állatok hosszuságát, a kezelés utáni napon legkisebbek a hideghatásnak kitett állatok, melyeknek a hosszuága csaknem a felére csökkent. A fagyasztott állatoknak a szélességértékeinél is nagymértékü csökkenés történt. A melegkezelt állatokon nem történt ilyen nagyarányu

méret csökkenés, de a sejtek itt is sokkal kisebbek mint a kontrollok. A kontroll állatok hosszuságértéke a kezelés utáni első napon 39,99 u, a hidegkezelt állatoké 23,66 u, és a melegkezelteké pedig 26,95 u. Ezek az értékek a kezelés napjától időben távolodva egyre inkább emelkednek és a 8. napon a fagyasztott állatok hosszusága 38,72 u, a melegkezelteké 38,96 u. A hosszuságértékek növekedése fokozatosan történik a kezelés utáni első naptól számitva az utolsó, vagyis a nyolcadik napig. Az egyes napokon talált hosszuságok középértékei között a különbségek majdnem minden esetben szignifikánsak.

A kezelt állatok szélességértékeiben is, összehasonlitva a kontrollokéval jelentős csökkenés következett be. 300 kontroll állat szélességének a középértéke 16,96 u, a hidegkezelt állatoké 11,98 u, a melegkezelt állatoké pedig 13,27 u. A szélességek értékei is az első naptól a nyolcadikig növekednek és a nyolcadik napon a hütött Tetrahymenák szélessége 17,20 u, és a melegkezelteké 15,75 u.

A kontroll, hideg, valamint melegkezelt állatok hosszuságának és szélességének alakulásait a 2. és 3. Tábla részletezi, ahol az első oszlop számai jelentik a kezelést követő napok számát. A következő oszlopokban a kontroll hideg - melegkezelt állatoknak a hosszusága ill. szélessége van feltüntetve az átlagos standard deviációval és a V % alatt a variációs koefficiens értékeit láthatjuk. A tábla jobboldalán látható a "t" statisztika alapján szá-

Napok száma	Kontrol		Hidegkezelt		Melegkezelt		Hidegkezelt		Melegkezelt	
	TETRAHYMENÁK hosszusága						TETRAHYMENÁK hosszuságának szignifikanciája / t próba /			
	Középérték	V%	Középérték	V%	Középérték	V%	t	p	t	p
1	39,99 ± 0,01	6,63	23,66 ± 0,02	8,75	26,95 ± 0,02	6,62	48,72	< 0,01	41,46	< 0,01
2	39,38 ± 0,01	6,02	25,43 ± 0,02	6,79	31,36 ± 0,02	11,99	46,18	< 0,01	21,90	< 0,01
3	40,03 ± 0,01	5,83	34,49 ± 0,02	6,40	33,38 ± 0,10	10,64	28,35	< 0,01	18,62	< 0,01
4	38,44 ± 0,01	5,42	34,14 ± 0,02	6,11	35,92 ± 0,01	10,06	18,35	< 0,01	10,46	< 0,01
5	39,92 ± 0,01	6,98	34,75 ± 0,02	6,11	37,76 ± 0,10	10,60	16,71	< 0,01	5,99	< 0,01
6	39,83 ± 0,01	7,83	38,27 ± 0,02	7,03	38,09 ± 0,11	10,99	4,75	< 0,01	4,69	< 0,01
7	38,95 ± 0,01	4,90	38,49 ± 0,02	5,61	38,91 ± 0,10	10,34	1,67	> 0,05	2,56	< 0,01
8	38,94 ± 0,01	5,60	38,72 ± 0,02	5,92	38,96 ± 0,10	10,12	0,65	> 0,05	0,06	> 0,05

2. TÁBLA

Kontrol, hideg-kezelt, meleg-kezelt TETRAHYMENÁK hosszuságának középértékei mikronban az átlagos standard deviációval, valamint a hosszuságok variációs koeffíciens /V%/ értékei és a kontrollhoz viszonyitott szignifikancia a t próba alapján a szabadságfokkal /p/.

Napok száma	Kontrol		Hidegkezelt		Melegkezelt		Hidegkezelt		Melegkezelt	
	TETRAHYMENÁK szélességének						Tetrahymenák szélességének szignifikanciája / t próba /			
	Középérték	V%	Középérték	V%	Középérték	V%	t	p	t	p
1	16,95 ± 0,01	2,71	11,98 ± 0,01	3,70	13,27 ± 0,01	3,67	22,92	<0,01	17,09	<0,01
2	16,97 ± 0,01	1,98	10,51 ± 0,01	3,78	13,40 ± 0,01	2,37	31,49	<0,01	20,06	<0,01
3	17,32 ± 0,01	2,13	14,47 ± 0,01	2,48	16,12 ± 0,02	6,33	14,10	<0,01	4,84	<0,01
4	17,30 ± 0,01	3,41	15,15 ± 0,01	1,90	16,28 ± 0,21	4,62	10,89	<0,01	4,18	<0,01
5	17,26 ± 0,01	2,89	14,20 ± 0,01	2,59	15,06 ± 0,01	3,28	15,41	<0,01	1,05	<0,05
6	17,32 ± 0,01	2,63	15,15 ± 0,01	2,61	14,29 ± 0,01	2,63	11,10	<0,01	1,52	<0,05
7	17,16 ± 0,01	1,89	15,19 ± 0,01	1,87	14,50 ± 0,01	2,00	38,51	<0,01	49,35	<0,01
8	17,30 ± 0,01	2,15	17,20 ± 0,01	2,14	15,75 ± 0,01	3,05	1,63	>0,05	8,21	<0,01

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14.

3. TÁBLA

Kontrol, hideg-kezelt, meleg-kezelt TETRAHYMENÁK szélességének középértékei mikronban az átlagos standard deviációval, valamint a szélességek variációs koefficiens /%/ értékei és a kontrolhoz viszonyított szignifikancia a t próba alapján a szabadságfokkal /p/.

Napok száma	Hideg-kezelt TETRAHYMENÁK			
	hosszuság		szélesség	
	t	p	t	p
1-2	5,27	<0,01	6,28	<0,01
2-3	22,50	<0,01	17,71	<0,01
3-4	5,26	<0,01	3,79	<0,01
4-5	1,81	>0,10	3,41	<0,01
5-6	10,09	<0,01	4,83	<0,01
6-7	0,74	>0,50	0,18	>0,90
7-8	0,75	>0,50	2,85	<0,01

Meleg-kezelt TETRAHYMENÁK			
hosszuság		szélesség	
t	p	t	p
11,71	<0,01	0,61	>0,50
4,95	<0,01	6,45	<0,01
6,52	<0,01	0,58	>0,60
4,57	<0,01	9,55	<0,01
0,84	>0,40	3,66	<0,01
2,11	<0,01	0,08	>0,90
2,98	<0,01	6,22	<0,01

4. TÁBLA

A kezelést követő napok közötti szélesség és hosszuságértékek közötti különbségek szignifikanciája /t/ a szabadságfokkal /p/ a hideg- és meleg-kezelt TETRAHYMENÁK esetében.

tott szignifikancia a kontrollhoz viszonyitva, és "p" alatt a szabadságfok. A 4.Tábla számadatai a hideg- ill. melegkezelt állatok egyes napok közötti eltéréseinek szignifikanciáját mutatják.

A számitások során kiderült, hogy a kezelt állatok hosszuság és szélességértékei a kontrollal összehasonlitva attól szignifikánsan különböznek kivéve a hetedik és nyolcadik napon a hideg-kezelt állatokat, a nyolcadik napon a meleg-kezelt állatokat amikor nincs szignifikáns különbség ezen állatok és a kontroll között. A szélesség esetében a kontroll és hidegkezelt állatok között a nyolcadik, a melegkezelt állatok és a kontrollok szélességei között még a nyolcadik napon is szignifikáns a különbség.

Az egyes napokon kapott eredményeket összehasonlitva azt látjuk, hogy legtöbb esetben a különbség szignifikáns. A kontroll állatokon végzett naponkénti mérések eredménye változó ugyan, de az eltérések ebben az esetben nem szignifikánsak.

Enzimaktivitási vizsgálatok a hideg- és meleg-kezelt Tetrahymenákon /a borostyánkősavdehydrogenáz, tejsavdehydrogenáz és a glutaminsavdehydrogenáz aktivitásának vizsgálata/

Kisérleteim utolsó részében megvizsgáltam néhány enzim, nevezetesen a borostyánkősav- glutaminsav,- és tejsav dehydrogenáz aktivitását a hideg- és meleg

kezelés után. A borostyánkősavdehydrogenáz enzim hatására a borostyánkősav dehydrogenálódva fumársavvá alakul. Ez az enzim már régóta ismert és sokat tanulmányozott nagyon stabil enzim. Csak a legutóbbi időkben sikerült tisztán előállitani szövetekből, mert igen erősen kötődik a mitochondriumok vizben oldhatatlan strukturájához. A borostyánkősavdehydrogenáz bizonyos szempontból különleges enzimnek tekinthető, mert a substrátról lehasadó hidrogéneket nem egy lazán kötött koferment veszi át, mint a többi dehydrogenáz esetében. Mivel az enzim erősen kötött a sejt megfelelő strukturájához, kimosás után a sejthomogenizátum a kofermentek eltávolitása miatt egyedül csak borostyánkősavat képes dehydrogenálni /18/. A dehydrogenálás kimutatható ugy, hogy oxigénmentes esőben a szövetet borostyánkősavval és valamilyen könnyen redukálható festékkel /methylénkék/ hozzuk össze. A dehydrogenáz hatására a methylénkék rövid idő alatt szintelen leukomethylénkékké redukálódik. Ezt a módszert THUNBERG /85/ dolgozta ki és már régebben is kiterjedten használták a dehydrogenázok kimutatására. A módszer más dehydrogenázok kimutatására is alkalmas olyan esetekben, amikor a DPN redukálódik. Ilyenkor a dehydrogenáz, a megfelelő substrát és DPN mellett egy flavoproteint is kell adni a rendszerhez. A redukálható festékek és a redukált DPNH között a reakciósebesség gyakorlatilag nulla, de a redukált piridin nukleotidoknak a festékkel történő reakcióját a flavoprotein katalizálja. A borostyánkősav dehydrogenálása utján keletkező fumársav vizet vesz fel és almasavvá alakul. Az almasav alakulásának

a további sorsa lényegében a citrátkör utolsó lépése. A sejtekben a szénhidrát anyagcsere egyik keletkező terméke a piroszőlősav, amely vegyület további alakulásának egyik utja azt, hogy a tejsavas erjedés során a DPNH-tól hidrogént vesz át és tejsavvá redukálódik. Ez a folyamat megfordítható oxido-redukciós folyamat, melyet egy másik fermentum a tejsav-dehydrogenáz katalizál.

A glutaminsav dehydrogenáz központi jelentőségü fermentum a dehydrogenázok között. Ez az enzim a tejsav dehydrogenázhoz hasonlóan szintén kofermenttel /DPN/ működik és működése reverzibilis, ami lehetővé teszi az egyes aminosavak aminocsoportjainak reverzibilis lebontását, s igy adott esetben ammoniából és egyes vegyületekből aminosav felépitését is. Ezeknek a reakcióknak különös jelentősége van abból a szempontból, hogy majdnem minden aminosav részt tud venni benne /83/.

A dehydrogenázok jelentéktelen mennyiségben fordulnak elő a szövetekben, s ugyanakkor igen nagyszámu elektront képesek átvinni. Egy dehydrogenáz enzim a

sejtek anyagcseréjében percenként ezernél is többször képes váltakozva oxidálni és redukálni. Más szavakkal egy molekula dehydrogenáz percenként több mint 1000 molekula substratot tud oxidálni. Igen fontos tény az, hogy a dehydrogenálás reakciói során az elektronoknak a légzési katalizátorok során való áthaladásakor az oxidáció energiája foszfátkötéseknek nagy energiáju anhydridjeibe /ADP, ATP stb./ halmozódhat fel /90/. Ezért az állatok anyagcseréjének energetikai részében, egyes anyagoknak az átalakulásában, valamint a mechanikai munkavégzésben a jelenlétük nélkülözhetetlen.

Mielőtt a fenti enzimek aktivitásának a meghatározását elvégeztem volna, előzetes tájékozódás végett histokémiai módszerrel kimutattam a dehydrogenázok aktivitását a hideg- és meleg-kezelt állatokban. A kimutatáshoz SCHELTON és SCHNEIDER /50/ módszerét használtam. A kimutatásnak a lényege az, hogy a fixálatlan Tetrahymenákat inkubáló oldatba visszük, amely oldat a megfelelő puffer rendszer mellett tartalmazza a substrátot és egy tetrazolium sót. A tetrazoliumsók vizben jól oldódó halványszinü, vagy szintelen vegyületek, melyek könnyen redukálhatók és a redukció folyamán vizben oldhatatlan szines formazánná alakulnak, melyeket mikroszkóp segitségével meg lehet figyelni. A kimutatáshoz neotetrazoliumot használtam. A vizsgálat eredményeképpen kiderült, hogy a hideg- és meleg-kezelt Tetrahymenákban az enzim aktivitás minimális, vagy egyáltalán nem figyelhető meg, mig a kontroll állatokban a dehydrogenáz aktivitását a cytoplazmában lévő vörös-sötétkék formazán granulumok jelzik. A fenti

kimutatás nyomán megvizsgáltam, hogy a hideg- és meleg-kezelések után naponként hogyan alakul az enzimek aktivitása. Az enzimaktivitás meghatározásakor a Tetrahymenák tenyésztését hasonlóan végeztem, mint a szaporodási és morphológiai vizsgálatok alkalmával. Az állatok 3 napos időközönkénti, ötszöri átoltása után egysejt-kulturát tenyésztettem ki. Ezután elvégeztem a hideg- és meleg-kezelést, majd 3 óra elteltével mikor az elpusztult állatok leülepedtek és a tenyészetek hőmérséklete ismét felvette a normál tenyészhőmérsékletet, az állatokat 1 literes Erlenmeyer-lombikokban lévő 750 ml pepton táptalajra oltottam át. 24 óra elteltével naponként a hideg- és meleg-kezelt állatok, valamint a kontroll állatok esetében meghatároztam a borostyánkősav-, tej - és glutaminsav-dehydrogenáz aktivitását. A vizsgálat előtt az állatokat nem lehet rögzíteni, mert a rögzítőszerek jelentősen csökkenthetik, vagy teljesen blokkolják az enzimműködést. Ezért az állatokat nagy fordulatszámmal centrifugáltam, majd mostam desztilláltvízzel és ezt a műveletet többször megismételtem. Az utolsó centrifugálás után a nedves anyagból, melyeket a kezelés után különböző napokon vett tenyészetekből kaptam, a borostyánkősavdehydrogenáz esetében 300 mg, a tejsav- valamint glutaminsav dehydrogenáz aktivitásának a vizsgálatához 500-500 mg-t mértem ki torziósmérleggel, majd a sejteket homogenizáltam. Az enzimek aktivitását DOMJÁN és KOVÁCS /15/ módszere szerint határoztam meg. A módszer egyszerűsége és könnyen kivitelezhetősége folytán a meghatározás meglehetősen pontos. A meghatározáskor a methylénkék elszintele-

nedési idejét mértem. A kontroll, hideg- és meleg-kezelt állatokon észlelt redukálási időket az 5.Tábla tünteti fel.

A borostyánkősavdehydrogenáz helyzete a dehydrogenázok között a bevezetőben említett adatok szerint különleges, mert szorosan kapcsolódik a kofermenttel. Ezért aktivitása közvetlenül a sejtek homogenizátumából meghatározható, ha a rendszerhez substratot adunk. A másik két enzim aktivitásához szükséges ezen enzimeknek a kofermentje, amely DPN-el azonos. A sejt homogenizátumhoz ezen enzimek esetében hozzá kell adni, hogy az enzim kifejtse teljes aktivitását. A kofermentt bizonyos mennyiségben megtalálható a sejt homogenizátumban is, azonban, hogy az enzimeket teljes aktivitásukat kifejtsék a DPN jelenléte feleslegben szükséges. DPN drága és nehezen beszerezhető volta miatt magam állitottam elő SUMNER /72/ módszere szerint élesztőből. Az előállitás lényege hogy kénsavval savanyitott alkohollal az előzetesen aetherben suspendált élesztőből a kofermentt kivonódik. Az oldott kofermentet ezután alkoholos precipitációval tisztitjuk.

Borostyánkősavdehydrogenáz meghatározásakor 300 mg nedves anyagot mértem be a homogenizáló csőbe. A homogenizálás után az anyagot Wassermannecsőben mostam át 1 ml 0,1 molos nátrium-succinát substráttal, melyet előzőleg foszfát pufferrel 7,2 pH-ra állitottam be. A substráttal felhigitott homogenizátumra ezután kevés parafinolajat öntöttem, majd csöveket 25 C^{o} hőmérsékletü vizfürdőbe álli-

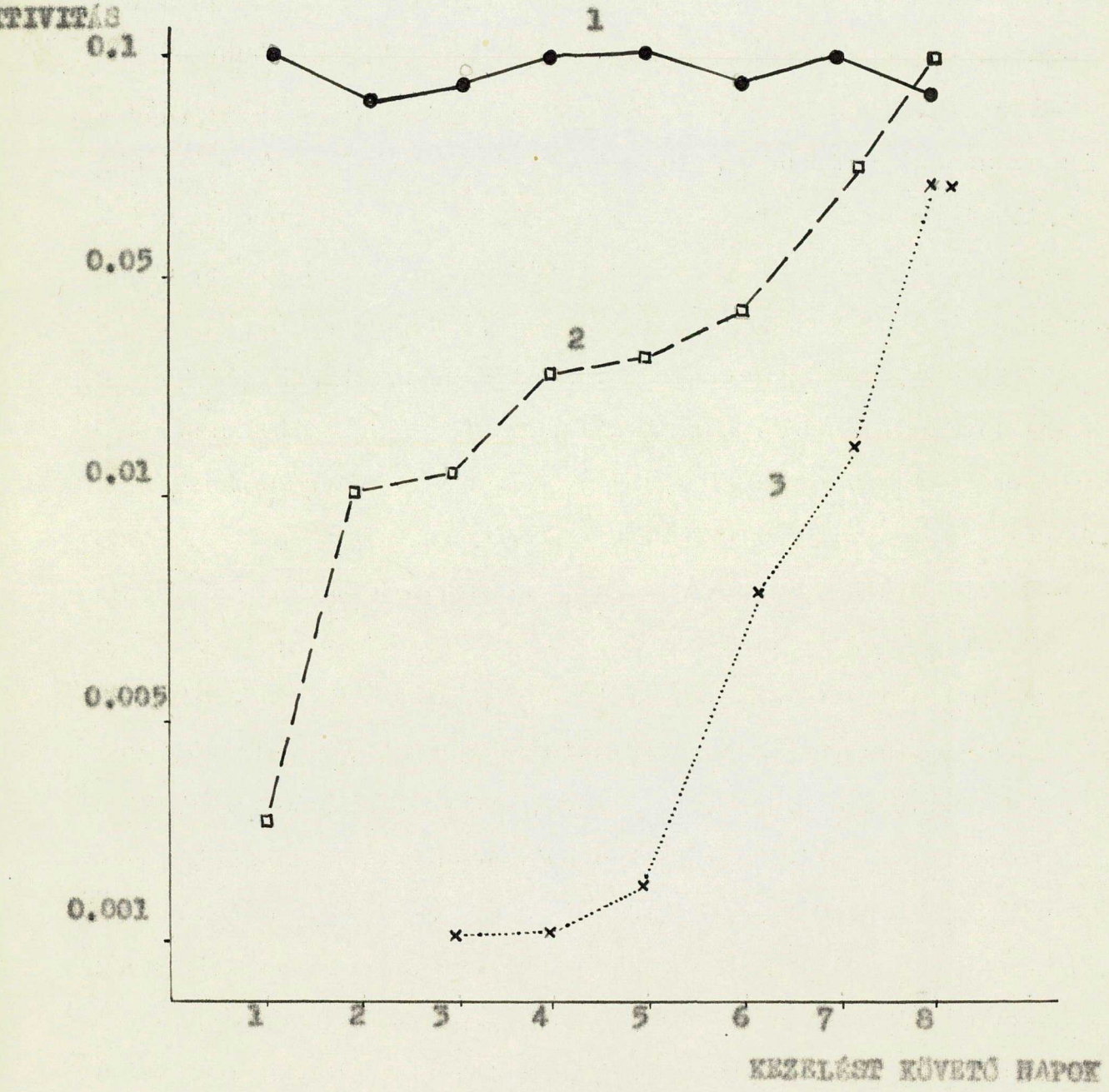
Napok száma	Kontrol			Hidegkezelt			Melegkezelt		
	TETRAHYMENÁKBAN a dehydrogenáz aktivitások								
	Redukálási idő			Redukálási idő			Redukálási idő		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	10'	25'	17'	340'	-	-	-	-	-
2	12'	21'	26'	85'	-	-	-	-	-
3	11'	19'	26'	71'	-	187'	630'	-	-
4	10'	22'	18'	38'	126'	115'	600'	-	-
5	9'	24'	21'	31'	55'	102'	470'	360'	178'
6	11'	17'	19'	22'	56'	61'	120'	40'	123'
7	9'	23'	22'	13'	24'	54'	52'	32'	75'
8	12'	22'	27'	9'	25'	40'	13'	28'	46'

5. TÁBLA

A borostyánkősavdehydrogenáz /1/, tejsavdehydrogenáz /2/ és glutaminsavdehydrogenáz /3/ aktivitása a methilénkék redukálási idejében kifejezve a kontrol, hideg- és meleg-kezelt TETRAHYMENÁK esetében.

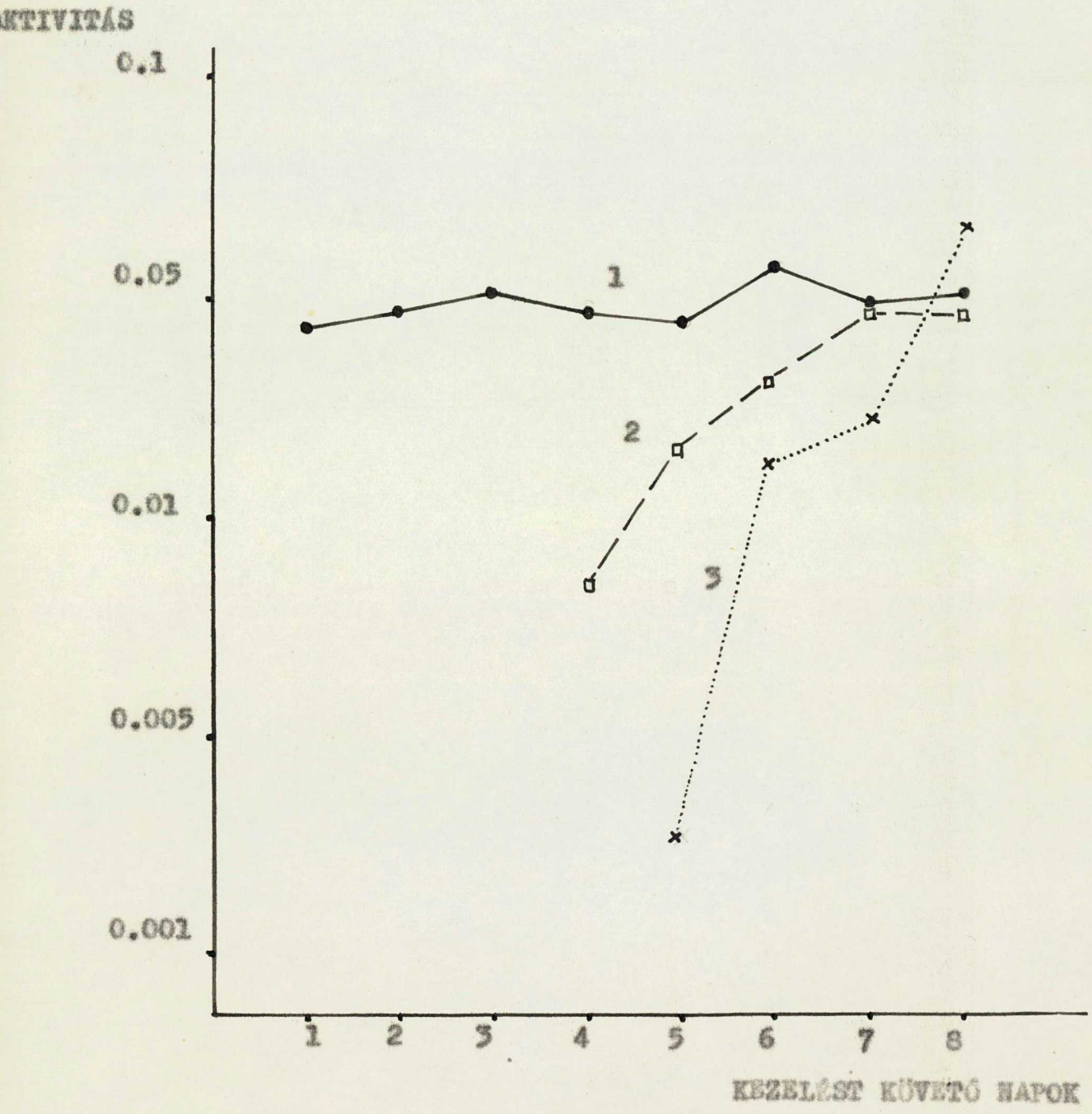
tottam 20 percre, hogy az oldatban lévő oxigén elhasználódjék a rendszerből. A homogenizátummal a borostyánkősavat fumársavvá lehet oxidálni. A reakcióban 2 atom hidrogén /2 proton és 2 elektron/ szakad le a substratról és fumársav keletkezik a protonok és elektronok pedig az akceptorhoz kapcsolódnak. Ha ez a folyamat oxigén jelenlétében történik, az oxigén lesz az akceptor és víz képződik. Ha oxigén helyett methylénkéket alkalmazunk, akceptorként ez veszi fel a hidrogént és ezáltal leukomethylénkékké redukálódik. Ezért szükséges a rendszert előzetesen 20 percig methylénkék nélkül lélegeztetni, hogy az oldatban lévő oxigén elhasználódjék /84/. 20 perc elteltével minden csőbe 0,025 ml 0,2 %-os methylénkék oldatot pipettáztam és a kémcsövek tartalmát mágneses keverővel gyakran megkeverve stopperórával megmértem a methylénkék elszintelenitésének az idejét. Az 5. ábrán látható a borostyánkősavdehydrogenáz aktivitásának változása a kezelés utáni 8 napon keresztül a hideg- és meleg-kezelt állatok, valamint a kontroll esetében. Az ábrából kiderül, hogy a kezelés utáni első napon az enzim aktivitása csekély mértékü, vagy egyáltalán nem is mérhető. Az aktivitás fokozatosan növekedik és a 8-ik napon éri el a kontrollok értékét. Az enzim aktivitását a methylénkék redukálásának a reciprokával fejeztem ki.

A tejsavdehydrogenáz aktivitásának a méréskor hasonló módon jártam el, mint a fenti esetben, azonban a használt nedves anyag mennyiségét 300 mg-ról 500 mg-ra emeltem, mert ezen ferment aktivitása lényegesen kisebb, mint a borostyánkősavdehydrogenázé. Ez a ferment



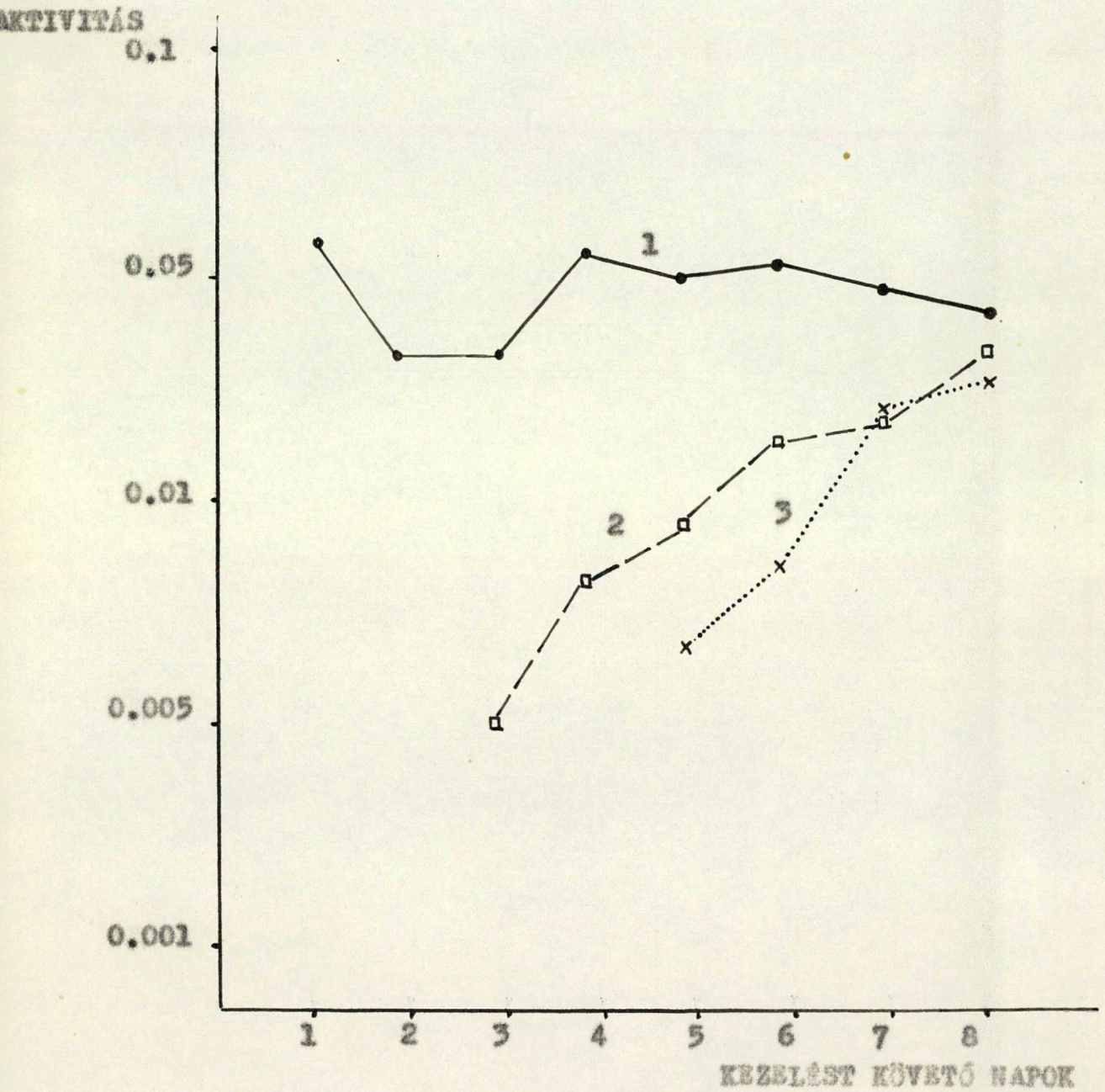
5. ÁBRA

Borostyánkősav-dehydrogenáz aktivitás kontroll /1/, hidegkezelt /2/ és melegkezelt /3/ Tetrahymenákban.



6. ÁBRA

Tejsavdehydrogenáz-aktivitás kontroll /1/, hidegkezelt /2/ és melegkezelt /3/ Tetrahymenákban.



7. ÁBRA

Glutaminsavdehydrogenáz-aktivitás kontroll /1/, hidegkezelt /2/ és melegkezelt /3/ Tetrahymenákban.

DPN-el működik, ezért az 500 mg homogenizátumot, és 1 ml 0,1 molos tejsavat tartalmazó rendszerhez 0,5 ml 1 %-os DPN oldatot adtam. Az oldatot ezután a levegőtől paraffinolajjal elzártam, vízfürdőre helyeztem és 20 perc eltelte után 0,025 ml 0,2 %-os methylénkék oldatot pipettáztam a rendszerbe és itt is mértem a methylénkék redukálási idejét. A 6.ábrán látható /6.ábra/ a tejsavdehydrogenáz aktivitásának alakulása a kezelés után. A meghatározás eredménye azt mutatja, hogy itt is a 8-ik napon éri el azt az aktivitást, amely a kontrollnak megfelelő.

A glutaminsavdehydrogenáz meghatározás teljesen azonos módon történt, csupán a substrát alkalmazásában történt változás, amennyiben itt 0,1 molos glutaminsav oldatot használtam. A 7.ábrán látható görbék a glutaminsavdehydrogenáz aktivitásának a változását mutatják a kezelést követő 8 napon keresztül. Ezek a fermentek is a kezelés utáni 8-ik napon érik el intenzitásuknak a maximumát.

A kisérleti eredmények megvitatása

A kisérleti eredmények, melyeket az ismertetett vizsgálatok nyujtottak, megerősitik azokat az irodalmi adatokat, hogy a Tetrahymenák helyzete az állatvilágban és egyszejtüek között is különleges, mert sajátos fiziológiai tulajdonságokkal rendelkeznek.

Egyetemi Könyvtár SZEGED 14

Nagyon érzékenyen reagálnak egyes anyagokra mint pl. az azoguanin, 8-azoguanin, valamint sugárzásokra is. Viszonylag enyhébb behatás, /pl.hőmérséklet/ esetében, mint a normál tenyészhőmérséklettől való néhány C° eltérésnél megváltozik az állatok szaporodása, sejttérfogata, valamint anyagcseréje. Erre utalnak James /35/ és Gross /23/ vizsgálatai is, akik hasonló tényeket tapasztaltak a hőmérséklet változással kapcsolatban. Ugyanezt mutatta ki WINGO /89/ egy más faktor a pH változása esetében is. Az állatok nagy érzékenységét külső tényezők iránt az is bizonyitja, hogy a bevezetőben emlitett különböző törzseknek a tenyészhőmérsékleti optimuma eltérő /25/. Igy könnyen érthető, hogy a hőmérsékletnek nagyobb változásai még inkább kihatnak az állatok életfunkcióira és biokémiai jellemzőire.

Az eredményeim első részében, a szaporodási és morfológiai vizsgálatok esetében az első szembetűnő dolog a meleg hatásnak kitett állatok szaporodásának, valamint sejtméreteinek a változása. Nehéz azonban megmagyarázni azt, hogy milyen összefüggés van a két tényező között. Az eredmények szemben állnak azokkal a nagyon jól ismert adatokkal, melyek világosan kimondják, hogy a sejt tömegének a gyarapodása együtt jár a fajlagos felületnek a csökkenésével. Ez a jelenség mindig anyagcserezavarhoz vezet és ez a sejten belüli ellentét mindig a sejt osztódásakor oldódik meg. A sejtosztódások synchronizálásakor, amikor 7 hőmérsékleti shockot alkalmaznak az

történik, hogy a sejtekben a normális sejt struktura reduplikációjakor a sejtnek a tömege gyarapszik. Ilyenkor a sejt elökészül az osztódásra, a felépitéssel megteremti egy uj sejt keletkezésének a lehetőségét. Mikor azonban a sejt elérne a sejtosztódás időszakába, egy magasabb hőmérséklettel megakadályozzuk az osztódást. Ezután a hőkezelés után a normál tenyészhőmérsékleten a sejtekben ismét fokozódik a protein synthezis és mikor a sejtosztódás beiktatódna a normális életciklusba, ismét hőmérsékleti shockot alkalmazunk. Tehát lényegében az történik, hogy a hétszer egymásután alkalmazott hőhatás csak a sejtvolumen gyarapodását idézi elő és amikor ez a hatás megszünik, a sejtek azonnal synchronban osztódnak.

CHRISTENSON /7/ szerint a proteinek synthezise a magasabb hőmérsékleti hatásokon igen gyorsan megy végbe, viszont alacsonyabb hőmérsékleten a protein synthezis szünetel. CHRISTENSON ezt ugy magyarázza, hogy a protein synthezis szüneteiben az elsődlegesen létrejövő labilis proteinek átalakulnak stabilis proteinekké. Az utolsó hőkezelés és az első osztódás között pedig megnő az oldékony proteineknek a mennyisége. Érdekes, hogy az első négy hőkezelés alatt az összes protein mennyiség a sejtekben még állandó /17,87/.

A DNS és RNS vizsgálatok, melyeket a Tetrahymenákon végeztek a hideg- meleg- kezelés után, nem mutatnak signifikáns különbségeket /76/. A hőkezelés során kiderült, hogy a DNS tartalom növekedik a hőkezelés alatt az első synchron osztódásig /89/. A DNS tartalomnak

a növekedése nincsen arányban a mag térfogat növekedésével, ez utóbbi sokkal gyorsabban növekszik.

A meleg- kezelés alatt lecsökken a sejtek nukleotid-TP és az ATP mennyisége is /68,89/. A meleg- kezeléskor általában oxigénhiány lép fel, ami csökkenti a makroerg foszfátok regenerációját. A pyroszőlősavnak az alakulása ekkor a glykogén felé történik és ugyanakkor az aminosavak is pyroszőlősavvá alakulnak.

Az általam alkalmazott hőhatások az eredmények szerint kapcsolatban vannak a sejtek méreteivel és az osztódásukkal is. A hideg- meleg- kezelés hatására az állatoknak a sejtméretei sokkal kisebbek, mint a kontrolloké és a szaporodási ütem pedig minimális. A szaporodási vizsgálatok eredményéből kiderül az is, hogy a hőmérsékleti kezelés olyan változást hoz, amely nem szabályos ütemben, fokozatosan tér vissza az eredeti ritmushoz, hanem a hideg- és meleg- kezelt állatoknál fokozodó szaporodási ritmusban a 4-ik, illetve 5-ik napon kiugrás figyelhető meg. A 6-ik és 7-ik napon az állatok szaporodása hasonló a kontroll állatokéhoz. A sejteknek a hosszusága és a szélessége ezzel szemben fokozatosan éri el a kontroll állatok méreteinek az értékét.

A szaporodásnak a változó mértékét nehezen lehet összefüggésbe hozni a sejtek méreteivel. A csökkent mértékü szaporodás esetében a testméreteknek nagynak kellene lenni, illetve a szaporodás intenzitásának a növekedésével csökkennie kellene a sejtméreteknek.Azonban

a kisérleti eredmények szerint /1,2,3.tábla adatai/ a szaporodás mértéke a kezelést követően párhuzamosan emelkedik a méretekkel. Ez visszont azt erősiti meg, hogy a sejt tömeg és felület arányának az eltolódása nem az egyetlen tényező, amely sejtosztódást hoz létre.

Az enzimek aktivitása a kezelés utáni első napon szintén csökkent mértékü, azonban a további napokon aktivitásuk növekszik. A megvizsgált néhány enzim aktivitásán keresztül betekintést nyerhetünk az anyagcsere parányi részleteibe. SCHERBAUM /79,80/ vizsgálatai alapján a hőre különösen érzékeny DPNH-oxidáz fermentek károsodnak hőhatásra, de destrukciót szenved a tejsavdehydrogenáz is. Eredményeim szerint ennél sokkal kevésbé érzékeny fermentumok is, mint pl. a borostyánkősavdehydrogenáz aktivitása is csökken a hőkezelés után. Ez azt jelenti, hogy az állatok energetikai folyamataiban is zavarok keletkeznek, amit alátámasztanak az irodalmi adatok is /89,68/. A borostyánkősavdehydrogenáz részleges vagy teljes inaktiválódása közvetlenül a citrátkör lefutásában okozhat zavart, ugyanigy a tejsavdehydrogenáz inaktiválása is.

Nem szabad figyelmen kivül hagyni azt a tényt, hogy az általam alkalmazott hőkezelések csak egyszeriek voltak /single-shock/, azonban ugynevezett "durva" behatások. A forróvisbe meritett tenyészetekben azonban az állatokat valószinüleg nem érte egységesen a hőhatás. Valószinü, hogy a tenyészet közepén lévő állatokat alacsonyabb hőhatás érte a 4 másodpercig tartó kezelés

alatt, mint az üvegcső falához közelebb lévőket. Ezen meggondolás alapján magyarázható meg az állatok jórészének a pusztulása is, amelyek nem birták ki a magas hőmérsékletet.

Nem volt meglepő, hogy a hidegkezelés esetében mikor az állatok befagytak a táptalajba, a jég kiengedése után az állatok kb 60 %-a életben maradt, mert sokkal differenciáltabb, valamint magasabb fejlettségi fokon lévő állatok /egyes hal és béka fajok/ is kibirják ezt a hatást, bár ezek a természetben végbemenő fagyások lassabban következnek be, mint a jelen kisérletekben történt mélyhütés.

Az általam alkalmazott két hőmérsékleti tényező egyszerü hőmérsékleti shocknak fogható fel, azonban az alkalmazott hőmérsékletek valószinüleg sokkal nagyobb destrukciót hoznak létre a sejtekben, mint a synhronizálás esetében, amikor a normális tenyészhőmérséklet és a meleg kezelési hőmérséklet között a különbség 4-5 °C. Az irodalmi adatokat is figyelembe véve, kisérleti eredmények azt mutatják, hogy a sejtek a hőmérsékleti hatásokat nehezen heverik ki és viszonylag elég sokáig térnek vissza anyageserejükben, alakjukban és szaporodásukban a kontrollhoz hasonló értékekhez. A két alkalmazott hőmérsékleti hatás, mint egyszerü shock, a Tetrahymenákon a kezelés után néhány óra elteltével minden valószinüség szerint egyszerü synchron osztódást hoz létre. A sejtosztódás után méreteik csökkentek

maradtak és ez megmagyarázná azt, hogy miért kisebbek az állatok a kezelés utáni első napon. Nagyon valószinü az is, hogy a forró vizzel történő kezelés után az életben maradott állatokon is történt synchron osztódás. Azonban ezen állatok életfunkciói még csökkent mértéküek, ami azt eredményezi, hogy az első synchron osztódás és az ezt követő osztódás közötti idő elhuzódik. A generációs idő eltolódása azonban 8 nap alatt fokozatosan hasonlóvá válik a kontroll állatok generációs idejéhez.

Ezt a feltevést az is igazolja, hogy a kezelés után 36 óra elteltével /12 óra inkubálási időt is hozzászámitva/ a szaporodási kisérletekhez beállitott hideg- kezelt állatoknál szaporodás nincs, a melegkezelt állatoknál pedig minimális.

A synhronizáláskor történő protein synthezis változására már utaltam a fejezet elején. Abból kiindulva, hogy a provokált synchron osztódás után a két osztódás közötti időszak elhuzódik, megmagyarázható az is, hogy miért kisebbek az állatok. A megkisebbedett sejtméret az első osztódás következménye, azonban ez is függvénye a cytoplazmában károsodást szenvedett protein synthezisnek. A kezdeti hőhatásra - mivel a tenyészetek nem vesznik fel azonnal a kezelési hőmérsékletet, a solubilis, tehát könnyebben destrukciót szenvedő proteinek igen gyorsan átalakulnak insolubilissá /69/, vagyis a sejteknek van még bizonyos idejük stabilizálódni. Ez bizonyos fokig védekezést

jelent a hőmérsékleti hatások ellen. Amikor a hőkezelés megtörténik, bizonyos sejt alkotórészek: proteinek, RNS és DNS frakciók aktivak maradnak, másrészük pedig denaturálódik. Ebben az esetben megszünik az információs kapcsolat a sejtmag DNS tartalom, valamint a cytoplazmában lévő aktiv protein synthezist végző RNA között. A hőhatás megszünése után a szerkezeti strukturák még bizonyos ideig károsodtak maradnak, de a hőhatás előtt stabilizálódó proteinek, valamint azok a szerkezeti elemek, amelyek nem károsodtak, lehetőséget nyujtanak a hőhatás utáni egyszeri osztódásra. Ezután, mivel a protein synthezis még nem fut teljes intenzitással a sejtek kicsinyek maradnak, s ebből kifolyólag az állatok alakjában is eltérő értékek mutatkoznak a kontrollhoz viszonyitva. Ezt magyarázná az is, hogy az egyes aminosavaknak más tipusu vegyületekbe való átalakulását katalizáló glutaminsavdehydrogenáz aktivitása minimális. Az enzim aktivitás csökkenés miatt a struktur protein synthezis ilyen irányu feltétele nincs adva, ezek alapján a szénhydrát, vagy más anyagok közti - anyagcseréje csökkent mértékü. Érdekes, hogy a synchronizált Tetrahymenákon végzett DNS és RNS mennyiségére vonatkozó vizsgálatok eredményei a DNS és RNS mennyiségének a változására vonatkozóan nem mindig mutatnak signifikáns különbségeket /53/. Ennek ellenére valószinü, hogy a kezelés után az állatokban a DNS és RNS tartalomban is változás történik. Az RNS károsodása volna egy más tényező, ami magyarázná a protein synthezis csökkentett mértékét. Ha az RNS frakciók /s-RNS, m-RNS/ nem végzik el teljes mértékben

a funkcióját, a strukturfehérje szinthézisében szintén gátló hatás jelentkezik. Végső fokon valószinüleg a sejtmagban lévő DNS, mint információs központ is lassabb mértékben működik, ami szintén befolyásolja a plazmában folyó protein-felépitést. Végső soron a sejtmagban lévő DNS határozza meg a cytoplazmában lévő épitőfolyamatokat és részbeni károsodása esetén először el kell végezni saját regenerációját és szinthetizálnia kell a megfelelő RNS-eket, amelyek meghatározzák a sejten belüli fehérje szinthezis specifitását, de ugyanakkor növekedési és formaképző folyamatokat is specifikálnak. Különösen fontos az RNS között az információkat szállitó s-RNS, valamint az m-RNS, amely a specifikus információ átadást valósitja meg matrixként kapcsolódva a stabil RNS-el, mellyel együtt meghatározzák a cytoplazmára jellegzetes szerkezeti elemek felépitését /91/.

Azok a vizsgálatok, amelyek a különböző makroerg foszfátok mennyiségének a megállapitását célozták, kimutatták, hogy a hőkezelés során a sejtek ADP, ATP tartalma csökken. Ezek a makroerg foszfátok a Tetrahymenák hőmérsékleti kezelése után is csökkennek a sejtekben, legalábbis erre utal a dehydrogenázok aktivitásának csökkenése is, mert a redukció-oxydációja kapcsán felszabaduló energia regenerálja ezeket a foszfátokat, és erre a fermentek inaktiválódásakor lehetőségnincs. A sejtmag DNS tartalmának kettős funkciója miatt, vagyis a károsodás utáni autoregenerációja és a megfelelő RNA synthesis elmaradása az,ami miatt a speciális sejt strukturát biztositó

protein synthesis csak bizonyos idő elteltével fokozatosan tudja a több helyen bekövetkezett zavart kiküszöbölni. A kontrollnak megfelelő szaporodás intenzitás, a normális testméret kialakulása, valamint az egyes fermentumoknak a synthesise is ezért csak fokozatosan, folyamatosan alakul ki.

A hőmérséklet változás, amelyet shock szerűen alkalmaztunk nagyon bonyolult komplex problémát jelent az állat anyagcseréje, fiziológiája szempontjából. Ezeket a problémákat teljes részleteiben főleg methodikai hozzáférhetetlenség miatt igen nehéz megközelíteni.

Összefoglalás

Kisérleteimben az irodalmi adatok szerint gyakran alkalmazott hideg - illetve meleg shock hatást, mint synchronizáló tényezőt vizsgáltam meg a Tetrahymena pyriformis GL törzsén. Az állatot könnyen tenyészthetősége és különleges bonyolult anyagcseréje - ami kiemeli a hozzá hasonló állatok közül - különösen alkalmassá teszik különböző vizsgálatokra. Az általam alkalmazott hőmérsékleti hatások eltértek az irodalomban leirt módszerekben alkalmazottaktól. Az állatokat egyrészt gyors hűtéssel megfagyasztottam, részben pedig forrásban lévő vízzel kezeltem.

Kisérleteim első részének eredményeiből kiderült, hogy a hideg - és meleg - kezelt állatok-

nak a szaporodása a kezelés utáni első napokon minimális. A szaporodás a kezeléstől számitott második naptól lassan megindul, majd a 8-ik napon eléri a kontroll állatok szaporodásának az ütemét.

Kisérleteimnek a második részében megfigyelhető volt, hogy a kezelt állatoknak a sejtméreteiben is változás történt. A hideg - meleg - kezelt állatok méretei - mind a hosszuság, mind a szélesség esetében alig teszik a felét a kontroll állatok méreteinek. A csökkent méretek azonban a második naptól kezdve növekedtek és a 8-ik napon a kontrollhoz viszonyitva már nem mutattak signifikáns különbséget.

Kisérleteim harmadik részében megvizsgáltam a borostyánkősav- tejsav- és glutaminsavdehydrogenáz aktivitás változását az állatokban a kezelés utáni napokon. Az enzimaktivitás vizsgálatok eredményei szerint az enzimek működése a kezelést követő napon illetve napokon gátolt, majd az aktivitás a kezelés utáni 8. napra fokozatosan eléri intenzitásának maximumát.

Az eredmények egybevágóak az irodalmi adatokkal. Az állatok csökkent mértékü szaporodása megmagyarázható a kezelés előtti protein synthesissel, valamint azzal, hogy a kezelés hatására az insolubilis fehérjék felhalmozódása egy osztódást biztosit. Ezzel szemben a többi rendszer, amely a további folyamatos protein synthezist biztositaná, csökkentett működésü marad, feltételezhetően nincs

összeköttetése az információkat adó DNS és az információkat átvevő és végrehajtó, a specifikus sejtstruktúrát szintetizáló RNS között. Ezt a feltevést valószínüsiti az egyes aminosavak keletkezését katalizáló glutaminsavdehydrogenáz inaktiválódása. Ezek a rendszerek fokozatosan "kiheverik", vagyis reprodukálják a károsult strukturákat és 8 nap elteltével az állatok szaporodása, mérete és anyagcseréje ismét a kontroll állatokéhoz hasonlóvá válik.

Egyetemi Könyvtár SZTE SZEGED

Ezen az uton fejezem ki köszönetemet Dr.Kiszely György professzor urnak, aki az értekezés összeállitásakor és annak ellenőrzésekor a legmesszebbmenő segitséget nyujtotta.

I R O D A L O M.

1./ Alföldy Z., Hegedüs A.: 1963, Bakteriológiai Vizsgáló Módszerek. Bálint P., Hegedüs A.: Klinikai Laboratóriumi Diagnosztika, II. kiadás.

2./ Barbély I.: 1961, A Tetrahymena pyriformis szaporodása különböző koncentrációju vizes pepton, valamint borjuagy és bouillon táptalajon. Biológiai pályamunka.

3./ Bartha. .: 1951, Beitrag zur Biologie von Trichomonas foetus. Act. Vet. Hung., 1, 35-44.

4./ Baumgartner J.G.: 1936, Ultraviolet irradiated carbohydrates and bacterial growth. J.Bacteriol.,32,75-77.

5./ Belar K.: 1928, Untersuchung der Protozoen. In Peterfy T. Methodik der Wissenschaftlichen Biologie, Berlin, Springer, 1, 735-826.

6./ Bütschli E.: 1876, Studien über die ersten Entwichlungsvorgange des Eizelle, der Zellteilung und die Conjugation der Infusorien. Abh.Senckenberg.naturforsch. Ges.Frankfurt, 10, 1-250.

7./ Christensson E.: 1949, Changes in free amino acids and proteins during cell growth and synchronous division in mass cultures of Tetrahymena pyriformis. Act. Physiol. Scand., 45, 339-349.

8./ Corbett I.I.: 1957, Changes in cell volume in relation to age of cultures and other factors in certain protozoa and bacteria. J.Cell.Comp.Physiol., 50, 309-332.

9./ Cooley N.M.: 1958, The influence of aureomycin, polymixin B, and terramycin upon population growth of Tetrahymena pyriformis, strain W. J.Protozool.,5,suppl.7.

10./ Corliss J.O.: 1952, Review of the genus Tetrahymena. Proc. Soc. Protozoologists, Bd.,3, S. 3.

11./ Corliss J.O.:1954, The literatura on Tetrahymena: its history, growth and recent trends.J.Protozool., 1, 156-169.

12./ Corliss J.O.: 1953, Comparative studies on holotrichous ciliates in the Colpidium-Glaucoma-Leucophris-Tetrahymena group II. Parasitol., 43, 49-87.

13./ Dewey V.C., Parks R.E., Kidder G.W.: 1950, Growth responses of Tetrahymena geleii tochanges in in the basal media.Arch.Biochem., 29, 281-290.

14./ Doflein F., Reichenov E.: 1953, Lehrbuch der Protozoenkunde./Jéna/

15./ Domjan Gy., Kovacs E.: 1959, Eine Methode zur Bestimmung der Bernsteinsäure-Dehydrogenase-Aktivität von Gewebshomogenaten. Enzymologia, 3, 155-158.

16./ Dougherty E.C.: 1953, Problems of nomenclature for the growth of organisms of one species with and without associated organism of other species. Parasitol., 43, 259-261.

17./ Felföldy L.I.M., Kalko F.Zs.: 1959, Some methodical observations on the use of antibiotics for preparing bacteria free algae cultures.Acta Biol.,Hung.,10.

18./ Fruton S.I.,Simmonds S.: 1959, General biochemistry, New York, John Wiley et Songs.

19./ Furgason W.H.: 1940, The significant cytostomal pattern of the "Glaucoma-Colpidium group" and a proposed new genus and species, Tetrahymena geleii. Arch. of Protist., 94, 224-266.

20./ Gellért J.,Penkov I.,Kamarás L.,Józsa G.: 1961, Rákos betegek vérszérumának hatása Paramecium caudatum Ehrb-re. Ann.Biol., Tihany, 28, 3-10.

21./ Giese A.C.: 1945, A simple method for division rate determination in Paramecium.Physiol. Zool.,18,158-161.

22./ Goldschmidt R.: 1904, Die Chromidien der Protozoen. Arch. f. Protist., 5, 126-144.

23./ Gross J.A.: 1955, A comparison of different criteria for determining the effects of antibiotics on Tetrahymena pyriformis E. J.Protozool.,2, 42-47.

24./ Haas G.: 1933, Beiträge zur Kenntnis der Cytologie von Ichtyophtirius multifiliis.Arch. f. Protist., 81, 88-137.

25./ Halldor T.: 1959, Delayed division in Tetrahymena induced by temperatura changes.Comp.-rend. Lab. Carlsberg., 14, 207-225.

26./ Hall R.P.: 1941, Food requirements and other factors influencing growth of protozoa in pure cultures. In Calkins G.N., Summers F.M. Protozoa in Biological Research, New York, Columbia University Press., 475-516.

27./ Hall R.P., Johnson D.F., Loefer J.B.: 1935, A method for counting protozoa in the measurement of growth under experimental conditions.Trans. Amer. Micr. Soc., 54, 298-300.

28./ Hamilton L.D. Hutner S.H. Provasoli L.: 1952, The use of protozoa in analysis. The Analyst, 77,618-628.

29./ Harrisson I.A., Sano M.E., Fowler E.E.,Shellhamer R.H., Bocher C.A.: 1948, Toxicyty for Paramecia of sera from cancerous and noncancerous persons.Federation Proc, 7, 306.

30./ Heinrich H.C., Lahann H.: 1953, Die Mikrobiologische Bestimmung der B_{12}-Vitamin mit der Grünlage "Euglena gracilis var. Bacilláris.

31./ Hertwig R.; 1889, Über die Konjugation der Infusorien. Abhandl. Bayr. Akad. Wiss., 17, 150-233.

32./ Huszák I.,Vargha M., Gellért J.: 1958, Die Wirkung des Blutes, Liquors und tumors Schizophrener auf Protozoen.Wiener Zeitschr. f.Nervenheilkd. u.d. Grenzgebeite, 14, 356-362.

33./ Hutner S.H.,Provasoli L.: 1951, The phytoflagellates. In Lwoff A. Biochemistry and Physiology of Protozoa, New York, Acad. Press., 1, 27-128.

34./ Hutner S.H., Provasoli L., Stockstad E.L.R., Hoffman C.E., Belt M., Franklin A.L., Jukes T.H.: 1959, Assay of antiperniciosus anemia factor with Euglena./Proc. Soc. Exp. Biol. Med./

35./ James T.W., Read C.P.: 1957, The effect of the incubation temperature on the cell size of Tetrahymena pyriformis. Exp. Cell. Res., 13, 510-516.

36./ Jindrich J.: 1949, The influence of sulphonamides on protozoa in vitro.Vestn.Csl.Zoologiche Spolecnosti., 13. r. XIII.

37./ Jirovec O.: 1949, Der Einflus des streptomycins und patulins auf einige Protozoen.Experiencia,V/2,74-77.

38./ Jirovec O.: 1950, Das Infusorium Glaucoma pyriformis als Testobjekt in Pharmakologie und Physiologie. Pathol. und Bakteriol., 13, 129-138.

39./ Johnson W.H., Miller Ch.A.: 1957, Isolation of Trichomonas vaginalis with penicillin.Science, 102, 126.

40./ Kaunat H.: 1955, Die Wirkung von Antibiotika auf Paramecium caudatum.Protoplasma, 45, 1-36.

41./ Kidder G.W.: 1933, On the genus Ancistruma Strand II. The conjugation and nuclear reorganisation of A. isseli. Arch. f. Protist., 81, 1-18.

42./ Kidder G.W., Diller W.F.: 1934, Observations on the binary fission of four species of common free--living ciliates, with special reference to the macronuclear chromatin. Biol. Bull., 67, 201-219.

43./ Kidder G.W.: 1941, The technique and significance of control in protozoan cultures. In Calkins G.N., Summers F.M., Protozoa in Biological Research, New York, Columbia University Press, 448-474.

44./ Kidder G.W., Dewey V.C.: 1951, The biochemistry of ciliates in pure culture. In Lwoff A., Biochemistry and Physiology of Protozoa, New York, Acad. Press., 1, 324-400.

45./ Kidder G.W.: 1951, The nutrition and metabolism of protozoa. Ann. Rev. Microbiol., 5, 139-156.

46./ KKidder G.W., Dewey V.C., Heinrich M.R.: 1954, The effect of nonionic detergents on the growth of Tetrahymena. Exp. Cell. Res., 7, 256-264.

47./ Kidder G.W., Dewey V.C., Fuller R.C.: 1954, Nitrogen requirements of Glaucoma scintillans and Colpidium campylum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 86, 685-689.

48./ Kidder G.W., Virginia C.D.: 1957, Deazopurines as growth inhibitors. Arch. of Biochim. and Biophys., 2, 486-492.

49./ Kidder G.W., Mathers D.C.: 1959, Purin antagonists and growth of Tetrahymena. Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med., 102, 306-308.

50./ Kiszely-Barka: 195 , Gyakorlati michrotechnika és histokémia.

51./ Lwoff I.: 1929, Milieux de culture et d° entretien pour Glaucoma Pyriformis., C.R.Soc., Biol., 100, 635-636.

52./ Lwoff A.: 1932, Recherches biochimiques sur la nutrition des protozoaires./Paris, Massen/

53./ McDonald, Barbara B., 1958, Quantitative aspects of deoxyribose nucleic acid /DNA/ metabolism in an amicronucleate strain of Tetrahymena. Biol. Bull., 114, 71-94.

54./ Morgan B.B.: 1946, The use of the antibodies in the purification of Trichomonas foetus/Protozoa/ cultures. Anat. Rec., 94, 437.

55./ Müller M.: A Protozoonok tiszta tenyészetének néhány kérdése. Biol. Közl., VII/1-2, 83-96.

56./ Nardone R.M., Blaszcinsky H.I.: 1954, Growth effect induced in Tetrahymena pyriformis by streptomycin and its components. J.Exp.Zool., 125, 119-126.

57./ Nastiukova O.K.: 1944, Malignant growth in man as diagnosticated by blood serum toxicity for Paramoecia. Compt.rend.Acad.d.sc. URSS, 43,360-364.

58./ Nathan H.A.,Hutner S.H.,Levin H.L.: 1958, Assay of pteridines with Chrithidia fasciculata. J.Protozool. 5, 134-138.

59./ Németh Gy., Csik L.: 1961, Effect of penicillin on Tetrahymena pyriformis, strain GL. I. Multiplication and change of form. Acta Biol., 4,405-409.

60./ Németh Gy., Csik L.: Effect of colchicine and ultraviolet irradiation on the size and shape of Tetrahymena pyriformis GL. Acta Biol.,3,217-222./1962/

61./ Németh Gy.: Nem közölt eredmények.

62./ Norman E.W., Scherbaum O.: 1959, Morphogenetic events in normal and synchronously dividing Tetrahymena. J. of Embryol. and Exp. Morph., 2, 241-257.

63./ Ogata M.: 1893, Über die Reinkultur gewisser Protozoen /Infusorien/. Zbl.Bakt., 14, 165-169.

64./ Popoff M.: 1908, Die Gametenbildung und die Konjugation von Carchesium polypinum L. Zeitsch. wiss. Zool., 89, 478-524.

65./ Richards O.W.: 1941, The growth of Protozoa. In Calkins G.N., Summers F.M. Protozoa in Biological Research. New York, Columbia University Press. 517-564.

66./ Robert E., Parks J.R.: 1957, Antimetabolite studies in Tetrahymena and tumors. Antimetabol. and Canc.

67./ Roskin G.: 1946, Cytotoxic factor in blood of cancer patients. Ann. Rev. Soviet. Med., 4, 115-117.

68./ Seaman G.R.: 1955, Metabolism of free-living ciliates. In Hutner S.H., Lwoff A., Biochemistry and Physiology of Protozoa, New York, Academic Press, 2, 91-158.

69./ Seaman G.R.: 1947, Penicillin as an agent for sterilization of protozoan cultures. Science., 106, 322.

70./ Slater G.R.: 1947, Penicillin as an agent for sterilization of protozoan cultures. Science, 106,327.

71./ Slater I.V.: 1955, Some observations on the cultivation of protozoa. Trans. Amer.Micr.Soc., 74, 80-85.

72./ Summer J.B., Krishnan P.S., Sisler E.B.: 1947, An improved method for the preparation of Coenzym I. Arch. of Biochem., 12, 7-25.

73./ Scherbaum O., Zeuthen E.: 1954, Temperature induced synchronous divisions in the ciliate protozoan Tetrahymena pyriformis in synthetic and proteose pepton media. Exp. Cell. Res., 6, 221.

74./ Scherbaum O.: 1956, Cell growth in normal and synchronously dividing mass cultures of Tetrahymena pyriformis. Exp. Cell. Res., 2, 464-476.

75./ Scherbaum O.: 1957, The division index and multiplication in mass culture of Tetrahymena following i inoculation. J. Protozool., 4, 257-259.

76./ Scherbaum O.: 1957, The content and composition of nucleic acids in normal and synchronously dividing mass cultures of Tetrahymena pyriformis. Exp. Cell. Res., 13, 24.

77./ Scherbaum O.,Louderbach A.L., Theodore L.J.: 1958, The formation of subnuclear aggregates in normal and synchronized protozoan cells. Biol. Bull., 115/2, 269-275.

78./ Scherbaum O., Louderbach A.L., Jahn T.L.: 1959, DNA synthesis phosphat content and growth in mass and volume in synchronously dividing cells. Exp. Cell. Res., 18, 150.

79./ Scherbaum O.: 1960, Synchronous division of microorganisms. Ann.Rev. of Microbiol., 14, 283-310.

80./ Scherbaum O.: 1960, Possible sites of metabolic control during the induction of synchronous cell division.

81./ Schomer H.A.: 1936, The effects of radiation on enzymes. Biological effect of radiation, 2nd ed., McGraw-Hill, New York.

82./ Sonneborn T.M.: 1947, Recent advances in the genetics of Paramecium and Euplotes. Adv. in Genetics, 1, 263-358.

83./ Straub F.B.: 1961, Biokémia, Medicina Könyvkiadó, Budapest.

84./ Szabó I.,Németh G.: 1961, Effect of penicillin on Tetrahymena pyriformis, strain GL. II. Changes in DNA/RNA ratio. Acta Biol., 12,187-190.

85./ Thunberg T.: 1937, Ergebn Physiol., 39, 76.

86./ van Wagtendonk W.J., Hachett P.: 1949, The culture of Paramecium aurelia in the absence of other living organisms. Proc. Nat. Acad. Sci., 35, 155-159.

87./ van Wagtendonk W.J.: 1955, The nutrition of ciliates. In Hutner S.H., Lwoff A., Biochemistry and Physiology of Protozoa, New York, Academic Press, 2, 57-90.

88./ Varga M., Gellért J., Huszák I.: 1955, Schizophreniások vérének, liquorának, vizeletének hatása az egysejtűekre. Fájdalom, Az Ideggyógy. Szemle 1955 évi melléklete, 286-287.

89./ Wingo W.J., Anderson N.L.: 1951, Effect of pH medium upon the growth rate of Tetrahymena geleii T-P. J. of Exp. Zool., 116, 571-575.

90./ Zbarszkij B.I., Ivanov I.I., Mardesev S.P.: 1952, Biológiai kémia, Egészségügyi kiadó, Budapest.

91./ Zbarszkij B.I., 1962, O nukleotidnom kode i regulacii szinteza bjelka v kljetke. Uszpjéhi Szovremennoj Biologii, 54,265-284.

EÖTVÖS KÖNYVTÁRA SZEGED 1039/1974