

JÓZSEF ATTILA TUDOMÁNYEGYETEM EMBERTANI TANSZÉKE
Tanszékvezető: Dr. Farkas Gyula egyetemi docens

A DINITROGÉN - OXID HATÁSA SZOMATIKUS NÖVÉNYI
SEJTEK OSZTÓDÁSÁRA

Doktori értekezés

Írta: Szeles Anna
egyetemi tanársegéd

SZEGED

1981



Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	
2.1. Mitotikus sejtosztódás	6
2.2. A sejtközpont és mitotikus apparátus	11
2.3. A mitózis gátlása	14
3. Anyag és alkalmazott módszerek	
3.1. Kísérleti növény és kísérleti berendezés	20
3.2. Gyökércsucs-preparátum készítése	25
3.3. Autoradiográfia	26
3.4. Elektronmikroszkópos preparátumok készítése	27
3.5. Az adatok matematikai értékelése	28
4. Eredmények	
4.1. Nyomáskísérlet	32
4.2. Időkísérlet	39
4.3. Visszatérés kísérlet	45
4.4. A dinitrogén-oxid hatásmechanizmusával kapcsolatos vizsgálatok	51
4.5. A dinitrogén-oxid kezelés citológiai kísérőjelenségei	56
5. Az eredmények megvitatása	69
6. Összefoglalás	78
7. Irodalom	80
8. Mellékletek	



1. Bevezetés

A sejtosztódás jelenségeinek vizsgálatában igen nagy szerepet játszanak az olyan citosztatikus anyagok, amelyek a sejtosztódás szabályos folyamatát gátolják. Néhányat közülük, mint például a kolhicint, valamint a kolhicin-származékokat, mélyrehatóan tanulmányozták és megállapították, hogy a magorsó /mikrotubulus/ képződését gátolják és ezáltal megakadályozzák a mitózis normális lefolyását. Ismeretes néhány gáz /pl. xenon, argon és dinitrogén-oxid/, mely a mitózis metafázisában blokkolja a sejteket.

Kísérleteim során a dinitrogén-oxidnak szomatikus növényi sejtek osztódására gyakorolt hatását vizsgáltam és doktori értekezésemben az így kapott eredményeket foglalom össze.

A dinitrogén-oxid hatásmechanizmusára irányuló vizsgálatok több szempontból is fontosak. Egyrészt ezt a gázt a klinikai gyakorlatban is alkalmazzák anesztetikusként, másrészt annak a sejtosztódásra gyakorolt hatás-mechanizmusa jelenleg tisztázatlan.

A dinitrogén-oxid csiranövények osztódó gyökérmerisztémájára gyakorolt metafázisblokkoló hatásához hasonló, vagy azonos jelenség figyelhető meg akkor, ha humán rák-

sejteket ezzel a gázzal kezelünk. Ezért hatásmechanizmusának vizsgálatára mindkét kísérleti rendszer alkalmas. A kettő közül modellként a növényi rendszert választottam, mivel alacsony a kromoszómaszám, gyors a csírázóképeség, minimális az eszközigény és gyakorlatilag korlátlan mennyiségű kísérleti anyag állítható elő rendkívül olcsón.

Munkám során az alábbi fontosabb kérdésekre kívánnam választ kapni:

1. A dinitrogén-oxid metafázisblokkoló hatása milyen mértékben függ a gázkoncentrációtól és a kezelési idő hosszától?
2. Reverzibilis vagy irreverzibilis-e a dinitrogén-oxid hatása?
3. A dinitrogén-oxid kezelés gátolja-e a sejtek DNS szintézisét?
4. A dinitrogén-oxid hatása a mikrotubulusok károsításán alapul-e?

Megvizsgáltam továbbá a dinitrogén-oxidos kezelés legfontosabb citológiai kísérőjelenségeit. Az eredmények alapján megkíséreltem megadni a dinitrogén-oxid hatásmechanizmusának egyik lehetséges magyarázatát.

A következők teszik indokolttá a téma vizsgálatát:

1. A dinitrogén-oxid klinikai alkalmazása miatt, annak citológiai hatását feltétlenül tisztázni kell.

2. Minden olyan anyag, amely valamilyen formában hatással van a sejtosztódásra, elősegítheti a sejtosztódás mechanizmusának tökéletesebb megértését.
3. Az a tény, hogy a daganatsejtek gyakrabban osztódnak, mint a normális sejtek, szükségessé tette a mitózisa ható anyagok többirányú, részletes tanulmányozását.

Ezen anyagok, így a dinitrogén-oxid, citológiai hatásának és hatásmechanizmusának vizsgálata közelebb vihet bennünket olyan sejtosztódással kapcsolatos problémák megoldásához, mint pl. a daganatos megbetegedések gyógyítása.

Dolgozatomat 1977 és 1980 között a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Genetikai Intézetében készítettem.

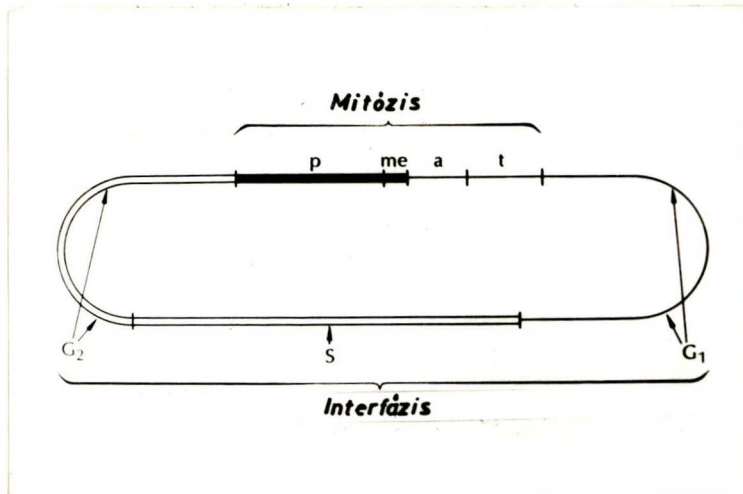
Köszönetet mondok Dr. Alföldi Lajos professzornak az MTA SZBK Genetikai Intézete igazgatójának és Dr. Farkas Gyula tanszékvezetőnek, hogy értekezésen elkészítésére lehetőséget adtak. Köszönöm Judik Péternének a dolgozat ábraanyagának elkészítéséhez nyújtott nélkülözhetetlen segítségét és Horváth Istvánnának a dolgozat gépelése során végzett kifogástalan munkáját. Köszönetet mondok Dr. Hadlaczky Gyulának az SZBK Genetikai Intézete munkatársának a téma felvetéséért és munkám során nyújtott szakmai és tárgyi segítségért.

2. Irodalmi áttekintés

A sejtosztódás felfedezése és folyamatának első leírása /FLEMMING, 1879; STRASSBURGER, 1880/ óta eltelt egy évszázad sejtosztódással kapcsolatos kutatásai egy könyvtárat megtöltő könyv és folyóirat tömeget eredményeztek. Így e hatalmas ismeretanyagnak még vázlatos összefoglalására sem vállalkozhattan. Ezért az alábbiakban a sejtosztódás, a mitotikus apparátus és a mitózisgátlás témaköréből csak azokat a fontosabb irodalmi adatokat foglaltam össze, amelyek a dolgozat tárgyához szorosan kapcsolódnak és annak megértéséhez, ill. az eredmények értékeléséhez feltétlenül szükségesek.

2.1. Mitotikus sejtosztódás

FLEMMING 1879-ben részletesen leírta a szomatikus sejtosztódást és ezt a folyamatot mitózisnak nevezte el. A citológiai megfigyelések alapján a szomatikus sejtosztódás két részből áll: interfázisból és mitózisból. A sejteknek az interfázis kezdete és az azt követő osztódás vége között eltelt életszakasza a sejtciklus /1. ábra/.



1. ábra. Szomatikus sejtek életoiklusának
vázlata /STANNERS and TILL, 1960/

Az ábrán alkalmazott jelölések:

kettős vonal = két kromatidás kromoszómák

S = DNS szintézis, kromoszóma replikáció

G₂ = premitotikus szakasz

p = profázis

me = metafázis

a = anafázis

t = telofázis

G₁ = preszintetikus szakasz

Az interfázis részs szakaszainak - G_1 -, S- és G_2 fázisnak - fontosabb jellegzetességei a következőkben foglalhatók össze:

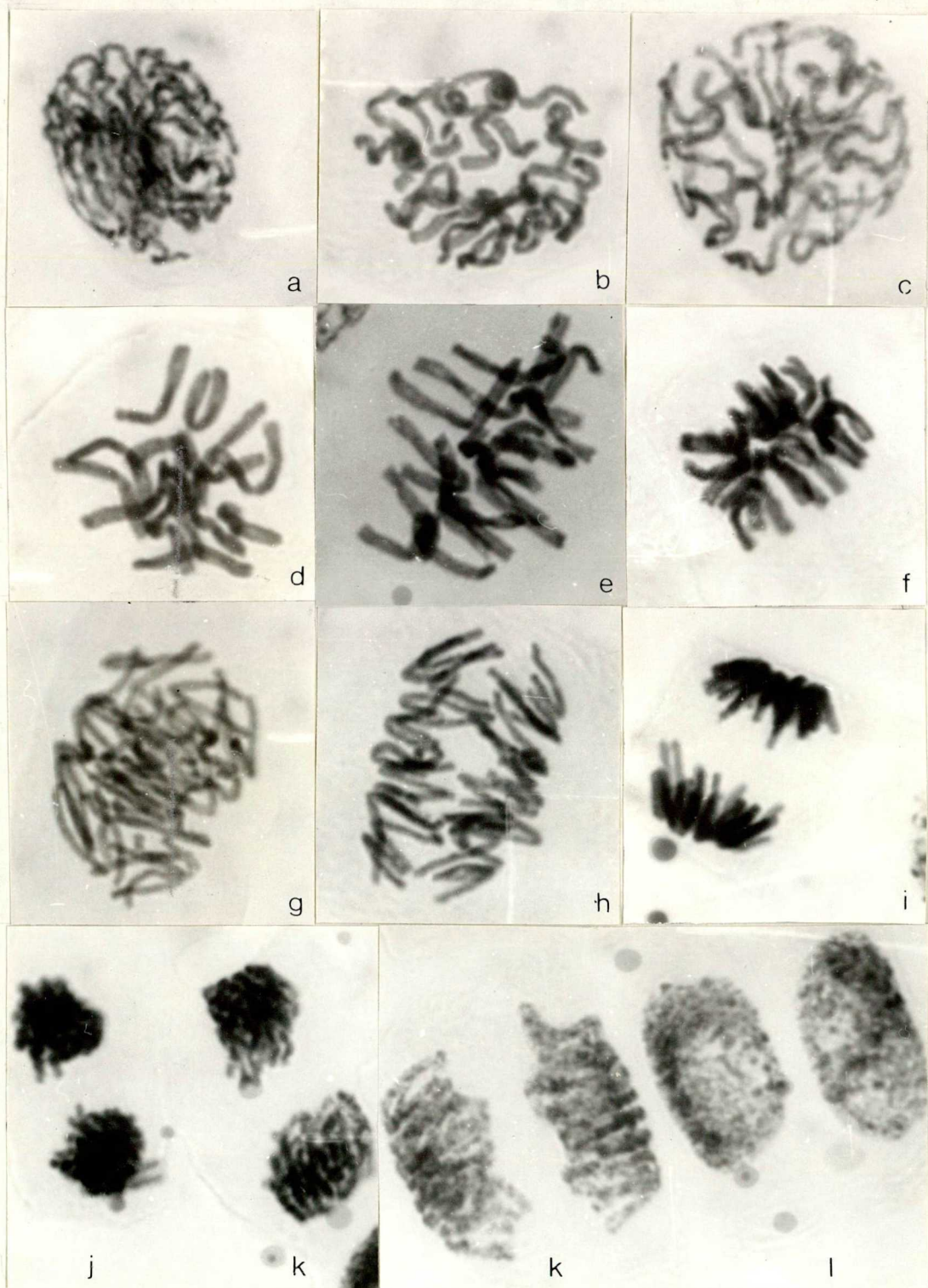
- G_1 vagy preszintetikus szakasz a DNS-szintézist megelőző szakasz.
- S, a DNS-szintézis szakasza. Ebben a fázisban történik a sejtmag genetikai anyagának megkettőződése. A DNS replikáció látható eredménye az interfázist követően a kromoszómák két kromatidája. TAYLOR és munkatársai 1957-ben, TAYLOR 1958-ban a DNS szemikonzeratív replikációjának kísérletes bizonyítását /MESSELSOHN and STAHL, 1958/ megelőzően, autoradiografiás vizsgálatokkal igazolták, hogy a kromoszómák duplikációja növényi sejtekben szemikonzeratív uton megy végbe. A kromatidát felépítő DNS kettős spirál egyik szála újonnan szintetizálódik, így a duplikálódott kromoszóma két kromatidájában a DNS egy "rég" és egy "új" szálból áll.
- G_2 vagy premitotikus nyugalmi fázis, a DNS-szintézis és a mitózis közötti szakasz, amelyben a kromoszóma már két kromatidaként van jelen.

A sejtciklus interfázist követő szakasza a mitózis, amelynek lényege, hogy az S fázisban megkettőződött DNS állomány két utódsejtbe jut tovább. A mitózis végére minden egyes kromoszóma csak egy kromatidából áll és a kö-

vetkező sejtciklus S fázisában ezeknek a kromatidáknak kell megkettőződnieük. A mitózis során keletkezett két utódsejt kromoszónaszáma megegyezik a kiindulási sejt kromoszómaival.

A mitotikus sejtosztódás folyamata 4 fázisra osztható: profázis, metafázis, anafázis és telofázis. A mitózis folyamatát a rozs osztódó gyökérnerisztémájának sejtjeiben megfigyelhető folyamat alapján foglaltan össze /2. ábra/.

- Profázis: A korai profázisban megfigyelhető a sejtmag állományának fokozatos kondenzálódása. A sejtmag kromatinállományából vékony fonalak alakulnak ki /2a. ábra/, melyek megrövidülnek és megvastagodnak /2b. ábra/, így fénymikroszkóppal is észrevehető, hogy az egyes fonalak egymáshoz közel levő fonalpárokból állnak /2c. ábra/. A kromoszómák megrövidülése fokozódik, rendezetlenül helyezkednek el a sejtben - pro-metafázis - /2d. ábra/.
- Metafázis: A kromoszómák centromerjeikkel az egyenlítői síkba rendeződnek /2e ábra/, és jellegzetes metafázisos alakzatot vesznek fel /2f. ábra/.
- Anafázis: Minden kromoszóma centromérája kettéosztódik, így mindkét kromatida önálló kromoszónává alakul, amelyek fokozatosan eltávolodnak egymástól /2g. ábra/. A kromoszómák rendezetten a pólusok felé húzódnak /2h ábra/, mind tömörebb alakzatot vesznek fel /2i. ábra/.



2. ábra. A mitózis folyamata a rozs gyökérmerisztéma sejtjeiben. Nagyítás: 1500 x

- Telofázis: A kromoszómák elérik a pólusokat /2j. ábra/, végbemegy a profázis fordítottjának megfelelő despiralizáció /2k. ábra/. Kialakul az új magnembrán és ezzel az önálló interfázisos utódsejtmagok /2l. ábra/.

A sejtciklus időtartama, illetve a ciklus részfázisainak időtartama igen különböző az egyes fajoknál. LIMA DE FARIA /1972/ kísérletei alapján a rosnövény sejtciklusa 7 óra hosszágig tart. Ebből 4 óra az S, 45 perc a G_1 , 2 óra 15 perc a G_2 + mitózis fázisra esik.

2.2. A sejtközpont és mitotikus apparátus

A mitózis tárgyalásához hozzátartozik a sejtközpont és a mitotikus apparátus viselkedésének leírása is.

Az állati sejtekben megfigyelhető sejtközpont /centriolum, vagy citocentrum/ a sejt középpontjában elhelyezkedő 150-200 nm átmérőjű, 300-500 nm hosszú hengeres test. A hengerpalást 9 csövecskéből épül fel, ezek mindegyikét 1-3 mikrotubulus alkotja. A 9 csövecske egymással nyúlványok révén összeköttetésben áll. A csövekhez kb. 700 Å átmérőjű gömböcskék, szatelliták tapadnak /DE ROBERTIS, 1974/.

Csaknem egy évszázada, hogy HENNEGUY /1897 cit. ROBERTIS, 1974/ felállította hipotézisét, miszerint a centriolumok, kinetoszómák a sejt mozgatóközpontjai és

a centriolumok és a csillók bazális testjei lényegében azonos képletek. Elektronmikroszkópos vizsgálatok bizonyították, hogy a feltételezés helyes /BESSIS, 1958/.

A centriolum az interfázisos sejtben páros képlet. A testvércentriolumok egymáshoz viszonyítva derékszöget alkotnak. Élő sejtekben sikerült megfigyelni a centriolumok osztódását és a pólusok felé történő vándorlásukat /CLEVELAND, 1953. cit. CLEVELAND, 1963/.

Feltételezik, hogy a centriolumok organizációja polarizált /BERNHARD és HARVEN, 1958, GALL, 1961/. Disztális végük kapcsolatos pl. a magorsófonalak kialakulásával, proximális végük viszont a replikációval van összefüggésben. Az interfázis vége felé mindkét centriolum proximális végéhez közel egy, az eredeti centriolumoknál kisebb utódcetriolum jelenik meg /diploszóma-képződés/. Az új centriolum tengelye a régre merőleges. Az interfázisban megkettőződött centriolumok a sejt két pólusa felé vándorolnak és itt kialakul a mitotikus apparátus a centriolum disztális végéből. A sejtközpont valamennyi állati sejtben és néhány alacsonyabbrendű növényben jelen van, magasabbrendű növényekben nem található meg.

Miután a működő centriolum a normális sejtosztódásnak nélkülözhetetlen feltétele, a növényi sejtek citológiájának egyik legfontosabb megoldatlan kérdése, hogy mi látja el a centriolum feladatát növényi sejtben, és ez a feladat

milyen ismert, vagy ezideig ismeretlen strukturához köthető. Jelenleg egy hipotetikus, centriolum feladatot ellátó, szerkezethez nem kötött mitotikus szervezőközpontot /Mitotic Organising Center, MOC/, vagy poláris orsó szervezőket /Spindle Pole Organizer, SPO/ tételeznek fel. Lehetséges, hogy e "centriolumok" kifejlődhetnek egy láthatatlan prekursorból, vagy kapcsolódnak valamilyen egyéb strukturához, pl. a maghártyához. /MARCHANT and PICKETT-HEAPS, 1972/. Láthatatlan prekursor lehet csupán egy replikálódó citoplazmatikus DNS egység is, amely a fejlődés megfelelő stádiumában egy centriolum felépülését irányítja. Alapvető szerepe miatt az orsóképzésben ez az egység jelen lehet minden osztódó sejtben, de csak akkor látható, amikor a centriolumot is létre hozza /PICKETT-HEAPS, 1974/. Az endoplazmatikus retikulumok különböző poláris aggregációi /WILSON, 1970; FOWKE et al., 1974/ vagy egyéb anyagok /PICKETT-HEAPS, 1969; TAY, 1970/, és az állandó magmembránok differenciált területei /DU PRAW, 1970; Mc LAUGHLIN, 1971; ROBINOW and CATEN, 1969/, amelyet mint a centriolum megfelelőjét irtak le, éppen olyan jól jelezheti a helyét az orsószervezőtestnek azokban az esetekben, amelyekben a centriolumok hiányoznak /DYER, 1976/.

A centriolum /MOC, SPO/ és a mitotikus orsó alkotják a mitotikus apparátust. A mitotikus orsó mikrotubulusokból áll. MAZIA és DAN /1952/ bonyolult módszerekkel izo-

lálták a mitotikus apparátust és biokémiai analizisét elvégezve azt találták, hogy az 90 % fehérjét, 5-6 % RNS-t, ezenkívül poliszaharidokat és lipideket tartalmaz.

A mikrotubulus két, nem azonos tubulin alegységből épül fel.

Az orsó-mikrotubulusok két különböző helyen erednek: a centriolum környékén a magmembránon kívül /poláris tubulusok/ és a kinetochorokon, amelyek minden kromoszóma centromerális részén a mikrotubulusok kapcsolódási helyei /kromoszóma tubulusok/. Először a poláris tubulusok alakulnak ki és kezdenek növekedni a profázis folyamán, majd a magmembrán lebomlásakor a kinetochor hozzáférhetővé válik a szabad citoplazmatikus tubulin számára, lehetővé téve a kromoszómális tubulusok felépülését /WATSON, 1980/. A magorsó által meghatározott anafázisos kromoszóman mozgások pontos működési mechanizmusa ma még nem ismert. A különböző magyarázatok, hipotézisek ismeretése vagy értékelése túlnőne a dolgozat keretein, ezért ezzel nem foglalkozom.

2.3. A mitózis gátlása

A kémiai anyagok a mitózissra leggyakrabban blokkoló hatást fejtenek ki. A mitózist gátló anyagokat "mitózis-mérgeknek" nevezzük /BIRSELE, 1958/. A gátló hatás ered-

ményeként sajátos kronoszóma-konfigurációk jöhetnek létre, vagy poliploidia alakulhat ki. A "mitózis-mérgek" tanulmányozásával lehetőség nyílik egyes mutagének, illetve bizonyos anyagok rákellenes hatásának a felfedezésére, valamint megismerhetjük a gátló-hatások alapvető mechanizmusát. A hatásmechanizmus molekuláris alapjainak felderítéséhez segítségül szolgálhatnak a különböző citokémiai technikák és autoradiográfias módszerek.

A mitózis-mérgeket osztályozhatjuk hatásuk és hatásmechanizmusuk alapján. Az anyag különböző intenzitással gátolhatja a mitózis egyes fázisait, vagy a mitózis valamennyi fázisát, érinthet egy vagy több mitotikus mechanizmust /DE ROBERTIS, 1974/.

Néhány hatóanyag pl. a kolhicin, - az őszi kikerics alkaloidja - valamint kolhicin származékok hatásmechanizmusát hosszú évtizedeken keresztül tanulmányozták. BIGSTI és DUSTIN /1954/ megállapították, hogy a kolhicin megállítja a metafázist. Hatása annyira jellemző és specifikus a mitózisban, hogy az irodalomban erre a jelenségre bevezették az un. C-mitózis, kolhicin mitózis elnevezést /LEVAN, 1938/.

Már BIGSTI és DUSTIN /1954/ felhívta a figyelmet a magorsófonalak és a kolhicin kapcsolatára. A C-mitózis kialakulása az osztódási magorsó károsodására vezethető vissza, amely a kolhicin hatására történik /BIGSTI és

DUSTIN, 1954; BIESELE, 1958; MAZIA, 1961; KIHIMAN, 1967; BRINKLEY és STUBBLEFIELD, 1970/.

A kolhicinen kívül a kolcemid fejt ki legmarkánsabb hatást a mitózisra /PICKETT-HEAPS, 1967; STUBBLEFIELD és BRINKLEY, 1966; BRINKLEY et al., 1967/. A kolhicin széles koncentráció-sorozata a reakciók sokféle változatát idézi elő, az orsó orientációjának a változásától egészen a C-mitózisig és a kettő között számos változat fordulhat elő. A kolhicin hatásának gyakran poliploidia lehet az eredménye. Az osztódásinagorsó teljes inaktivációja következtében a kettévált kromoszómák nem tudnak mozogni, és így együtt maradnak egyetlen sejtben.

SHELANSKI és TAYLOR /1967/ felfedeztek egy proteint, amelyhez szelektíve kapcsolódik a kolhicin. Ez a protein, a tubulin /BORISY és TAYLOR/ ¹⁹⁶⁷ 6S szedimentációs állandóval rendelkezik és a mikrotubulusok alapelve. A kolhicin valószínű hatásmechanizmusa a mikrotubulus polimerizációjának gátlásában nyilvánul meg, mivel a protein alegységek aktív helyéhez kötődik /TAYLOR, 1965, BORISY, 1967; BORISY and TAYLOR, 1967/.

BRINKLEY és munkatársai /1967/, BRINKLEY és STUBBLEFIELD /1970/ a kolcemid gátlásának ultrastrukturális alapjait in vitro tanulmányozták kinaei hőrösög sejtekben. Vizsgálataik arra utalnak, hogy az a legkisebb kolcemid koncentráció /0,06 $\mu\text{g/ml}$ /, amely elegendő a mitózis blokk-

lásához, nem gátolta teljesen a kromoszonális mikrotubulusok kialakulását, viszont gátolta a centriolumok pólusokra vándorlását. A magmembrán eltűnése után a kromoszómák a centriolum köré vándoroltak. Amíg a kolcemid kezelés tartott /18 óra/ a mikrotubulusok csak az egyik, a centriolumhoz közelebb eső kinetochoron képződnek. A másik kinetochor - habár strukturálisan normális volt - inaktív maradt, nem kapcsolódott hozzá mikrotubulus. A kromoszómák gyűrű alakba rendeződtek, mikrotubulusaik a belső kinetochortól a centriolumokig húzódtak.

A kolcemid eltávolítása után a centriolumpárok elkezdtek vándorolni az ellentétes pólusok felé és így két-pólusu orsó keletkezett és a kromoszómák metafázisos lemezt alkottak. Így a kolcemid nem állította meg a sejtosztódást a metafázisban, mint ahogy ezt korábban általánosan leírták, hanem csupán a centriolumpárok pólusokra történő vándorlását akadályozta meg a prometáfázisban, mivel a pólusok felé történő mozgás valószínűleg mikrotubulusokat igényel. Ugy tűnik, hogy a szelektív gátlás az inhibitor koncentrációjától függ. Így magasabb koncentrációban alkalmazva a kolcemidet /0,3 μ g/ml/, a hőcsög sejtekben nem található mikrotubulus. A 0,06 μ g/ml-es kolcemid koncentráció differenciáltan blokkolja azokat a mikrotubulusokat, amelyek a centriolumok vándorlásához szükségesek.



Ismeretes néhány gáz /xenon, argon, metán, hidrogén, dinitrogén-oxid/, melyek a kolhicinhez hasonló hatást fejtenek ki a mitózis folyamatára. Ezen gázok hatásmechanizmusa eddig még ismeretlen. A dinitrogén-oxid atmoszférikus nyomáson borsó csíranövényekben C-mitózist eredményezett /ÖSTERGREN, 1944/, hagyományosan viszont nagyobb nyomást kellett alkalmazni ahhoz, hogy hasonló eredményhez jussanak /FERGUSON és munkatársai, 1950/. 1968-ban RAO emlős sejteket /HeLa/ kezelt dinitrogén-oxiddal és megállapította, hogy a dinitrogén-oxid metafázisra blokkoló hatása függ a nyomástól és reverzibilis. 2,72 atm. alatti nyomás a fenti sejtekre hatástalan, 2,72 - 4,42 atm. nyomás nem okozott teljes gátlást. Teljes metafázis blokkot 5,1 - 5,4 atm. nyomással lehetett létrehozni és ez reverzibilis volt. A reverzibilitás mértéke függ a kezelés időtartamától és a nyomástól.

A kolhicin és kolhicin-származékokhoz hasonlóan a dinitrogén-oxiddal is létre lehet hozni poliploid és aneuploid állapotot /ÖSTERGREN, 1954; NYGREN, 1955; ÖSTERGREN, 1957; KIHARA és TSUNEWAKI, 1960; TSUNEWAKI, 1962; DVORAK, HARVEY és COUIMAN, 1973/.

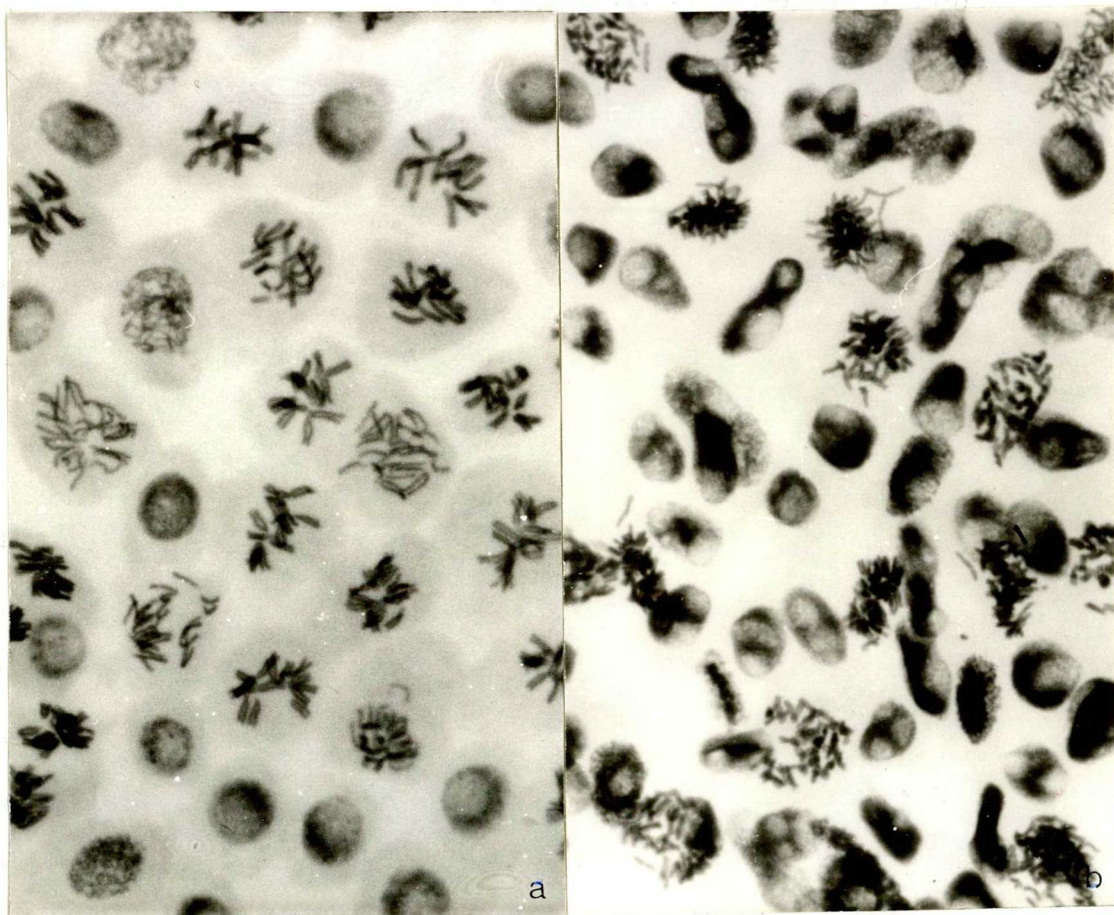
A dinitrogén-oxid hatását a mitotikus rendszerre 1973-ban BRINKLEY és RAO vizsgálták. HeLa sejtekben a mitózist a gáz 6 atm. nyomáson gátolta. A fénymikroszkópos vizsgálatok alapján tipikus kolhicin metafázist

figyeltek meg. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy a dinitrogén-oxid teljesen eltérő módon blokkolja a mitózist, mint a C-mitózist okozó egyéb hatóanyagok /kolhicin, kolhicin származékok, stb./. A dinitrogén-oxiddal kezelt sejtekben jelen voltak mind a poláris mind a kromoszómális mikrotubulusok, a kromoszómák metafázisos lemezbe való rendeződése mégis elmaradt. Kísérleteik eredményeiből arra a következtetésre jutottak, hogy a dinitrogén-oxid a kromoszómák premitotikus mozgásának gátlása révén hat.

3. Anyag és alkalmazott módszerek

3.1. Kísérleti növény és kísérleti berendezés

A dinitrogén-oxid hatása vizsgálataink szerint azonos az egy- és kétszikű növényekben /3. ábra a,b/.

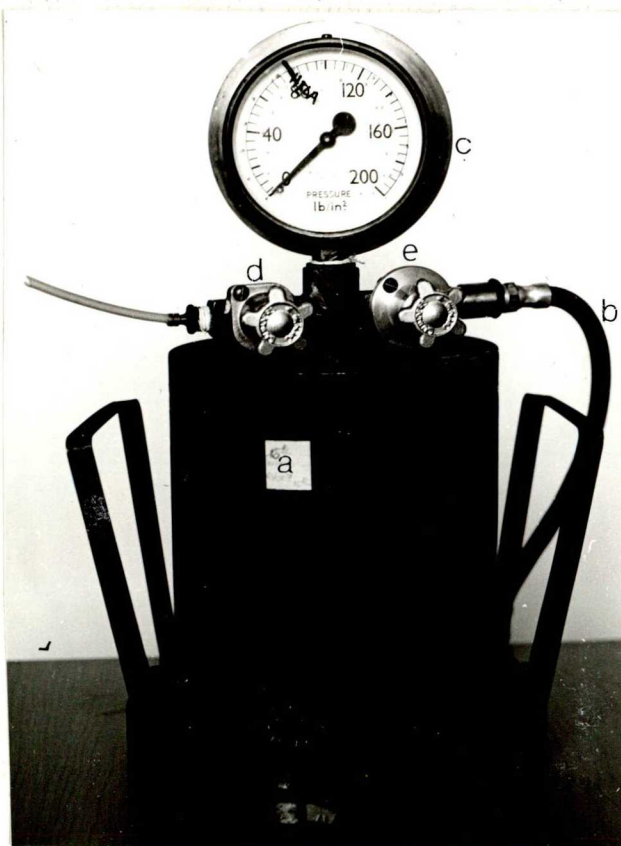


3. ábra. A dinitrogén-oxid metafázist blokkoló hatása a kétszikű lóbab / $2n = 12$; /3a. ábra/ és az egyszikű buza / $2n = 42$; 3b. ábra/ gyökérmerisztémájában.

Kísérleti növényként alacsony kromoszómaszáma $/2n = 14/$ miatt a diploid rozsot választottam, melyből a vizsgálatokhoz szükséges magot a Szegedi Gabonatermesztési Intézet korlátlan mennyiségben bocsájtotta rendelkezésemre.

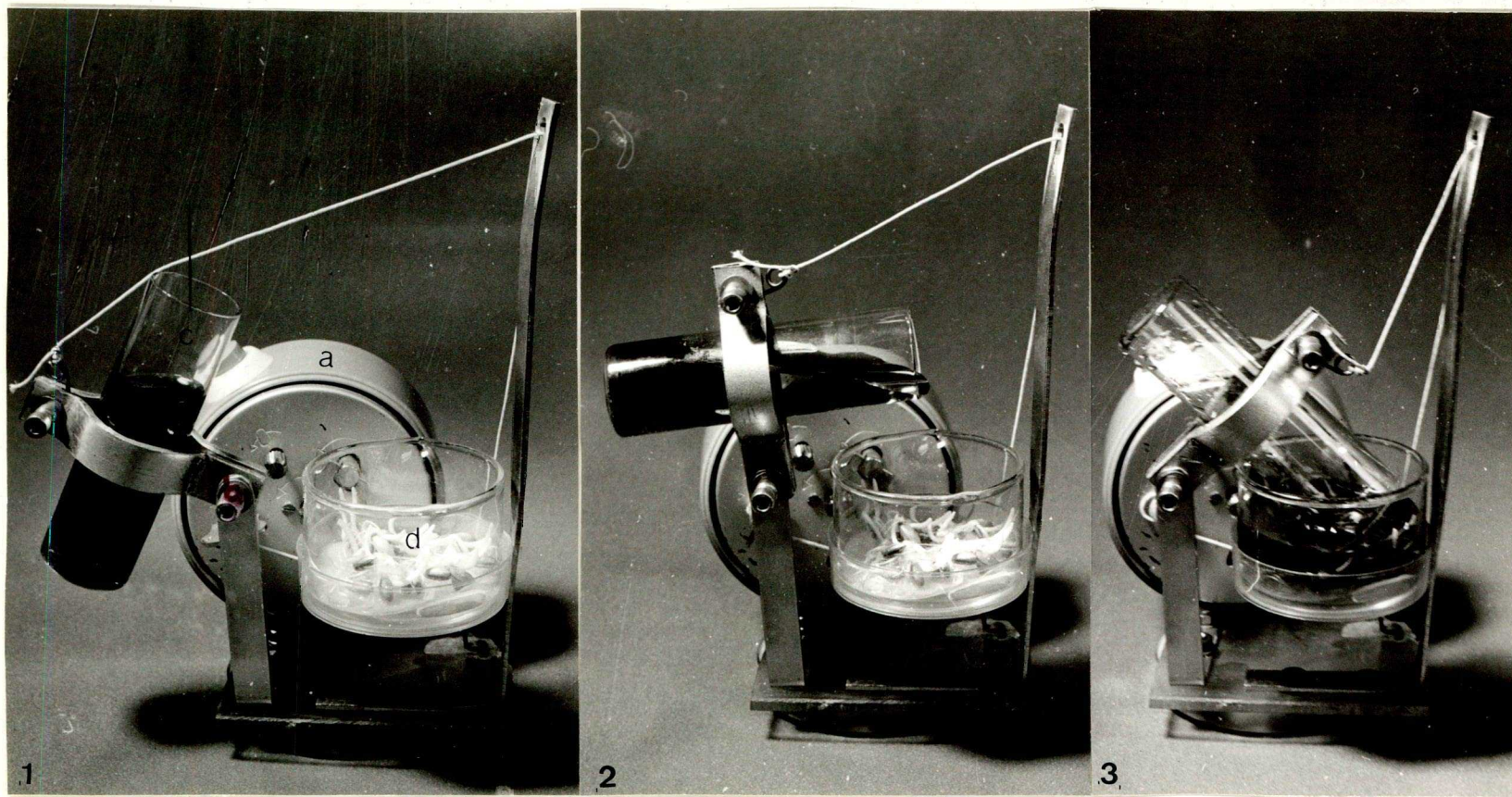
A citológiai vizsgálatokhoz szükséges preparátumokat a csiranövények osztódó gyökérmerisztémáiból készítettem. A csiráztatás 20°C -on petricsészében, nedves szűrőpapíron, termosztátban történt 20-30 óráig. Kiválasztottam azokat a csiranövényeket, amelyek három - 6-10 mm-es - gyökérrel rendelkeztek és ezeket használtam kísérleteimhez. A dinitrogén-oxidos kezelést a 4. ábrán látható berendezésben végeztem, amely a Cambridge-i egyetem műhelyében készült.

A kísérlethez kiválasztott csiranövényeket petricsészében nedves szűrőpapírra gyűjtöttem össze és belehelyeztem a hengerbe /a/, ahol különböző ideig eltérő koncentrációjú dinitrogén-oxiddal kezeltem azokat.



4. ábra. A dinitrogén-oxid kezeléshez használt berendezés
A kezelőhengerbe /a/ helyezett csiranövényekhez
a palack /b/ csatlakozó vezetékén keresztül jut-
tattam a dinitrogén-oxidot. Az acéltartályban /c/
nyomásmérő jelezte a bejutott gáz nyomását. Mind-
két szelep /d,e/ elzárásával biztosítottam a hen-
gerben az állandó nyomást. A kezelés végétével
a szelep /d/ lassu nyitásával csökkentettem a
nyomást 0 atm-ra.

A dinitrogén-oxid hatásának vizsgálatánál szükségesnek látszott annak eldöntése, hogy a gáz gátolja-e a makromolekula /DNS/ szintézist. Erre a célra a legmegfelelőbbnek H^3 timidinnel történő izotópos vizsgálat kínálkozott. A radioaktív izotópnak a kísérleti anyaghoz való juttatására egy olyan szerkezetre volt szükség, amely zárt térben /kísérleti edény/, nyomás alatt, meghatározott időpontban adagolja a radioaktív izotópot. E feladatokat az 5. ábrán látható szerkezet megfelelően látta el. A szerkezet alapeleme egy olyan ébresztőóra /5. ábra a. jelzés/, amelyben az ébresztő szerkezet tengelye /5. ábra b. jelzés/ az óra csörgésekor a felhúzással ellentétes irányban visszaforgog. E tengelyre erősített zsinór áttételeken keresztül egy fiolát /5. ábra c. jelzés/ mozgat. Az ébresztőszerkezet felhúzásakor a zsinórzat teljes hosszúságu, így a fiola függőleges alapállásban áll /5. ábra 1. kép/. Ebben az állapotban töltjük a fiolába a radioaktív izotópot, a csiranövényeket pedig szűrőpapírra az üvegcsészébe /5. ábra d. jelzés/ helyezzük. Az ébresztőszerkezet beállítása után a készüléket kezelőhengerbe rakjuk. Az ébresztőszerkezet megfelelő időpontra történő beállítása esetén az óra a kívánt idő eltelte után csörögni kezd, miközben a felhúzó tengelyre fokozatosan felcsavarodik a zsinór. A zsinór rövidülése mozgásba hozza az izotópot tartalmazó fiolát /5. ábra 2. kép/ és annak tartalmát a csiranövényekre önti /5. ábra 3. kép/.



5. ábra. Nyomás alatt történő izotópos kezelésre
szolgáló berendezés és működésének egyes fázisai

3.2. Gyökércsucs-preparátum készítése

A növények fixálását abszolút alkohol és jégecet 3:1 arányú keverékében /SÁRKÁNY-SZALAI, 1966/ szobahőmérsékleten, 1/2 - 12 óráig végeztém. A fixált csiranövényeket felhasználásig 70 %-os alkoholban tároltam.

A fixált csiranövények 6-10 mm-es gyökereit levágtam, majd 16-18 percig hidrolizáltan ln sósavban 60 C⁰-on, majd 40-60 percig Schiff-féle aldehid reagensben - Feulgen dörzsemódszer szerint - /SÁRKÁNY és SZALAI, 1966/ festettem.

A viszonylag kemény és vastag növényi-sejttel megnehezíti a preparátumok készítését, ezért a gyökereket szétnyomás előtt desztilláltvizes, nem pufferolt enzimoldatban - amely 2 % pektinázt /FLUKA, SCHUCHARDT/ és 2 % cellulázt /ONOZUKA R-10, YAKULT/ tartalmazott - kezeltém szobahőmérsékleten. Tíz perc múlva a megpuhult gyökerekről az enzimoldatot abszolút alkoholra cseréltem. A gyökereket 1-2 másodpercre tömény ecetsavba, majd tárgylemezre helyeztem. A tárgylemezen a gyökerek 2-3 mm-es csucsi részét levágtam, majd 45 %-os ecetsavat cseppentve rájuk, azokat lefedtem és szétnyomtam. A megfelelő minőségű preparátumokat szárazjég módszerrel /COOPER and FAIRCHILD, 1953/ állandósítottam. Fagyasztás után a preparátumokról a fedőlemezt eltávolítva, azokat alkoholsorozatban víztelenítettem, majd xilolba márttam a lemezeket. Tiszta fedőlemezre DePex-et /G.T.Gurr/ cseppentettem és ezzel a preparátumokat

lefedten. Az így állandósított preparátumok színváltozás és szennyeződés nélkül tárolhatók. Azokat a Schiff-féle reagenssel festett preparátumokat, amelyeket részletes citológiai elemzésre használtak, 2 %-os Giemsa festék-oldattal utánfestetten, amely 6,8 pH-jú Sörensen pufferből és Giemsa /FLUKA/ törzsoldatból készül. Az így festett preparátumokban a kromoszómák és a sejtmagok sötét-kék színűek, a citoplazma pedig halványkék. Ezáltal lehetőség nyílik az egy sejthez tartozó kromoszómaszám, illetve mikronukleusz-szám megállapítására.

A vizsgálatokat, illetve a szükséges mikrofotókat ZEISS NU-2 mikroszkópon készítetten, ORWO 15 Din érzékenységgű, fekete-fehér negatív anyagra.

3.3. Autoradiográfia

Annak eldöntésére, hogy a gyökércsucsban a kezelés alatt történik-e DNS szintézis, autoradiográfias módszert alkalmaztam. A jelölés $10 \mu\text{Ci/ml } ^3\text{HTdR}$ /Spec. akt. 22,02 Ci/mM; UVVVR, Prága/ felhasználásával történt. Az előzőekben leírt módon /Feulgen dörzsmódszer/ preparátumot készítetten. A lemezeket 5 %-os hideg triklórecetsavban átmostam. 25 ml Ilford K5 emulziót 25 ml desztillált vízzel hígítottam, majd 50 °C-os vízfürdőben melegítettem. A lemezeket az emulzióba mártottam, majd egy légmentesen záró

sötét dobozban, hidegszobába /4 C°/ helyeztem. Két hét exponálás után a lemezeket Kodak D76 oldatban hivatam elő, 20 C°-on 4 percig majd 25 %-os nátriumtioszulfátban fixáltam. Folyóvízes mosás után a preparátumokat desztillált vízben leöblítettem és megszárítottam.

3.4. Elektronmikroszkópos preparátumok készítése

Az osztódó gyökércsucsokat 6,8 pH-ju, 2,5 %-os glutaraldehyd-nátriumkakodilát pufferben és 2 %-os osmiumtetroxidban /OsO₄/ 4 C°-on, 2-2 óráig fixáltam. A preparátumok víztelenítése alkoholsorozaton keresztül acetonban történt. A gyökereket 2 órán keresztül Spurr's Low-Viscosity beágyazó gyanta és aceton 1:1 arányú keverékében, majd 14 óráig beágyazó gyantában állandó keverés mellett infiltráltam, amelyet 70 C°-on 8 órás polimerizáció követett /SPURR, 1974/. A gyökérmetszeteket SORVAL ultramikrotómmal, üvegkéssel készítettem, azokat FORMVAR hárttyával fedett rostéllyal vettem fel, majd 2 %-os uranilacetáttal és ólomcitráttal festettem. Vizsgálat előtt a metszetekre ZEISS vákumgőzölővel vékony szénréteget vittem fel. Az így készült preparátumokat 80 KeV-on JEOL 100B elektronmikroszkóppal vizsgáltam.

3.5. Az adatok matematikai értékelése

A kapott eredményeket táblázatban rögzítetten. Az adatok matematikai értékelését az alábbi összefüggések alapján végeztük. /SVÁB, 1973/.

Az aritmetikai átlag képlete:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

ahol n az adatok száma.

A megfigyelési adatok szórásnégyzetének képlete:

$$s^2 = \frac{SQ}{n-1}$$

ahol az eltérésnégyzetek /SQ/ összege:

$$SQ = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

A megfigyelési adatok szórásának képlete:

$$s = \sqrt{\frac{SQ}{n-1}} = \sqrt{s^2}$$

Az aritmetikai átlag szórásának kiszámítása:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

A szórásnégyzetek homogenitásvizsgálata

Több adatsor szórásának összehasonlításakor alkalmazott Bartlett próbával eldönthetjük, hogy az adatsorok szórásai egyöntetűnek tekinthetők-e, vagy a szórások között szignifikáns különbség van.

Az adatsorok X^2 értékeit az alábbi képlettel számítottn ki:

$$X^2 = \frac{FGs^2}{s_e^2} = \frac{SQ}{s_e^2},$$

ahol

$$s_e^2 = \frac{\sum SQ}{FG}$$

$$FG = n-1$$

Szignifikanciavizsgálat

Közös X^2 próbánál alkalmazott c érték kiszámítása a következő képlettel történik:

$$a/ \quad c = 1 + \frac{1}{3/cs-1/} \left(\sum \frac{1}{FG} - \frac{1}{\sum FG} \right),$$

ahol "cs" a csoportok száma.

b/ A közös X^2 kiszámítása és a homogenitásvizsgálat:

$$X^2 = \frac{2.3026}{c} \left(\sum FG / \log s^2 / - \sum [FG / \log s^2 /] \right),$$

ahol $2,3026 = \ln 10 =$ a 10 alapu logaritmus átszámítási konstansa "e" alapu logaritmusra.

Amennyiben a kiszámított X^2 érték kisebb, mint a táblázatban $FG=cs-1$ szabadságfokra és $P=1\%$ -ra megadott táblázati X^2 érték, akkor a csoportok szórásai között nincs szignifikáns különbség.

Az aritmetikai átlagok összehasonlítása.

Annak eldöntésére, hogy van-e különbség a kezelések aritmetikai átlagai között, t-próbát végezten.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_d},$$

ahol

$$s_d = \sqrt{MQ \frac{2}{n}}$$

$$MQ = \frac{\sum SQ}{FG}$$

$$FG = \sum n - cs$$

Amennyiben a számított t érték nagyobb, mint $F_{\alpha} = n$ -es szabadságra megadott $t_{1\%}$ táblázati érték, akkor az összehasonlított két aritmetikai átlag között szignifikáns különbség van.

A legkisebb szignifikáns különbség:

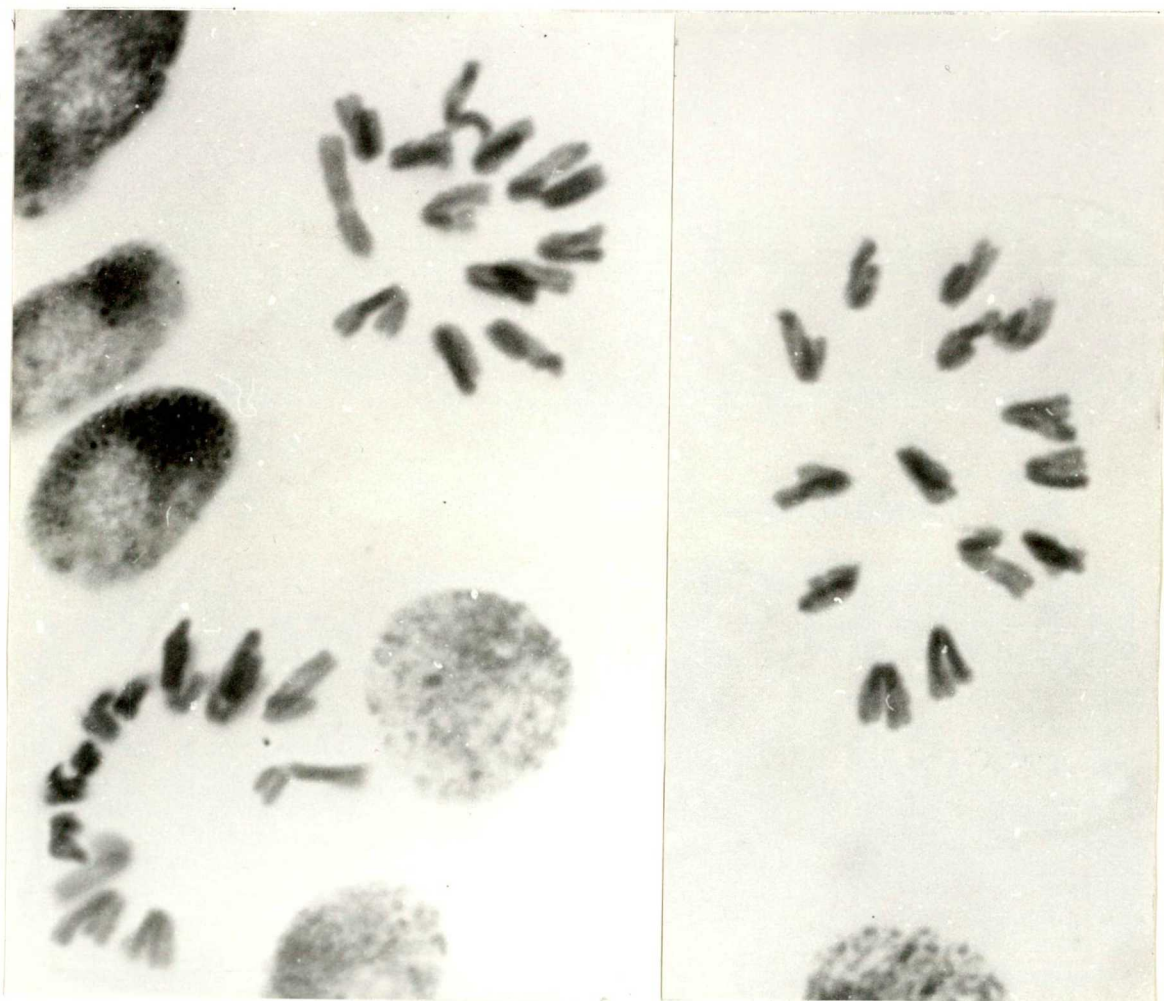
$$S_{D_{1\%}} = t_{1\%} s_d$$

4. Eredmények

4.1. Nyomáskísérlet

Az első megválaszolandó kérdés az volt, hogy azonos időtartamu kezelés esetén milyen dinitrogén-oxid nyomással /koncentrációval/ érhető el mitózisgátlás. Választ kerestem arra, hogy milyen mértékben függ a gyökérmerisztemasejtek osztódása a dinitrogén-oxid koncentrációtól. A csiranövényeket 1-12 atm. nyomáson dinitrogén-oxiddal 2 óráig kezeltem. A kísérleteket háromszor minden nyomásértéken megismételtem, azaz minden egyes kísérletben 3 x 3 db csiranövény gyökércsucsának 2000 sejtjét vizsgáltam. A nyomáskísérlet alábbi eredményeit tehát 234 000 sejt elemzése alapján kaptam. Megállapítottam, hogy a dinitrogén-oxid koncentráció változtatásával a gáz mitózisgátló hatásának mértéke a nyomástól függően változik. A vizsgált nyomásintervallumon belül kiválasztottam azt az "optimális" nyomásértéket, amely mellett 2 óra alatt a legnagyobb mitotikus aktivitás érhető el. A mitotikus aktivitás mértéke, azaz a mitotikus és interfázisos sejtek aránya - a sejtciklus hosszát állandónak tekintve - a mitózisgátlás hatásosságától függ. Minél hatékonyabb a gátlás, annál több mitotikus sejt található egyidejűleg a csiranövényekben.

A mitózisgátlás abban nyilvánul meg, hogy a sejtek mitózisa csak metafázisig jut el. A kromoszómák jellegzetes gyűrű alakba rendeződnek /6. ábra/ és a metafázist nem követi ana- és telofázis.



6. ábra. Az N_2O hatására létrejött "gyűrűs" metafázisok,
6 atm. 2 óra kezelésnél /nagyítás: 1000 x/

A kísérleti adatok összesítését az 1. táblázat tartalmazza. A mitotikus aktivitáson túl, minden nyomáson meghatároztam a pro-, meta- és anafázisos sejtek arányát. A kísérleti adatok matematikai feldolgozását a 2. táblázatban közölt példa szerint végeztem. A szórások homogenitásvizsgálatára a Bartlett próbát használtam, mellyel megállapítottam, hogy a szórások nem különböznek szignifikánsan egymástól. Ennek alapján elmondható, hogy a kísérleti rendszer nem terhelt olyan hibával, amely a kísérleti adatok megbízhatóságát befolyásolja. A középértékek összehasonlítása F-próbával azt bizonyította, hogy a különböző nyomáson kezelt csiranövények átlagos mitotikus aktivitása között P 1%-os szinten szignifikáns különbség van. A t -próbával ellenőriztem, hogy mely kezelések átlagai között van szignifikáns különbség, és kiszámítottam a legkisebb szignifikáns különbség értékét is. Ez kísérleteimben 1,87 %-nak bizonyult. Tehát mindazon kezelésekre, amelyekben a mitotikus aktivitás több mint 1,87 %-al eltér a kontroll szintjétől, vagy két kezelésben mért mitotikus aktivitás különbség több, mint 1,87 %, az a dinitrogén-oxid hatásának tudható be. A szignifikancia értékeit a 2. táblázat mutatja, amely alapján megállapítható, hogy szignifikáns különbség van 1-3; 4-5; 5-6; 6-7; 7-8; 8-10; 10-12 atmoszférás kezelésekre között, nincs viszont szignifikáns különbség a kontroll és az 1 atm-ás valamint

1. táblázat NYOMÁSKISÉRLET

A pro-, meta- és anafázis, valamint a mitotikus aktivitások átlagértékei a melléklet I. számú táblázatában található alapadatok alapján. +

N_2O nyomás /atm/ Mitózis	K	1 atm.	2 atm.	3 atm.	4 atm.	5 atm.	6 atm.	7. atm.	8 atm.	9 atm.	10 atm.	11 atm.	12 atm.
Profázis	3,32	3,79	4,40	5,06	5,28	4,19	2,93	2,74	2,16	1,97	1,32	2,17	5,58
Metafázis	1,09	1,24	0,96	1,84	2,50	6,18	11,35	7,34	4,98	3,61	2,39	3,16	2,40
Anafázis	1,48	0,84	0,98	1,07	0,92	0,89	0,23	0,24	0,15	0,06	0,12	0,11	0,86
Σ Mitózis	5,89	5,87	6,34	7,97	8,70	11,26	14,51	10,32	7,29	5,64	3,83	5,44	8,84

+ A dinitrogén-oxidos kezelés időtartama minden nyomáson 2 óra.



2. táblázat

NYOMÁSKISÉRLET

Alapadatok feldolgozása

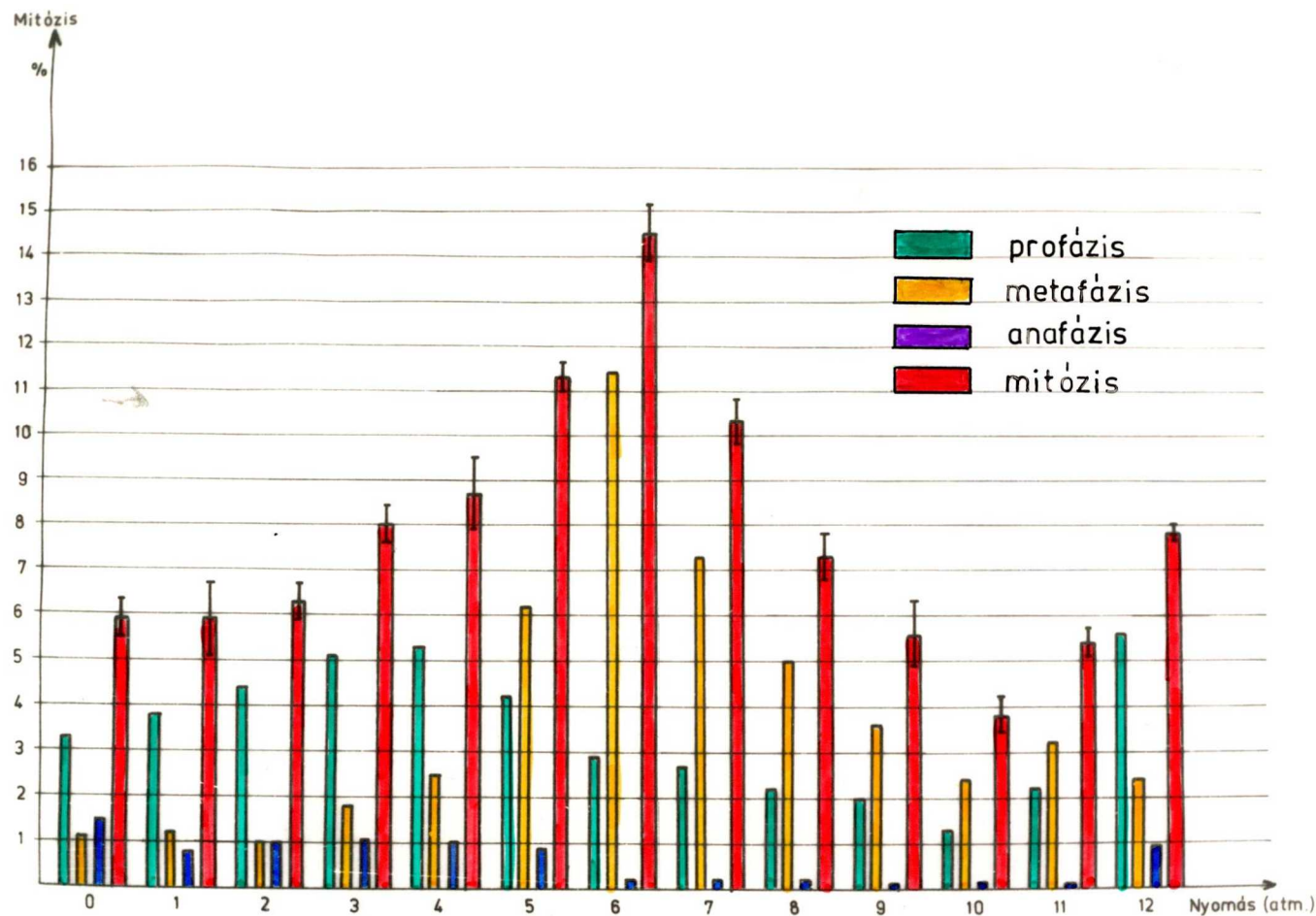
	Kontroll	1 atm.	2 atm.	3 atm.	4 atm.	5 atm.	6 atm.	7 atm.	8 atm.	9 atm.	10 atm.	11 atm.	12 atm.
ΣX	53,05	52,85	57,05	71,75	78,25	101,33	130,55	92,84	65,60	50,75	34,40	49,00	79,60
$\bar{X}$	5,89	5,87	6,34	7,97	8,70	11,26	14,51	10,32	7,29	5,64	3,83	5,44	8,84
X^2	324,79	355,67	374,78	582,69	725,89	1148,92	1917,14	975,00	496,96	309,36	142,24	272,29	706,90
SQ	12,09	45,33	13,15	10,68	45,55	8,06	23,44	17,31	18,80	23,19	10,75	5,51	2,88
s^2	1,51	5,67	1,64	1,34	5,69	1,01	2,93	2,16	2,36	2,90	1,34	0,69	0,36
s	1,23	2,38	1,28	1,16	2,39	1,00	1,71	1,47	1,53	1,70	1,16	0,83	0,60
$s_{\bar{X}}$	0,41	0,79	0,43	0,39	0,80	0,34	0,57	0,49	0,51	0,57	0,39	0,28	0,20

s_d	FG	t / tábl. érték/ $P = 1\%$	$t_{1;2}$	$t_{2;3}$	$t_{3;4}$	$t_{4;5}$	$t_{5;6}$	$t_{6;7}$	$t_{7;8}$	$t_{8;9}$	$t_{9;10}$	$t_{10;11}$	$t_{11;12}$	$t_{K;1}$
0,71	104	2,63	0,66	2,30	1,03	3,60	4,58	5,90	4,27	2,32	2,55	2,27	4,79	0,03

A melléklet I. számú táblázatában összefoglalt alapadatok /mitótikus aktivitások/ matematikai feldolgozása.

a kontroll és a 2. atm-ás, a 2-3; 3-4; 8-9; 10-11 atm-ás kezelések eredményeképpen kapott mitotikus aktivitások között. A mitotikus aktivitás - ezen belül a pro-, meta- és anafázisos sejtek arányának - grafikus ábrázolása a 7. ábrán látható, melyen az egyes mitózis szakaszok változásának dinamikája jól nyomon követhető.

A diagramból egyértelműen kitűnik, hogy a koncentráció változásával megváltozik a mitózisban levő sejtek aránya a kontroll sejtek mitotikus aktivitásához képest. 6 atm-ig nő a mitotikus sejtek száma, majd /9 atm-nál a kontroll szintjére/ csökken, 10 atm-nál kevesebb sejt van mitózisban, mint a kontroll sejt gyökércsúcsában, 12 atm-nál újból emelkedés figyelhető meg. A mitózis fázisainak eloszlását /pro-, meta- és anafázis/ elemezve azt állapíthatjuk meg, hogy a gáznyomás változtatásakor a legszembetűnőbb változás a metafázisos számában következik be. 6 atm-nál csaknem 12-szeresére nő a metafázisos sejtek száma a kontrollhoz képest. Figyelemmel kísérve az anafázisos alakulását, azt tapasztaltam, hogy az 1-12 atm. nyomás intervallum alatt az anafázisosok száma nem éri el a kontroll szintet, hanem jóval alatta marad. A nyomáskísérletből megállapítottam, hogy a legmagasabb mitotikus érték a vizsgált nyomások közül 6 atm. nyomáson érhető el. Ekkor a sejtben a gázkoncentráció 270 mM. A továbbiakban felmerült az a kérdés, hogy a dinitrogén-oxid metafázisblokkoló hatása függ-e és ha igen, milyen mértékben, a kezelési idő hosszától.



7. ábra. A gyökérmerisztéma sejtek pro-, meta- és anafázisos, valamint mitotikus aktivitásának változása a nyomás függvényében. A kezelési idő: 2 óra

4.2. Időkísérlet

A csiranövényeket 6 atm nyomáson kezeltem és óránként, ill. kétóránként 1-34 óráig fixáltam 2-2 csiranövényt. A mitótikus, pro-, meta- és anafázisos sejtek százalékos arányát 4-4 ezer sejtből számoltam. A kísérletet háromszor ismételttem meg, így adataimat összesen 240 000 sejt vizsgálatából nyertem. Az adatokat táblázatban rögzítettem /3-4. táblázat/.

Bartlett próbával elvégeztem az adatok szórásnégyzetének homogenitás vizsgálatát. A matematikai értékelés alapján a 20 kísérlet adatainak szórása nem különbözik szignifikánsan egymástól. Az aritmetikai átlagok összehasonlítását F próbával végeztem. Arra voltam kíváncsi, hogy a különböző ideig kezelt csiranövények átlagos mitótikus aktivitása között van-e szignifikáns különbség. Az F-próba alapján megállapítható, hogy a különböző kezelések átlagai között igazolható szignifikáns különbség van. A t-próbával részletesen ellenőriztem és összehasonlítottam az egyes kezeléseket és pontosan megállapítottam, hogy mely csoportok átlagai között van szignifikáns eltérés. Kiszámítottam a legkisebb szignifikáns eltérést, ami 2,55 %-nak bizonyult. A pro-, meta- és anafázis, valamint a mitótikus aktivitásoknak az időtől való függését oszlopdiagramon ábrázoltam /8. ábra/. Az ábra elemzése alapján megállapíthatjuk, hogy

3. táblázat IDŐKISÉRLET

A pro-, meta- és anafázis, valamint a mitotikus aktivitások átlagértékei a melléklet II. számú táblázatában található alapadatok alapján. ⁺

Idő /óra,perc/ Mitózis	K	1 óra	2 óra	3 óra	4 óra	6 óra	8 óra	10 óra	12 óra	14 óra
Profázis	3,32	3,78	3,17	2,00	4,20	5,40	6,83	4,78	4,01	4,08
Metafázis	1,09	8,10	11,88	15,67	16,57	18,23	21,74	15,83	14,07	12,23
Anafázis	1,48	0,05	0,28	0,08	0,00	0,12	0,03	0,43	0,05	0,04
Σ (Mitózis)	5,89	11,93	15,33	17,95	20,77	23,75	28,57	20,75	18,13	16,32

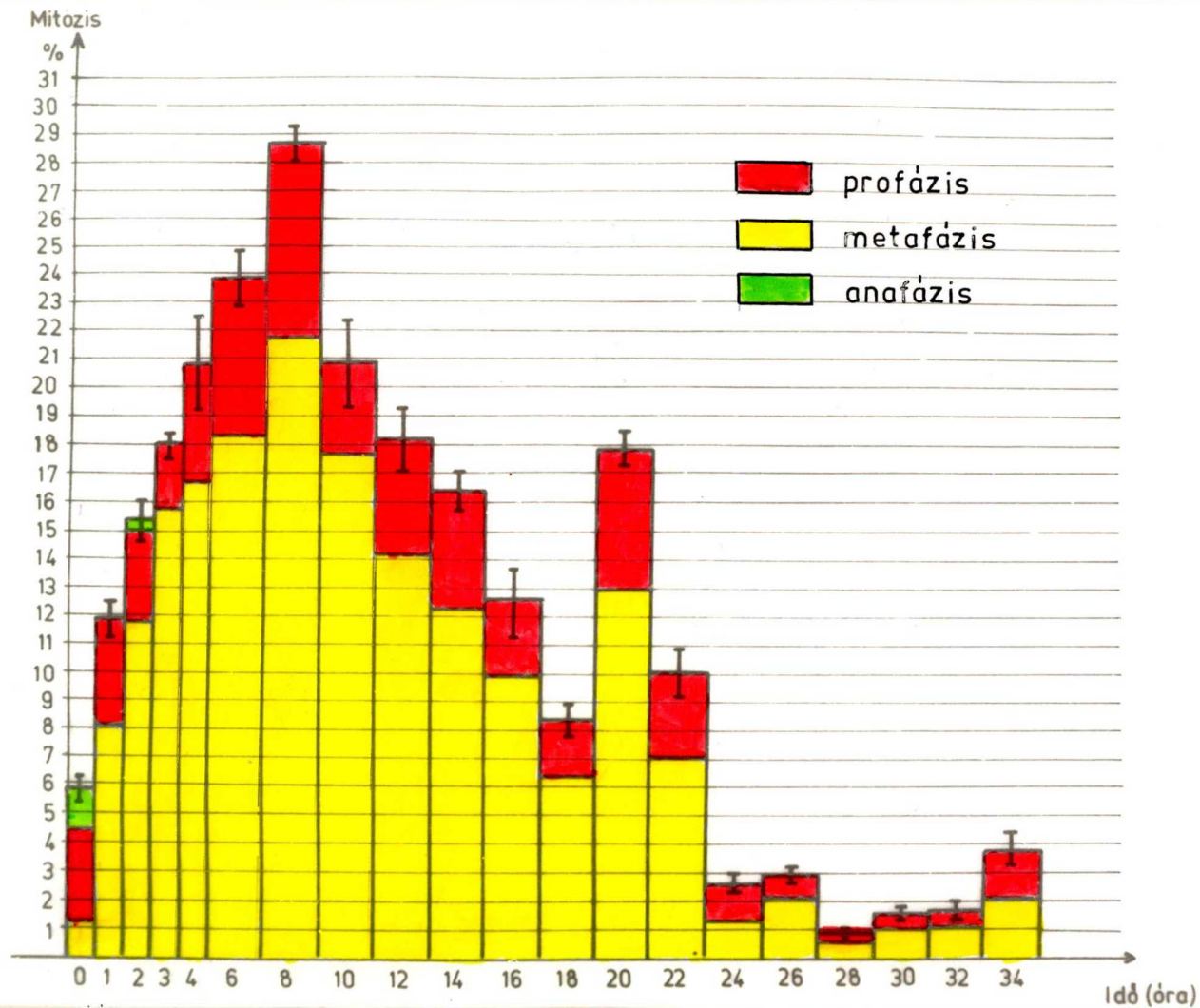
Idő /óra,perc/ Mitózis	16 óra	18 óra	20 óra	22 óra	24 óra	26 óra	28 óra	30 óra	32 óra	34 óra
Profázis	2,55	2,00	4,80	3,03	1,32	0,80	0,28	0,60	0,67	1,72
Metafázis	9,91	6,25	12,97	6,99	1,26	2,08	0,57	1,00	1,05	2,10
Anafázis	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Σ (Mitózis)	12,48	8,25	17,77	10,02	2,58	2,88	0,85	1,60	1,72	3,82

⁺ A dinitrogén-oxidos kezelés 6 atm nyomáson történt.

	K	1 óra	2 óra	3 óra	4 óra	6 óra	8 óra	10 óra	12 óra	14 óra	16 óra	18 óra	20 óra	22 óra	24 óra	26 óra	28 óra	30 óra	32 óra	34 óra
ΣX	53,05	71,60	91,95	107,70	124,60	142,60	171,40	188,80	97,90	74,90	49,50	60,10	15,50	17,30	5,10	9,60	10,32	22,90		
$\bar{X}$	5,89	11,93	15,33	17,95	20,77	23,75	28,57	18,13	16,32	12,48	8,25	17,77	10,02	2,58	2,88	0,85	1,60	1,72	3,82	
ΣX^2	324,79	866,56	1424,71	1937,91	2661,96	3416,11	4906,40	2648,57	1611,33	972,79	416,95	1904,56	622,63	42,72	53,09	4,93	16,84	19,63	97,77	
S_0	12,09	12,13	15,58	4,69	74,43	31,73	10,07	65,19	13,93	37,79	8,57	10,63	20,63	2,67	3,21	0,59	1,48	1,95	10,37	
S^2	1,51	2,02	1,92	0,78	12,41	5,29	1,68	10,87	4,61	6,16	1,43	1,77	3,44	0,44	0,53	0,10	0,25	0,32	1,73	
s	1,23	1,42	1,39	0,88	3,52	2,30	1,30	3,30	2,15	2,48	1,20	1,33	1,85	0,67	0,73	0,31	0,50	0,57	1,31	
$\bar{x}$	0,41	0,63	0,72	0,40	1,58	1,03	0,58	1,47	0,96	0,68	1,12	0,53	0,59	0,83	0,30	0,33	0,14	0,26	0,59	

1,10	100,00	2,63	5,49	3,09	2,38	2,56	2,71	4,38	7,11	2,38	1,65	3,49	3,85	8,65	7,05	6,76	0,27	1,85	0,68	0,11	1,91
g	FG	t / tabl. P = 1 % 6x6x6	K;1h t	1h;2h t	2h;3h t	3h;4h t	4h;6h t	6h;8h t	8h;10h t	10h;12h t	12h;14h t	14h;16h t	16h;18h t	18h;20h t	20h;22h t	22h;24h t	24h;26h t	26h;28h t	28h;30h t	30h;32h t	32h;34h t

A melléklet III. számú táblázatában összegezték az alábbiakat /móltikus aktivitások/ matematikai feladatok.



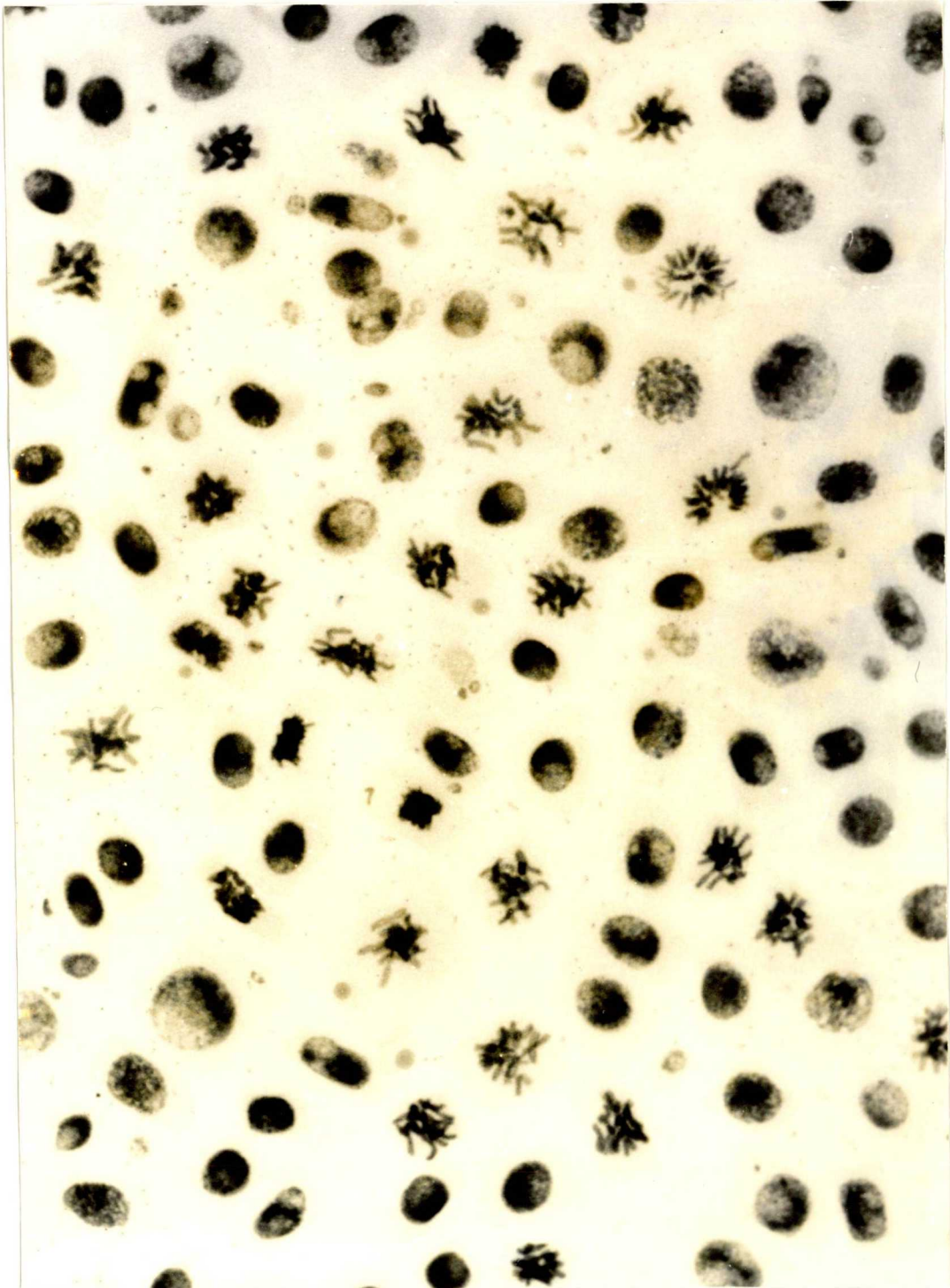
8 ábra. A gyökérmerisztéma sejtek mitotikus aktivitásának változása a kezelési idő függvényében 6 atm - és gázkezelés hatására

a mitótikus aktivitás nagysága függ a kezelési idő hosszától. A mitótikus aktivitás a 6 atm nyomás melletti 8 órás kezelésnél bizonyult a legmagasabbnak /9. ábra/. A 8 óránál hosszabb kezelés fokozatosan csökkenti a mitózisban levő sejtek számát, míg 18 órás kezelésnél éri el a görbe az első minimumot. Szembetűnő, hogy ez a minimum még mindig magasabb a kontrollban megfigyelhetőnél. 20 órás kezelésnél ismét egy éles csucs figyelhető meg a görbén. Ekkor a sejtek többsége tetraploid. Ezt követően a mitótikus aktivitás meredeken csökkenni kezd a 24 órás kezelésig, majd a mitótikus aktivitás mindvégig a kontroll szintje alatt marad.

A mitózis egyes fázisainak a vizsgálata során megállapítottam, hogy 2 órás kezelés után az anafázisok aránya mindvégig 10^{-4} gyakorisági szinten marad, azaz 0-nak tekinthető. A metafázisos sejtek számának változása jól követi a mitótikus aktivitás változását. A 2 és 3 órás kezelés kivételével a profázisos sejtek számának gyakorisági görbéje is hasonló lefutású.

A leghatásosabb, mitózist blokkoló dinitrogén-oxid koncentráció, valamint az optimális kezelési idő ismeretében szükségesnek láttam olyan ellenőrző kísérletek elvégzését, melyek igazolják, hogy valóban a dinitrogén-oxid specifikus hatásáról van szó, nem pedig a kísérleti körülmények /magas





9. ábra. 6 atmoszféra nyomás mellett, 8 órás dinitrogén-oxid kezelés hatása a sejtek osztódására.

Nagyítás: 400 x

nyomás/ okozta változásokról. Ennek érdekében 6 atm nyomáson 8 órás kezeléseket végeztem levegővel, nitrogénnel és oxigénnel. E három kezelés egyikénél sem tapasztaltam a dinitrogén-oxidos kezelések során megfigyeltekhez hasonló citológiai eseményeket. Mindhárom kezelésnél a mitotikus aktivitás a kontroll szintjén, vagy - a szignifikancia határokon belül - a kontroll szintje alatt maradt.

4.3. Visszatérés kísérlet

Annak eldöntésére, hogy dinitrogén-oxid kezelés mellett a mitózis reverzibilis folyamat-e, az alábbi kísérletet végeztem el. A csiranövényeket 6 atm nyomáson 8 óra hosszánig kezelték, majd a dinitrogén-oxid hatásának feloldása után 1/2, illetve 1 órás időközökben fixáltak azokat. Az utolsó mintát a gázkezelés megszüntetése utáni 21. órában vették. A kísérletet háromszor megismételték. Mindhárom ismételt mintában a mitotikus, valamint a pro-, meta- és anafázisos sejtek százalékos arányát 4000-4000 sejtől számolták ki. Az összesen 300.000 sejt vizsgálatából nyert adatokat az 5., 6. táblázatban rögzítették.

Elvégeztem az adatok matematikai vizsgálatát, megállapítottam, hogy a szórások nem szignifikánsak, az átlagértékek homogénnek tekinthetők. A legkisebb szignifikáns kü-

A pro-, meta- és anafázis, valamint a mitotikus aktivitások értékeit az alábbi táblázatban lévő adatok alapján. +

Idő /óra,perc/	K	0 óra	0 óra	1 óra	1 óra	2 óra	3 óra	4 óra	5 óra	6 óra	7 óra	8 óra	Σ Mitózis
Profázis	3,32	6,84	5,99	7,34	6,48	4,90	3,68	5,17	3,13	2,18	1,57		
Metafázis	1,09	21,70	9,51	2,22	1,53	2,12	1,32	1,69	1,07	0,72	0,53		
Anafázis	1,48	0,03	7,28	8,60	4,13	3,00	2,30	1,86	1,30	1,03	0,22		
Σ Mitózis	5,89	28,57	22,78	14,67	12,97	11,60	10,17	7,30	8,72	5,50	3,93	2,32	

Idő /óra,perc/	Mitózis	9 óra	10 óra	11 óra	12 óra	13 óra	14 óra	15 óra	16 óra	17 óra	18 óra	19 óra	20 óra	21 óra	Σ Mitózis
Profázis	2,28	7,10	2,46	4,15	3,02	4,63	10,22	4,11	4,33	5,07	3,09	7,43	5,87		
Metafázis	0,60	1,90	1,02	0,93	0,88	0,87	2,83	0,97	0,83	1,33	0,38	1,50	1,28		
Anafázis	0,59	2,47	0,92	1,05	0,40	0,78	2,35	0,72	0,67	1,63	0,38	1,29	1,43		
Σ Mitózis	3,47	11,47	4,40	6,13	4,30	6,28	15,40	5,80	5,83	8,03	3,85	10,22	8,58		

8 óra hosszas dinitrogen-oxid kezelés 6 óra nyomon, mintavétel a gáztöltőket követően különböző időpontokban.

6. táblázat VISSZATÉRÉS KISÉRLET

	K	0 óra 00 perc	0 óra 30 perc	1 óra 00 perc	1 óra 30 perc	2 óra 00 perc	3 óra 00 perc	4 óra 00 perc	5 óra 00 perc	6 óra 00 perc	7 óra 00 perc	8 óra 00 perc	9 óra 00 perc	10 óra 00 perc	11 óra 00 perc	12 óra 00 perc	13 óra 00 perc	14 óra 00 perc	15 óra 00 perc	16 óra 00 perc	17 óra 00 perc	18 óra 00 perc	19 óra 00 perc	20 óra 00 perc	21 óra 00 perc
ΣX	53,05	171,40	136,68	88,00	77,80	69,60	61,00	43,80	52,34	33,00	23,60	13,90	20,80	68,80	26,40	36,80	25,80	37,70	92,40	34,80	35,00	48,20	23,10	61,30	51,50
$\bar{X}$	5,89	28,57	22,78	14,67	12,97	11,60	10,17	7,30	8,72	5,50	3,93	2,32	3,47	11,47	4,40	6,13	4,30	6,28	15,40	5,80	5,83	8,03	3,85	10,22	8,58
X^2	324,79	4906,40	3143,16	1306,62	1029,70	833,92	629,18	322,88	459,88	191,78	94,48	33,19	77,98	877,92	122,36	254,60	136,44	244,75	1507,52	208,18	206,62	392,78	99,21	639,11	467,43
SQ	12,09	10,07	29,59	15,95	20,89	26,56	9,01	3,14	3,30	10,28	1,65	0,99	5,87	89,01	6,20	28,89	25,50	7,87	84,56	6,34	2,45	5,57	10,27	12,83	25,39
s^2	1,51	1,69	6,20	3,20	4,16	5,29	1,80	0,62	0,66	2,04	0,34	0,19	1,17	17,81	1,23	5,76	5,11	1,56	16,89	1,28	0,49	1,12	2,04	2,56	5,06
s	1,23	1,30	2,49	1,79	2,04	2,30	1,34	0,79	0,81	1,43	0,58	0,44	1,08	4,22	1,11	2,40	2,26	1,25	4,11	1,13	0,70	1,06	1,43	1,60	2,25
$s_{\bar{X}}$	0,41	0,58	0,99	0,75	0,83	0,94	0,55	0,32	0,33	0,59	0,24	0,18	0,44	1,72	0,45	0,98	0,92	0,51	1,68	0,46	0,29	0,43	0,59	0,65	0,92

s_d	PG	t /tábl. érték/ P = 1 %	$t_{0^h;30^h}$	$t_{30^h;1^h}$	$t_{1^h;1^h30^h}$	$t_{1^h30^h;2^h}$	$t_{2^h;3^h}$	$t_{3^h;4^h}$	$t_{4^h;5^h}$	$t_{5^h;6^h}$	$t_{6^h;7^h}$	$t_{7^h;8^h}$	$t_{8^h;9^h}$	$t_{9^h;10^h}$	$t_{10^h;11^h}$	$t_{11^h;12^h}$	$t_{12^h;13^h}$	$t_{13^h;14^h}$	$t_{14^h;15^h}$	$t_{15^h;16^h}$	$t_{16^h;17^h}$	$t_{17^h;18^h}$	$t_{18^h;19^h}$	$t_{19^h;20^h}$	$t_{20^h;21^h}$
1,12	124	2,62	5,20	7,24	1,52	1,22	1,28	2,56	1,27	2,88	1,40	1,44	1,03	7,60	6,76	1,54	1,63	1,77	8,14	8,57	0,03	1,96	3,73	5,69	1,47

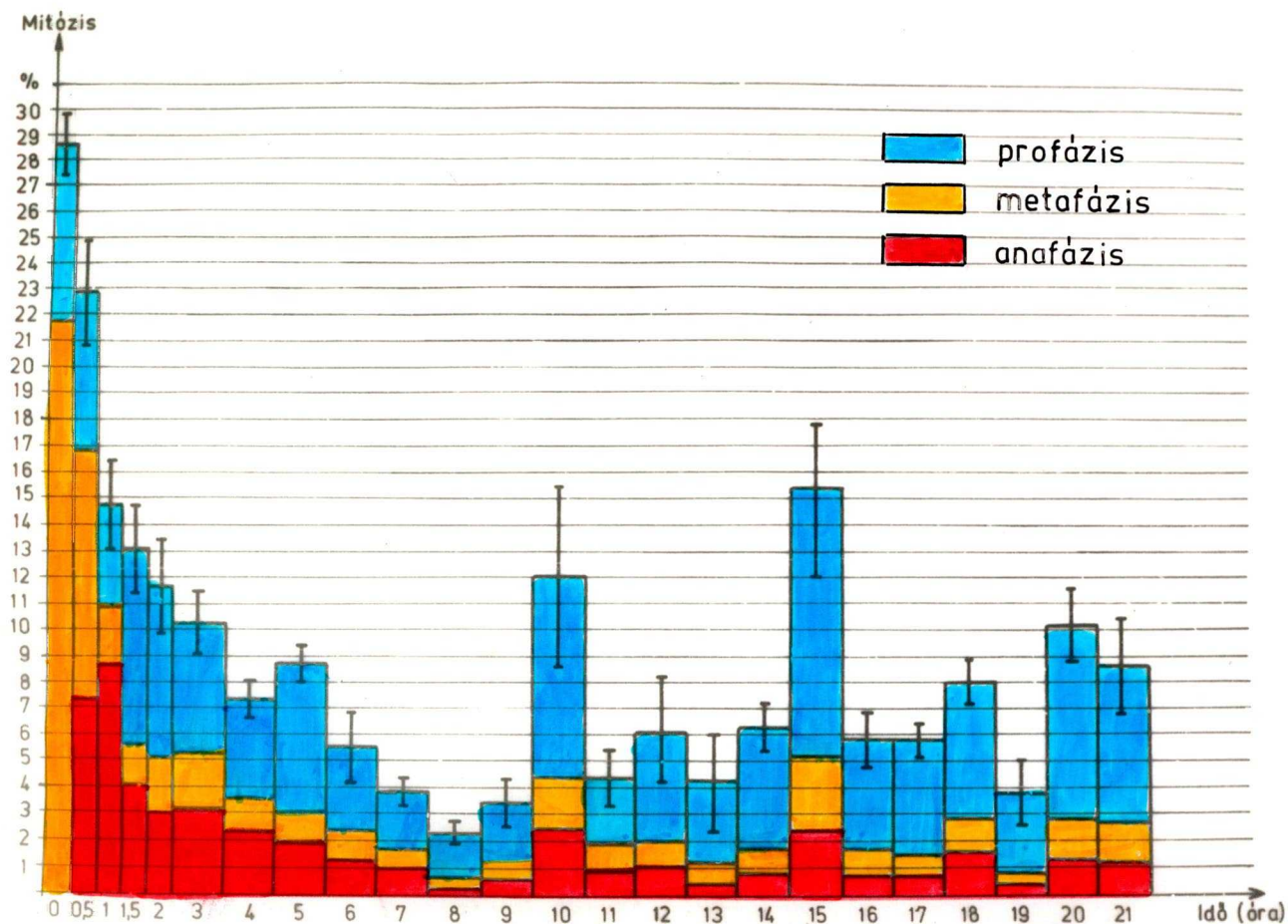
A melléklet III. számú táblázatában összefoglalt alapadatok /mitótikus aktivitások/ matematikai feldolgozása.

lönbség 2,93 %-nak bizonyult. Az átlagok között szignifikáns különbségeket találtan /6. táblázat/.

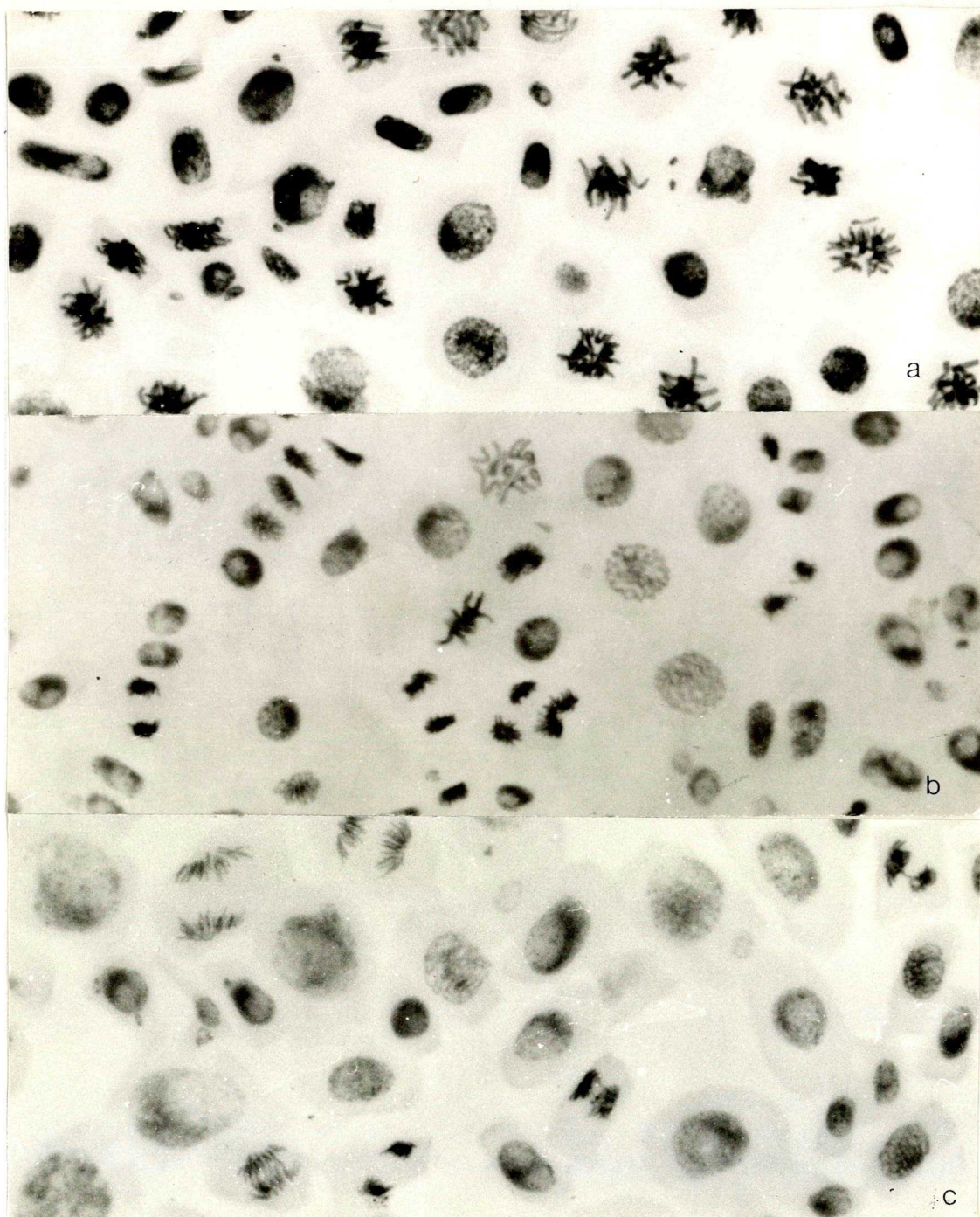
A mitótikus, pro-, meta- és anafázis aktivitás átlagait az előzőekhez hasonlóan oszlopdiagramon ábrázoltan az idő /gázfeloldást követő idő/ függvényében /10. ábra/. Az ábrából láthatjuk, hogy a gáznyomás feloldása után a mitótikus aktivitás meredeken csökken és azonnal megjelennek az anafázisos sejtek /11. ábra/. Ha a mitózis egyes fázisainak az alakulását figyelemmel kísérjük, azt találjuk, hogy a gáznyomás feloldása után 30 perccel 0 %-ról 7,3 %-ra emelkedik az anafázisok száma, majd fokozatosan eléri a kontroll szintjét. 10 óránál a mitótikus aktivitásnak ismét egy meredek csúcsa van, amely a kontroll értékének csaknem 2,5-szerese. 10 órától a mitótikus aktivitás 5 órás periodicitást mutat, amely egy-egy, a kontroll szintjét lényegesen meghaladó csúcs formájában jelentkezik. E csúcsokban a mitózisos sejtek több mint 2/3-át profázisos sejtek teszik ki. A csúcsoktól eltekintve a gázkezelést követő 5. órától kezdve a mitótikus aktivitás értéke a kontroll szintjétől szignifikánsan nem tér el.

A reverzibilitás vizsgálatához 100 db 6 atm nyomáson 8 óráig kezelt csiranövényt ládába ültettem ki és üvegházban megkíséreltem felnevelni. Ebből 91 növény volt életképes, ezek virágzása és magkötése nem különbözött a kezeletlen kontrollként használt 100 csiranövényből felnevelt 94 növényétől.





10. ábra. A gyökérmerisztéma sejtek pro-, meta- és anafázisos, valamint mitotikus aktivitásának változása a gázfeloldást követő idő függvényében. A kezelés 6 atm nyomáson, 8 óráig tartott



11. ábra. A mitózisok változása 6 atm-án a 8 órás gáz-
kezelés megszüntetését követően a/ 0 perckor,
b/ 30 perckor, c/ 60 perckor
Nagyítás: 400 x

4.4. A dinitrogén-oxid hatásmechanizmusával kapcsolatos vizsgálatok

A vizsgálatok során két kérdésre kerestem választ:

1. A dinitrogén-oxid kezelés gátolja-e a sejtek DNS szintézisét?
2. A metafázis blokkolása a mikrotubulusok károsítása /kolhicin-hatás/ révén valósul-e meg?

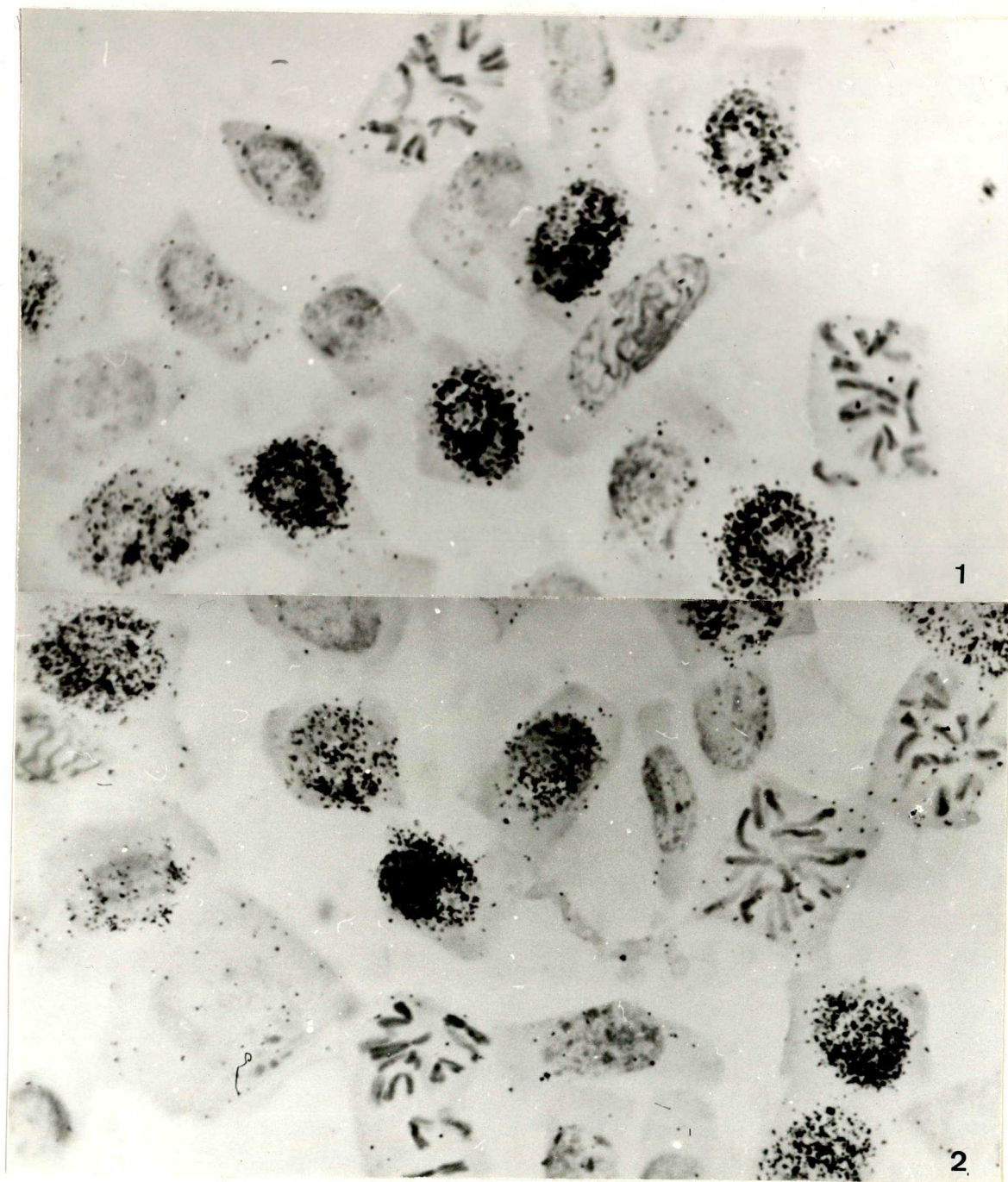
A DNS szintézis vizsgálatára a sejteket $10 \mu\text{Ci/ml}$ koncentrációju H^3 timidinnel jelöltem, 6 atm nyomáson 6 óra hosszáig kezeltem. A 3.1. fejezetben ismertetett készülékkel a gázkezelés megkezdése után 1 órával juttattam az izotópot a csiranövényekhez. 5 óra elteltével a növényeket fixáltam és a gyökerekből autoradiográfiás preparátumokat készítettem. A vizsgálatok eredményeképpen megállapítottam, hogy a 6 atm-ás gázkezelés alatt a csiranövények DNS szintézise intenzíven folyik, melyet a radioaktív izotóp sejtmagokba történő beépülése igazolt /12. ábra 1., 2. kép/.

A dinitrogén-oxid mikrotubulusokra gyakorolt hatását kétféle módon tanulmányoztam:

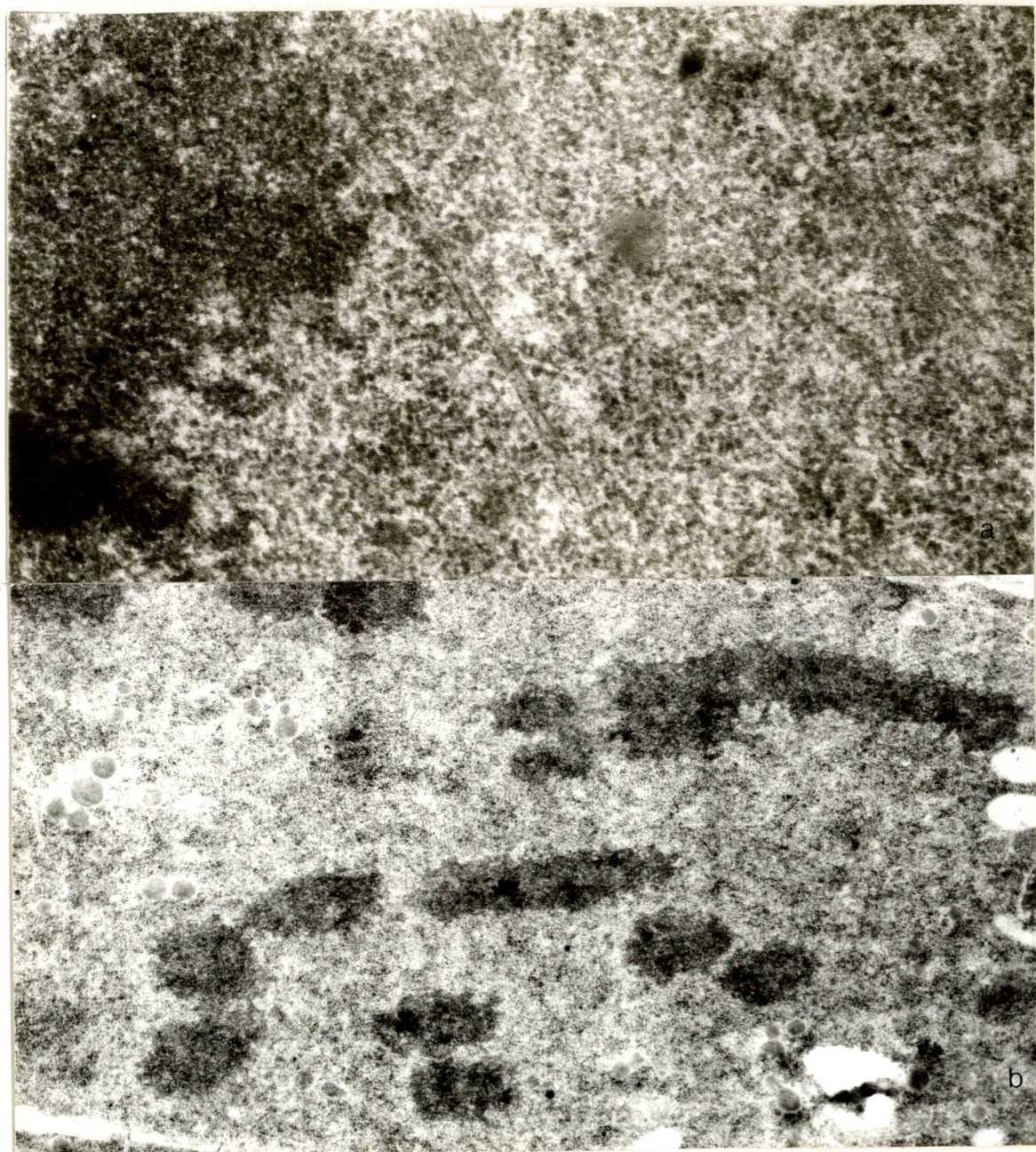
a/ elektronmikroszkópos vizsgálattal, melynek tanúsága szerint in vivo körülmények között a kromoszómális mikrotubulusok megtalálhatók a sejtekben /13. ábra a. kép/, míg a kolhicin-kezelt kontrollban /13. ábra b. kép/ a mikrotubulusok hiányoznak. A mikrotubulusok in vitro vizsgálatát

sértésagyból tisztított /WEINGARTNER et al., 1974/ kétszer ciklizált tubulinnal végeztem. /A tisztított tubulint Dr. Hadlaczký Gyula, az MTA SZBK Genetikai Intézetének munkatársa bocsájtotta rendelkezésemre./ Az in vitro körülmények között repolimerizált tubulin mikrotubulusokat képez, amelyek polarizációs mikroszkóppal finom hálózatszerű képet mutatnak /14. ábra/,

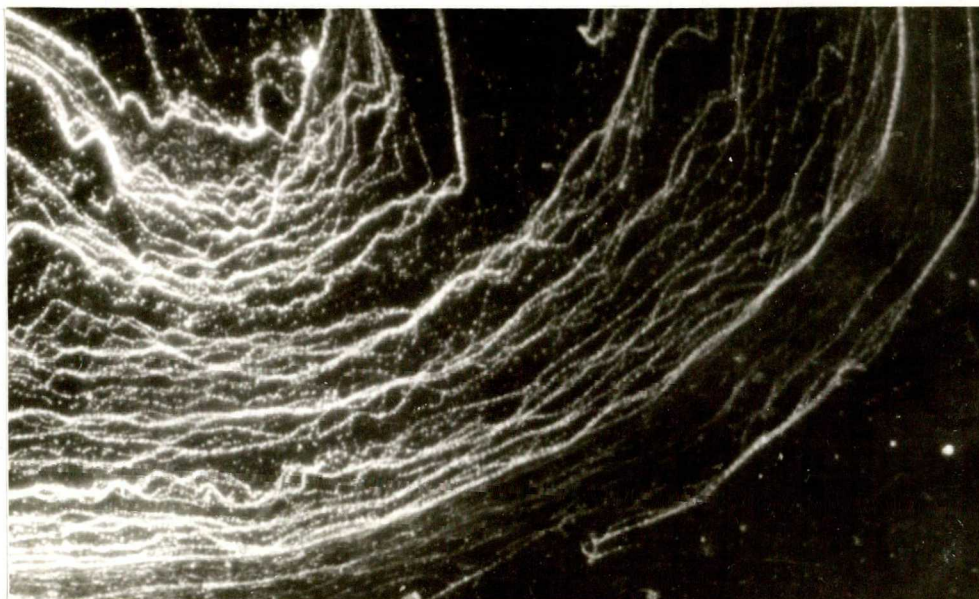
b/ a mikrotubulusokat 6 atm nyomáson 1 óra hosszánig kezeltem, majd ismét megvizsgáltam polarizációs mikroszkóppal. Azt tapasztaltam, hogy a mikrotubulusok a dinitrogén-oxid hatására nem estek szét.



12. ábra. H^3 tinidin beépülése a sejtnagokba
6 atm-ás gázkezelés folyamán
Nagyítás: 800 x



13. ábra. Kromoszómális mikrotubulusok a 6 atm nyomásu,
8 órás kezelés után /a/ Nagyítás: 60.000 x
Kolhicin kezelt kontroll, mikrotubulusok
nélkül /b/ Nagyítás: 16.000 x



14. ábra. In vitro polimerizált mikrotubulusok
képe polarizációs mikroszkóppal

4.5. A dinitrogén-oxid kezelés citológiai kísérőjelenségei

Az alábbiakban azokat a citológiai jelenségeket ismertetem, amelyek a különböző dinitrogén-oxidos kezelések során megfigyelhetők. A jobb áttekinthetőség érdekében eltekintettem az egyes kezelések során megfigyelhető összes rendellenességek felsorolásától, mivel ez óhatatlanul ismétlésekhez vezetett volna. Ehelyett a rendellenességeket 3 nagy csoportba sorolva mutatom be, amelyek azonban mind kialakulásukban, mind megnyilvánulásukban egymással szervesen összefüggnek: 1. mikronukleuszképződés, 2. kromoszóma-számváltozások, 3. kromoszóma és sejtnag szerveződés rendellenességei.

A tartós dinitrogén-oxid kezelés legjellegzetesebb citológiai kísérőjelensége a mikronukleuszképződés. 6 atm nyomáson 4 órás kezelés után megjelennek a mikronukleuszok, melyek száma 6 óra után ugrásszerűen megnövekszik /15. ábra/. A mikronukleuszképződés folyamatának első citológiai jele az, hogy a metafázisban az egyes kromoszómák vagy kromoszómacsoportok elkülönülnek /15. ábra 1-4. kép/, amelyek azután fokozatosan despiralizálódnak, de integritásukat mindig megőrizve, a normális anafázis lépcsőjét kihagyva mennek át telofázisba /15. ábra 5-12. kép/. A telofázisban a kromoszómák despiralizációja a kromoszómák és

kromoszóma-csoportok sejtbeni helyétől függetlenül, többé-kevesbé szinkronitást mutatnak /16. ábra 1-6. kép/ és fokozatosan kialakulnak az interfázisos magok és mikronukleuszok /16. ábra 7-12. kép/. Az idő függvényében nemcsak a mikronukleuszt tartalmazó sejtek száma /17. ábra/, hanem a sejtenkénti mikronukleusz-szám is fokozatosan növekszik. Egy-egy sejtben 10 feletti mikronukleusz-szám is megfigyelhető /16. ábra 7. és 11. kép/. A mikronukleuszok gyakran egymással érintkeznek /16. ábra 8. kép/, átfedik egymást /16. ábra, 11. kép/, így a sejtenkénti mikronukleusz-számnak statisztikai vizsgálatától eltekintve.

A dinitrogén-oxid okozta kromoszómaszám változások közül legjelentősebb a poliploidizáció. A tetra-, illetve magasabb ploid-szintű sejtek kialakulása összerfűgést mutat mind a kezelési idővel, mind pedig a nyomással. Tetraploid sejtek kialakulása már megfigyelhető a 6 atr-ás, 6 óráos kezelés, illetve 9 atr-án történő 2 óráos kezelés után is. A poliploidizáció folyamatát tekintve első lépésként figyelhető meg a rendezetlen kromoszómák /18. ábra 1-4. kép/, vagy a "metafázisos gyűrű" /18. ábra 5-7. kép/ kronatidáinak

szétválása. A citokinezis lépésének kimaradása folytán a kromoszónák replikációját követően létrejönnek a tetraploid sejtek /18. ábra 8-12. kép/. A kezelési idő növelésével pl. 6 atm-án 20 órától ez a folyamat megismétlődhet és magasabb ploid-szintű /oktoploid/ sejtek jönnek létre /19. ábra 1-4. kép/. E folyamat rendellenessége révén esetenként megfigyelhető aszimmetrikus poliploidizáció, melynek eredménye hexaploid sejtek megjelenése. A 19. ábra 5. képe három független diploid sejtmagot tartalmazó hexaploid sejtet mutat be.

A mikronukleuszképződést követő citokinezis /20. ábra 1-2. kép/ illetve a poliploidizáció és a mikronukleusz képződését /20. ábra 3-4. kép/ követő citokinezis révén aneuploid sejtek keletkezése figyelhető meg.

A 20. ábra 4. képe 16 kromoszómás aneuploid sejtet, az 5. kép három kromoszómát és kromoszóma fragmentet tartalmazó aneuploid sejtet ábrázol.

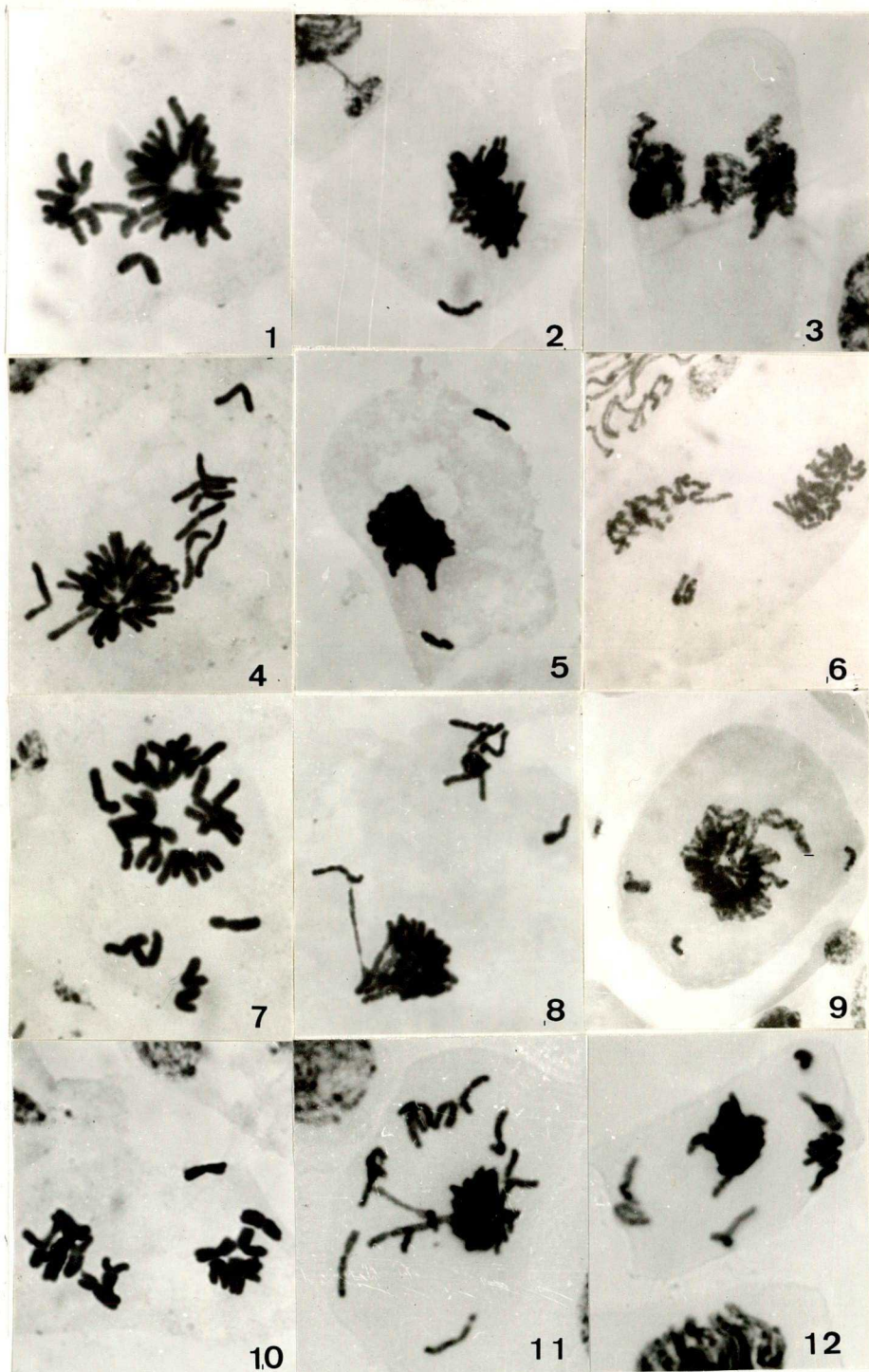
A dinitrogén-oxid kezelés hatásának jellegzetes rendellenessége a kromoszóma és a sejtmag szerveződésének /kondenzációjának/ különböző zavara.

A 21. ábra 1. képen interfázisos sejt látható három erősen kondenzált mikronukleusszal. A mikronukleusz képződés során fragmentálódott magvu sejtekben megfigyelhető a mikronukleuszok eltérő kondenzációja /21. ábra 2-6. kép/, ahol a sejtek többé-kevésbé kondenzálódott kromoszómákat és interfázisos mikronukleuszokat tartalmaznak.

Gyakran tapasztalható a sejt kromoszómáinak egyenlőtlen kondenzációja, mely során profázisos és metafázisos kromoszómák egyaránt megtalálhatók /21. ábra 7-9. kép/, illetve metafázisos kromoszómák között erősen despiralizált kromoszómák is előfordulnak /21. ábra 10. kép/. A 21. ábra 11. képén aszimmetrikus poliploid sejtet látunk, mely interfázisos és mitotikus sejtnagot egyaránt tartalmaz. Esetenként a centromeronok rendellenes osztódása, a kromatidák korai szétválása is megfigyelhető. A 21. ábra 12. képe egy profázisos sejtet szemléltet, melyben a centromeron osztódása már megtörtént, és a kromatidák szétváltak.

Magas dinitrogén-oxid koncentrációnál a kezelés első időszakában megfigyelhető a kromoszómatörések megjelenése /22. ábra 1. kép/, dezintegrált, feltehetően mitotikus sejtek /22. ábra 2-3. kép/ előfordulása.

A feloldási kísérletek során tapasztalt anafázisos rendellenességek között leggyakoribbak az egyenlőtlen kromoszóma eloszlások /23. ábra 1-4. kép/, az anafázisos hidak /23. ábra 4-5. kép/ és a gyűrű formán kívül elhelyezkedő kromoszómák /23. ábra 3-6. kép/.



15. ábra. A mikronukleusképződés folyamata

Nagyítás: 650 x

1., 4., 6., 7., 10. kép /6 atm 8 óra 0 perc/

2., 3., 5., 8. kép /6 atm 12 óra/

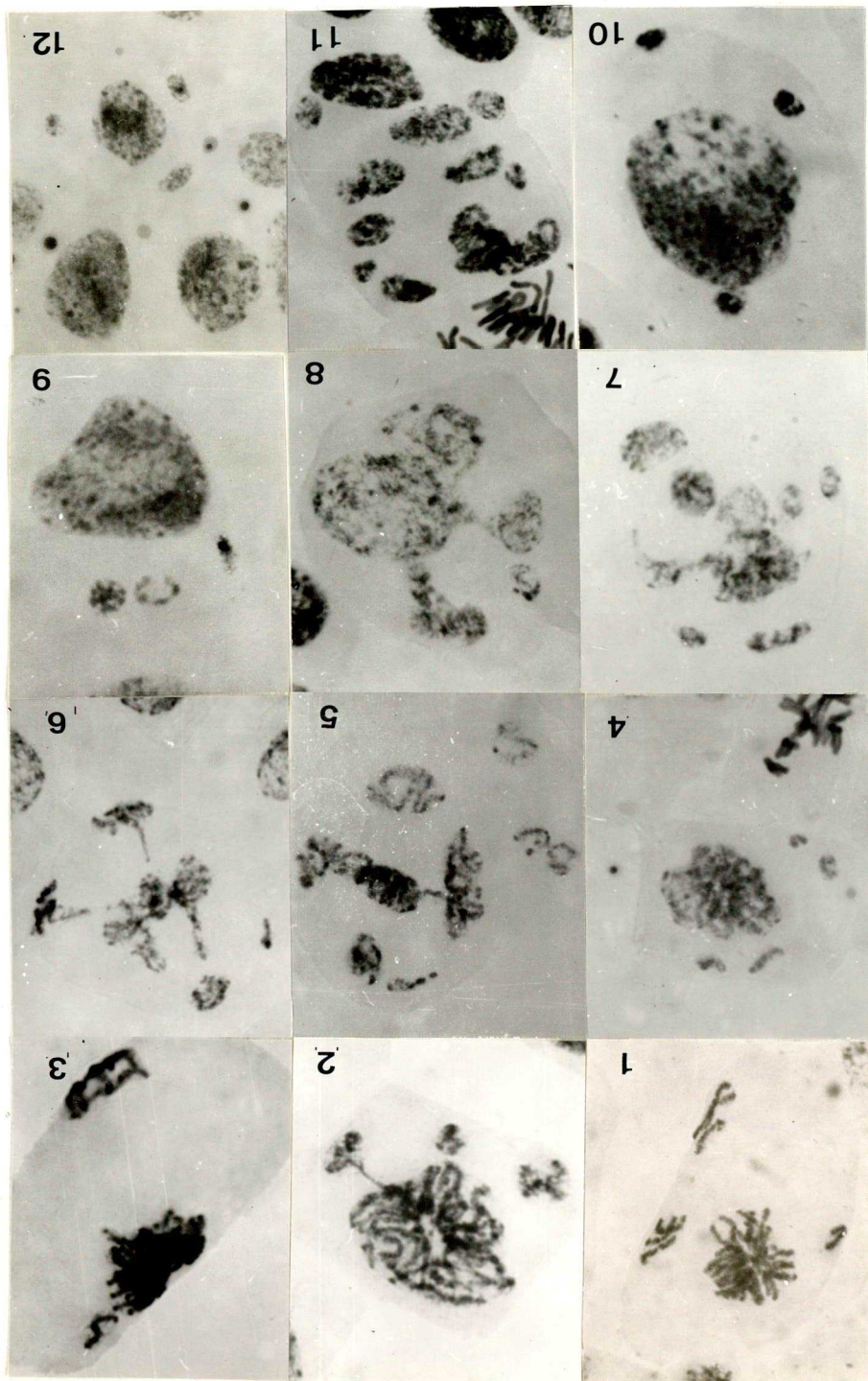
11., 12. kép /6 atm 2 óra/

9. kép /6 atm 26 óra/

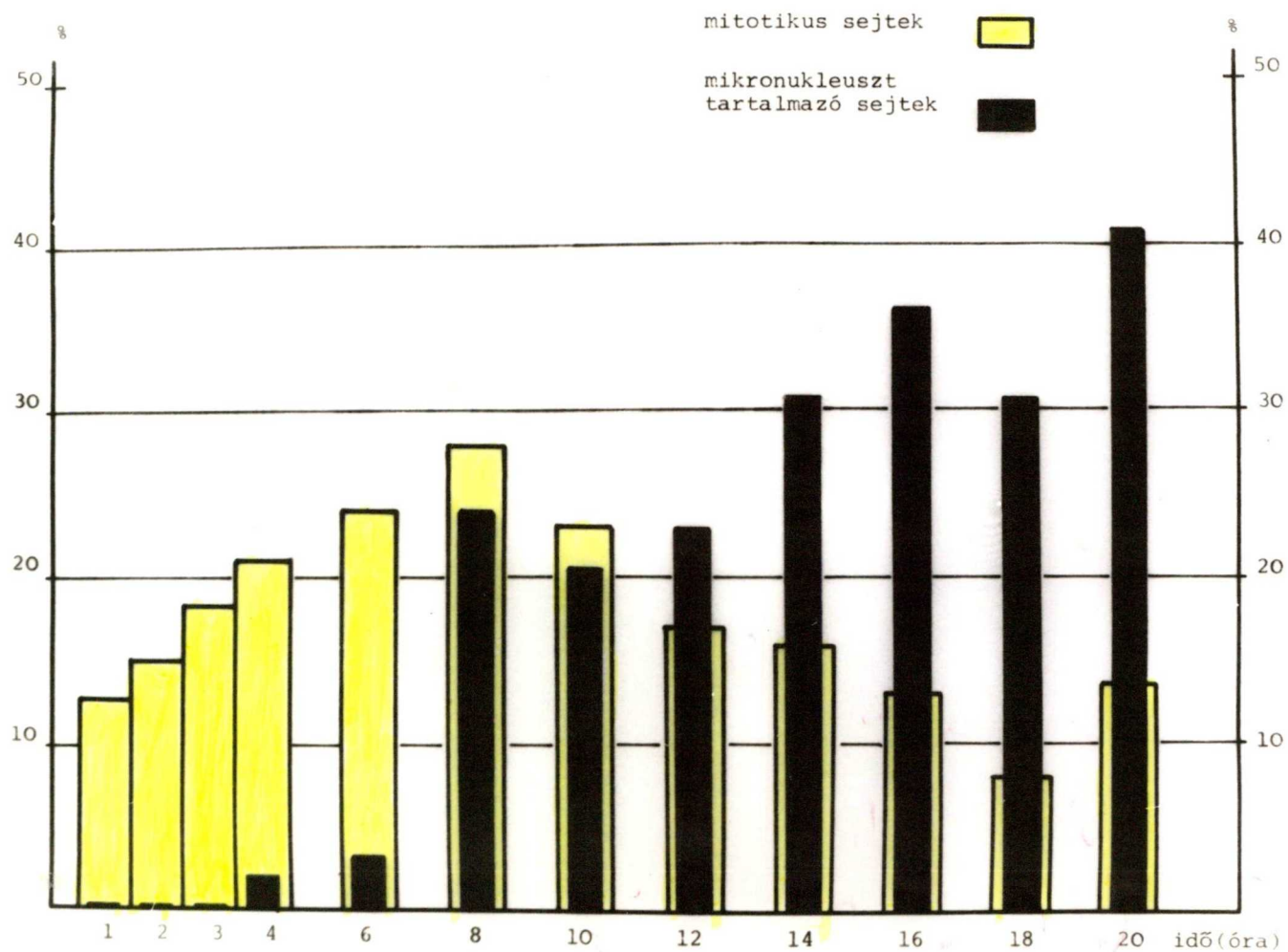
16. ábra. A mikronukleuszképződés folyamata

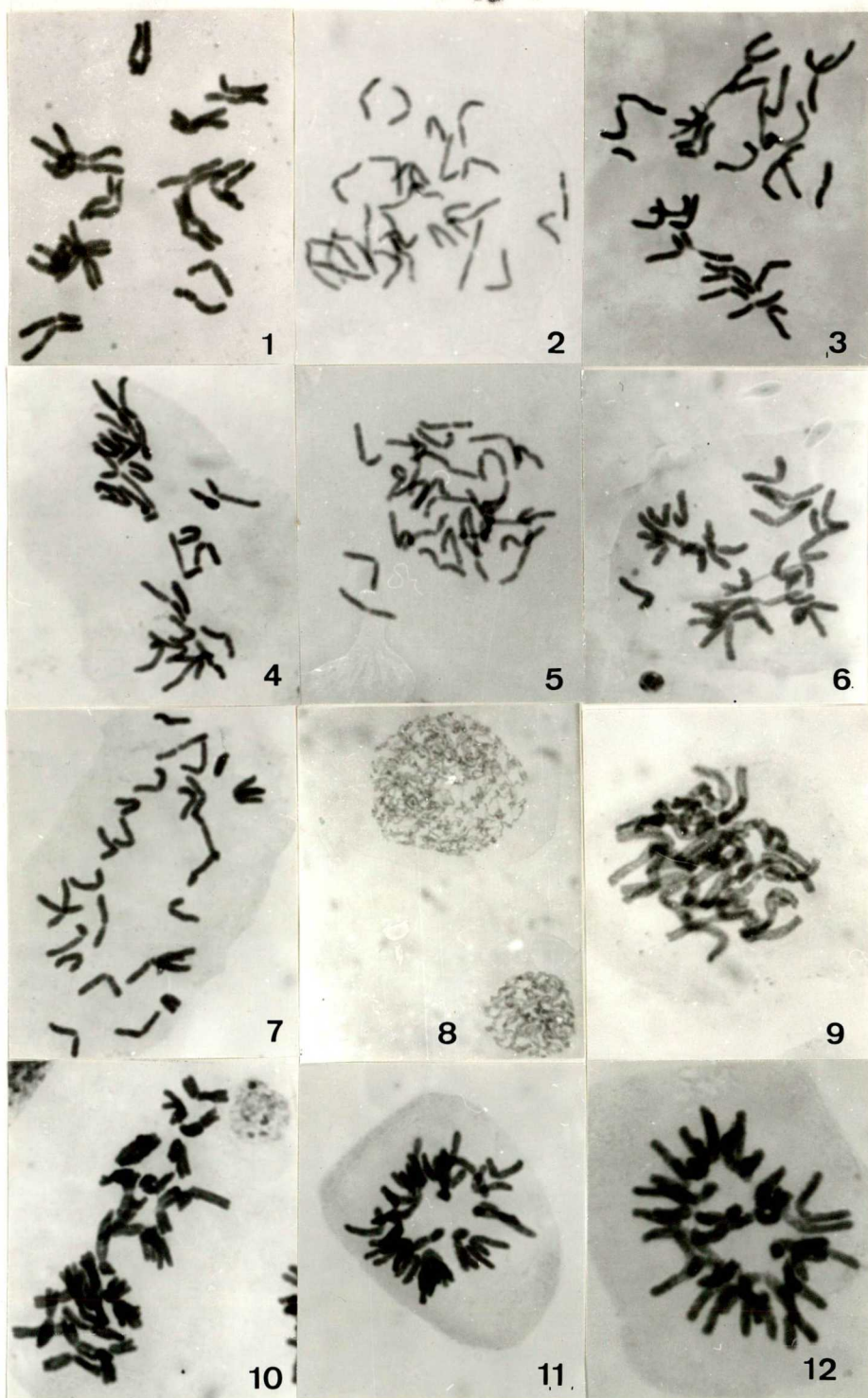
Megátás: 650 x

1., 9., 12. kép / 6 atm 8 óra + 30 perc /
 2., 3., 4. kép / 6 atm 12 óra /
 5. kép / 11 atm 2 óra /
 6. kép / 12 atm 2 óra /
 7. kép / 7 atm 2 óra /
 8. és 11. kép / 9 atm 2 óra /



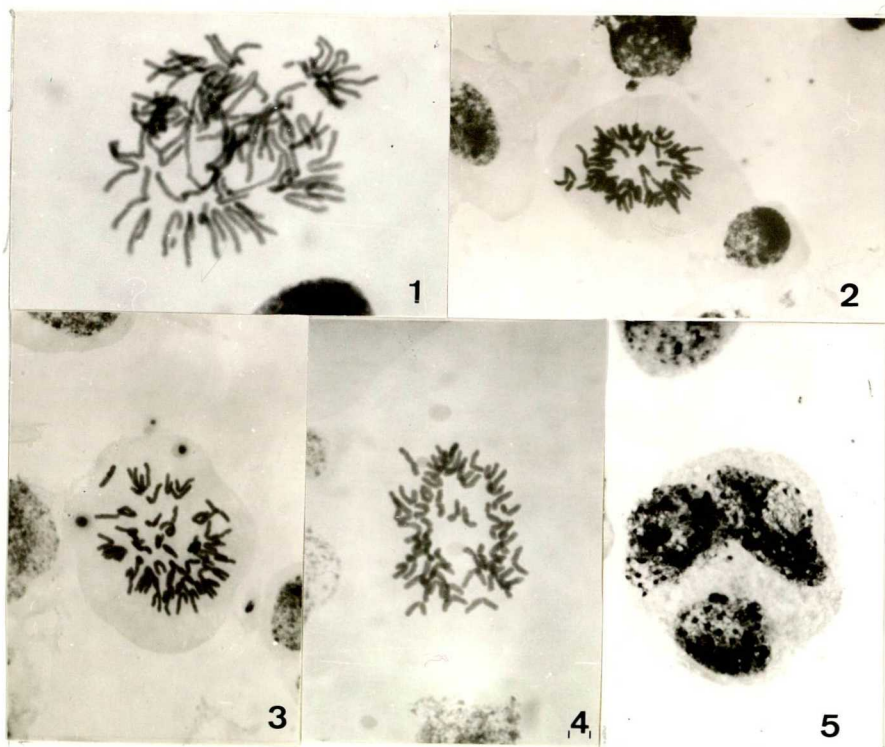
17. ábra. A mikronukleusz tartalmazó sejtek számának változása a kezelési idő függvényében.





18. ábra. Poliploid sejtek kialakulása N_2O kezelés hatására /Nagyítás: 800 x/

- 1., 6 kép /6 atm 8 óra/
- 2. kép /12 atm 2 óra/
- 3., 4., 7., 10., 11., 12. kép /6 atm 12 óra/
- 5. kép /11 atm 2 óra/
- 8. kép /6 atm 8 óra + 5 óra/
- 9. kép /6 atm 8 óra + 10 óra/



19. ábra. A dinitrogén-oxid hatására létrejött
poliploid sejtek /Nagyítás: 730 x/

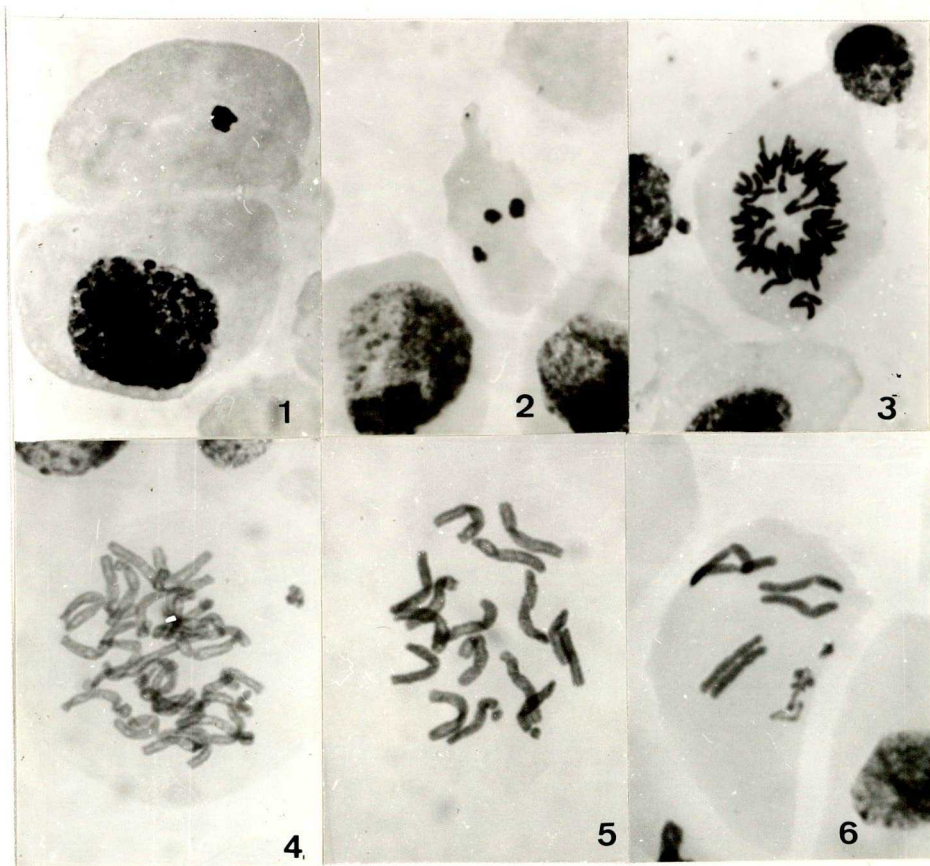
1. kép /6 atm 8 + 15 óra/

2. kép /6 atm 20 óra/

3. kép /6 atm 20 óra/

4. kép /6 atm 26 óra/

5. kép /6 atm 24 óra/



20. ábra. Aneuploid sejtek kialakulása gázkezelés hatására.

1-3. és 6. kép: 6 atn 20 órás kezelés;

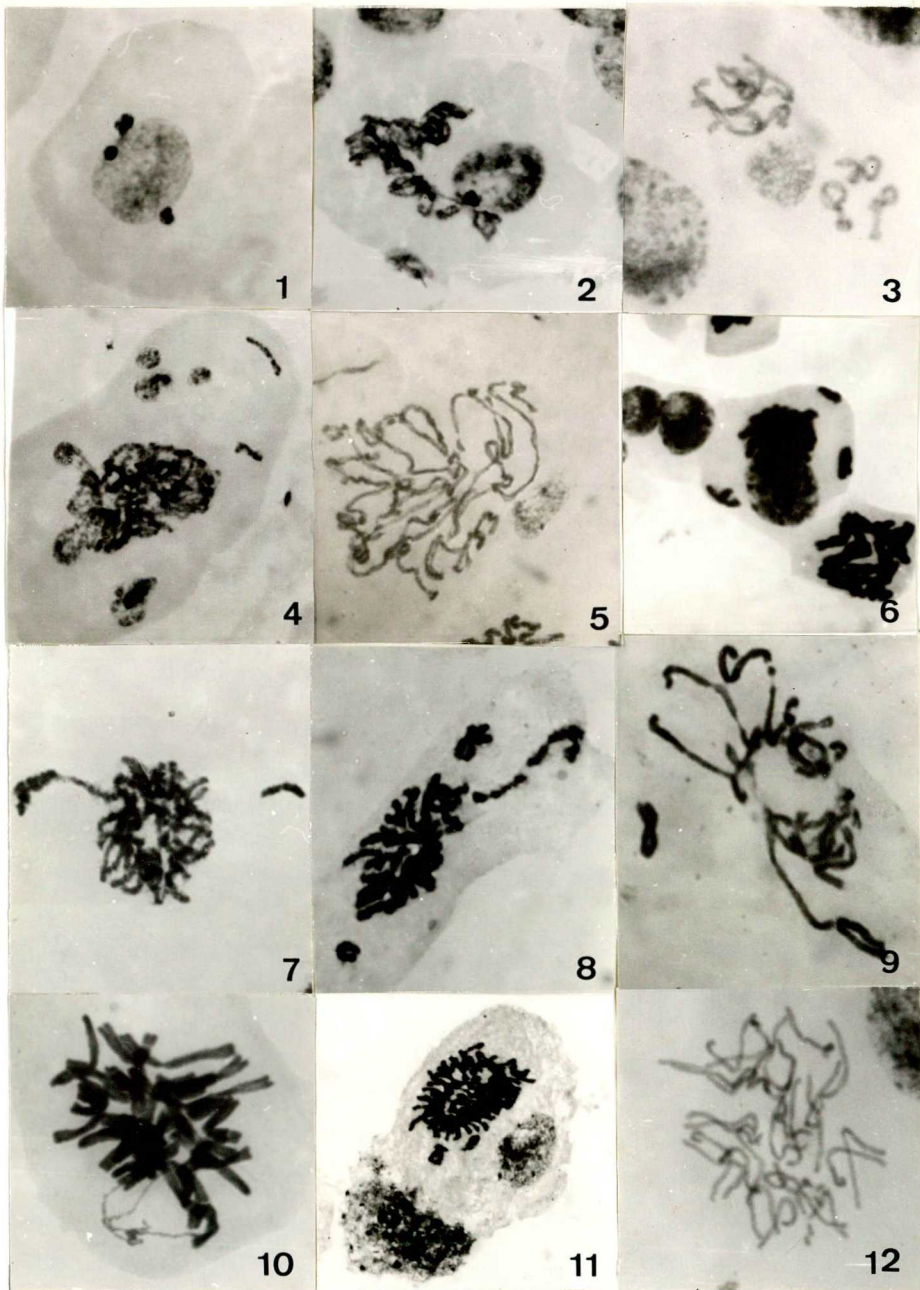
4. kép: 6 atn 8 óra;

5. kép: 6 atn 8 + 15 órás kezelés

Nagyítás: 1., 2., 4., 5. kép 800 x

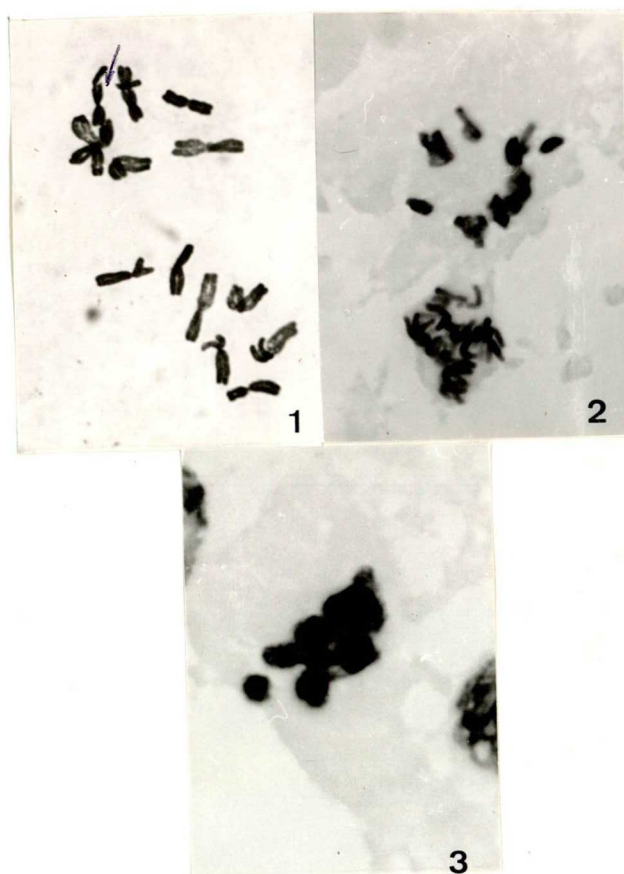
3. kép 600 x

6. kép 730 x

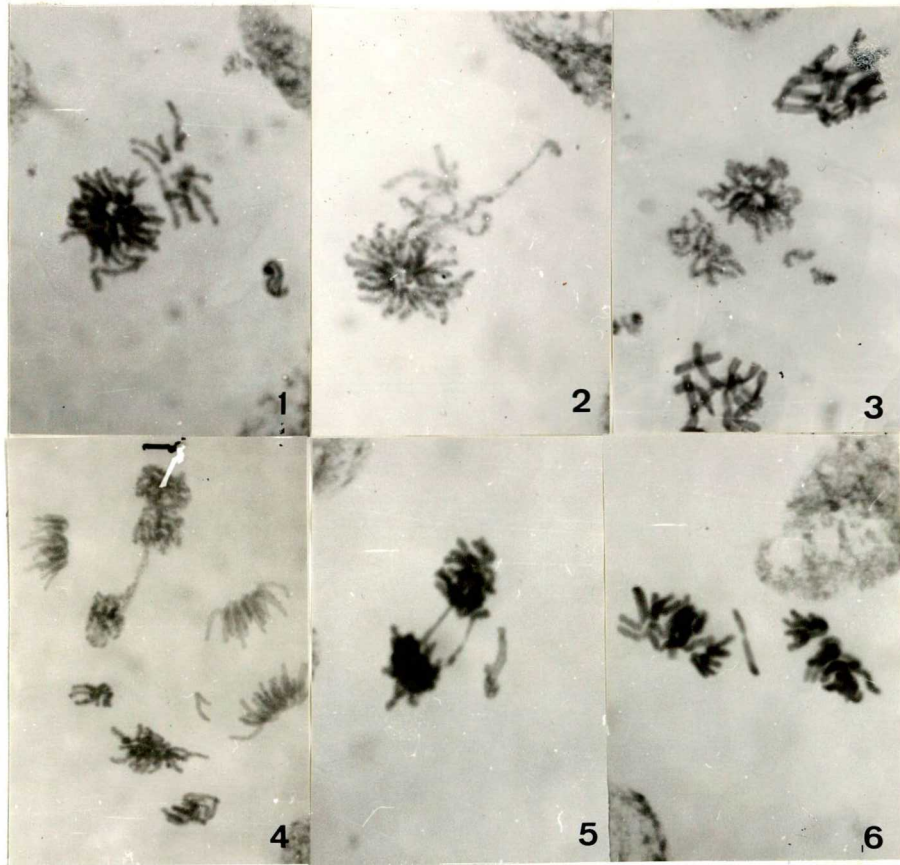


21. ábra. A kromoszóma és sejtmagszerveződés zavarai
N₂O kezelt sejtekben. /Nagyítás: 800 x/

- 1., 4. kép /6 atm 20 óra/
2., 5., 8., 9 kép /6 atm 8 óra/
3. kép /6 atm 8 + 5 óra/
6. kép /6 atm 26 óra/
7., 10., 11. kép /6 atm 12 óra/
12. kép /6 atm 8 óra + 30 perc/



22. ábra. Kromoszómatörés /1. kép, nyíl/
és a sejtmagok /kromoszómák/
dezintegrálódása 6 atm 8 órás
kezelés hatására /2-3. kép/.
/Nagyítás: 800 x/



23. ábra. Rendellenes anafázisok a gázkezelés
/6 atm/ megszűnését követően
/Nagyítás: 730 x/

5. Az eredmények megvitatása

A dinitrogén-oxid csiranövények osztódó gyökérmerisztémájára gyakorolt hatásának értékelésekor feltétlenül szükséges néhány, a kísérleti rendszer sajátosságának tekinthető kérdés megvitatása. Ennek hiányában a kísérleti eredmények értelmezése, a levont következtetések számos tévedés forrásai lehetnek.

Egyik ilyen legfontosabbnak tekinthető kérdés az, hogy a gyökérmerisztéma sejtek nem tekinthetők homogén sejtpopulációnak. A gyökércsucsban találunk gyorsan ciklizáló /rövid sejtciklusú/, lassan ciklizáló /hosszu sejtciklusú/ és nem ciklizáló /nyugvó/ sejteket. Még nem eldöntött, hogy ezek a nyugvó sejtek csak időszakos nyugalmi állapotban vannak-e, vagy véglegesen "sejtcikluson kívül" maradnak. Egyelőre nincs direkt bizonyíték, hogy ezek a sejtek elveszítették volna osztódóképességüket /CLOWES, 1976/. Nyilvánvaló, hogy e három alapvető sejttípus léte rendkívül bonyolulttá teszi mindennemű hatás értékelését és ezt a tényt feltétlenül szem előtt kell tartanunk. Ezért az eredmények feldolgozásánál el kellett tekintenem minden olyan jellegű értékeléstől, amely egységes sejtciklust /azonos sebességgel, azonos rátával osztódó sejteket/ tételez fel. A vizsgálatok során készített gyökércsucspre-

parátumok átlagosan 3500-4000 sejtből állottak. Az egyes kísérletekben egységesen 2000-2000 sejtet értékeltünk, ami megközelítőleg a teljes preparátum 50 %-a. Így szerettem volna minimálisra csökkenteni a "gyors", "lassu" és "nem osztódó" sejtek eltérő "válaszából" adódó hibát.

A nyomáskísérletek /1-2. táblázat, 7. ábra/ során 2 órás kezelési időket használva megállapítottam, hogy a vizsgált 1-2 atm-ás nyomásintervallumú sorozatokon belül mitózis akkumulációt 6 atm nyomáson érhetünk el. Ismerve 20 °C-on a dinitrogén-oxid sűrűségét, / $N_2O = 1,977 \text{ g l}^{-1}$ / valamint molekula súlyát /MW = 44/, az egyesített gáztörvény alkalmazásával kiszámítottam, hogy ez a gáznyomás 270 mM gázkoncentrációt jelent a sejtekben. Megállapítottam, hogy szignifikáns mitózisszátlás /mitózis akkumuláció/ 3 atm /135 mM/ gázkoncentrációtól kezdődően tapasztalható. 10 atm-ás nyomáson csekély, de szignifikáns csökkenés figyelhető meg a mitotikus sejtek számában, amely a profázisos sejtek számának erőteljes csökkenésének tudható be. Ezen a nyomáson a profázisos sejtek száma nem éri el a kontroll 50 %-ának szintjét. Miután ez a hatás a nyomás növelésével megszűnik és 12 atm-nál lényegesen meghaladja a kontroll szintjét is, a 10 atm nyomás hatása nem tekinthető "telítési gátlás"-nak.

A dinitrogén-oxid mitózist akkumuláló hatása egy-

értelműen a metafázisok számának növekedésével, vagyis a sejtosztódás metafázisos blokkolásával magyarázható. A metafázisos kromoszómák jellegzetes gyűrűalakba rendeződnek /6. ábra/. A metafázist nem követi ana- és telofázis. A profázisok száma a már említett csökkenéstől eltekintve megközelítően azonos szinten marad. Az anafázisok aránya 5 atm-ás nyomásig /225 mM gázkoncentráció/ a kontrollhoz közeli értéket mutat, ez 6-11 atm-ig a kontrollnak mindössze 10-15 %-a, mely egyértelműen jelzi a metafázis teljes blokkolását. A mitótikus aktivitás 12 atm-nál történő ismételt emelkedését technikai okok miatt /magas nyomású készülék hiánya/ nem tudtan vizsgálni, így erre kielégítő magyarázattal sem tudok szolgálni. Az "optimális" gázkoncentráció /6 atm/ megállapítása után megvizsgáltam a kezelési idő hatását a mitótikus akkumulációra. 1-34 órás intervallumon belül /3-4. táblázat, 8. ábra/. Megállapítottam, hogy már 1 órás kezelés 6 atm nyomáson mintegy kétszeresére emeli a mitótikus sejtek számát, amely a metafázisos sejtek kontrollhoz viszonyított számának mintegy 7-szeres növekedésének tudható be. A legmagasabb mitótikus akkumulációt 8 órás kezelésnél kaptam, ahol a metafázisos sejtek aránya mintegy 20-szoros a kontrollhoz viszonyítva. A profázisos sejtek száma a kontroll sejtek kétszeresére nőtt.

A profázisok számának emelkedésére több magyarázat is kínálkozik: 1/ a profázis szakasz relative megnyúlik, míg a sejtciklus ideje változatlan marad, 2/ a sejtciklus felgyorsul, 3/ mitózis-indukció következik be addig nem osztódó sejtpopulációban stb. A profázisok számának ezen változása azonban meglehetősen szűk időintervallumot érint /6 és 8 óra/ és 22 órás kezelésig gyakorlatilag a kontrollhoz közeli szinten marad, 24 órától pedig erőteljes csökkenés figyelhető meg. Az anafázisok száma minden időértéknél gyakorlatilag nulla, azaz az anafázis teljes gátlása 34 óra hosszáig fenntartható volt. A metafázisok száma 8 órás kezelés után fokozatosan csökken, melyből arra következtethetünk, hogy a dinitrogén-oxid gáz metafázist blokkoló hatása időben korlátozott, s a 8 órát meghaladó kezelés után már több sejt megy át interfázisba az ana- és telofázisos szakaszt kihagyva, mint az újonnan mitózisba lépő sejtek száma. 20 óránál a metafázisok száma ismét emelkedést mutat. A mitotikus sejtek többsége 20 óránál azonban tetraploid, tehát a csúcsot nem "új" mitózisban lépett sejtek adják, hanem a már "kezelt" sejtek jutnak el ismét metafázisig. Ebből arra következtethetünk, hogy:

1/ a dinitrogén-oxid a sejtciklus egyéb pontján, számottevő gátlást nem idéz elő,

2/ 6 atm-án a dinitrogén-oxid kezelés alatt ezen sejtek ciklusideje megközelítően 10 óra. 22 órán túli

kezelés egyértelmű gátlóhatást mutat és 34 óráig újabb emelkedést nem tapasztaltunk. A hosszú kezelés okozta gátlóhatáson túl ebben szerepet játszhat a már osztódott sejtek osztódási képességének kimerülése.

Ellenőrző kísérletekkel megállapítottam, hogy a dinitrogén-oxid mitózisra gyakorolt hatása specifikus és nem a kezelés fizikai körülményeinek /pl. magas nyomás/ tudható be. 6 atm-ás, 8 óráig tartó kezeléseket végeztem levegővel, nitrogénnel és oxigénnel, melyek közül egyik sem eredményezett a dinitrogén-oxidhoz hasonló hatást.

Vizsgálataim szerint a dinitrogén-oxid hatása reverzibilis folyamat. A gázkezelés feloldását követően a metafázisos sejtek azonnal többé-kevésbé normális anafázisba mennek át, tehát a dinitrogén-oxid tartós károsodást a mitotikus apparátusban nem idéz elő.

A gázkezelés feloldását követően /5-6. táblázat/ a mitotikus aktivitás változása határozott periodicitást mutat. A mitotikus aktivitás 9 óráig fokozatosan csökken, majd 10 óránál a kontroll szintjét kétszeresen meghaladó szintet ér el, melyet 15 ill. 20 óránál ismét egy-egy csúcs követ.

Az időkísérlet adatai alapján nem valószínű, hogy a sejtciklus valamely pontján történő részleges blokkolás következménye ez a jelenség. Valószínűbb magyarázatnak tartom, hogy a 10 óráig tartó kezelés a részlegesen szinkron-

ban maradt gyorsan ciklizáló sejtek által jön létre, míg a 15 órás csucst a lassabb sejtciklusú sejtpopuláció szinkronban maradt sejtjei hozzák létre. A 20 órás csucst ismét a gyorsan ciklizáló, feltételezhetően 10 órás sejtciklusú sejtek adják. E magyarázat alapján a 0 óra 0 perces, közel 30 %-os mitotikus sejtpopuláció nagyobbik hányadát a lassabb, 15 órás sejtciklusú sejtek adnák. A 10 és 15 órás csucs összege rendkívül jól megegyezik a gázkezelés megszüntetésekor megfigyelt mitotikus aktivitással és ez valamint a 10 órás és a 20 órás mitotikus aktivitás összevetése a szinkronitás rendkívül nagy stabilitását mutatja.

Az időkísérletből már kiderült, hogy a gázkezelés a sejtciklus egyéb fázisait nem gátolja, ellenőrzésképpen azonban elvégeztem a sejtciklus legérzékenyebb, S fázisának /DNS szintézis fázis/ vizsgálatát. Rádioaktív izotópos kísérlettel igazoltam, hogy a gázkezelés alatt a sejtek interfázisában intenzív DNS szintézis folyik. 5 órás kezelési idő után jelölt mitotikus sejtet nem találtam, mely egyértelműen mutatja, hogy kísérleti rendszerünkben a G_2 -es fázis hosszabb, mint 5 óra, még a gyorsan ciklizáló sejtek esetében is. Az irodalomban közölt ciklusidőt figyelembe véve /LIMA DE FARIA, 1972/ lehetségesnek tűnik, hogy a gázkezelés a sejtciklust kissé megnyújtja.

BRINKLEY és munkatársai kínai hörcsög sejttenyészetben végzett vizsgálataikban alacsony koncentrációjú kolcemid kezelésnél gyűrűs metafázisokat tapasztaltak. Megállapították, hogy a kromoszómális mikrotubulusok épek, és az alacsony koncentráció a centriolumok pólusokra való vándorlásának akadályozása révén blokkolja a mitózist.

BRINKLEY és RAO a dinitrogén-oxid hatását vizsgálták HeLa sejteken. Szintén beszámoltak a jellegzetes gyűrűs metafázisokról és arra a megállapításra jutottak, hogy a dinitrogén-oxid hatása a kromoszómák rendellenes premitotikus mozgásának eredménye.

In vivo és in vitro vizsgálataim szerint megállapítottam, hogy a dinitrogén-oxid hatása nem "kolhicin" típusu metafázisos blokk, azaz nem a mikrotubulus képzés gátlása révén hat. Elektronmikroszkópos vizsgálattal igazoltam, hogy a sejtekben kromoszómális mikrotubulusok találhatók /13. ábra a,/. Ezt megerősítik a fénymikroszkópos citológiai vizsgálatok is. Például a gyűrűs metafázis létrejötte, amelynek kialakulásához feltétlenül szükségesek a mikrotubulusok /6. ábra/ valamint a kromatidák jellegzetes szétválása is a magorsó jelenlétét igazolja /18. ábra 1-2. kép/.

In vitro körülmények között a dinitrogén-oxid nem károsítja strukturálisan a mikrotubulusokat. Miután a



mitózis során megfigyelhető kromoszómaozgások struktúrális és funkcionális alapját a mikrotubulusok képezik és ezek károsodására utaló jelet nem tapasztaltan; Véleményem szerint a dinitrogén-oxid a magorsó szervező funkcionális zavarát idézi elő. Így hatását feltételezhetően colcemid típusu metafázis blokkolásnak tekintetjük. Figyelembe véve a gátlás reverzibilitását, elképzelhető, hogy a dinitrogén-oxid hatásának további részletes vizsgálata közelebb fihet bennünket a növényi sejtek "centriolum" problémájának megoldásához.

A dinitrogén-oxid kezelés citológiai kísérőjelenéseinek vizsgálata során az irodalmi adatokkal megegyezően megállapítottam, hogy a dinitrogén-oxid kezeléssel poliploid /ÖSTERGREN, 1954, 1957; NYGREN, 1955; KIHARA et al., 1960; TSUNEWAKI, 1962; DVORÁK et al., 1973; SUBRAHMANYAM and KASHA, 1975/ és aneuploid /ÖSTERGREN, 1954, 1957; DVORAK and HARVEY, 1973; DVORAK et al., 1973/ sejtek állíthatók elő, amelyek potenciális eszközként használhatók sejtgenetikai munkák során. Az aneuploidok kialakulása mikronukleusz képződés útján megy végbe, a kezelési idővel arányosan növekszik. A mikronukleuszok száma 6-8 órás kezelési idő alatt ugrásszerűen megnő, míg 12 órától kezdve a kezelés végéig csak fokozatos emelkedés figyelhető meg, jelezve, hogy a dinitrogén-oxid a sej-

teket megközelítőleg 10 óra hosszágig képes metafázisban tartani a kromoszómák dezintegrálódása nélkül. Mikronukleusz képződés már rövid, 2 órás kezelés után is megfigyelhető, mely nyilvánvalóan a kezelés megkezdésekor a mitózisban lévő sejtekre gyakorolt hatás révén valósul meg.

Az egyes kémiai anyagok mikronukleuszt képző, ill. mutagén hatása szoros korrelációt mutat. Ennek felhasználásával az utóbbi évtizedben az eukarióta szervezetek mutagén tesztjének egyik legfontosabb módszere a mikronukleusz teszt lett /BOLLER és SCHMID, 1977/. Figyelembe véve a dinitrogén-oxid igen jelentős mikronukleuszképző hatását, tekintettel a gáz kiterjedt klinikai alkalmazására, feltétlenül szükségesnek látszik a dinitrogén-oxid mutagén hatásának körültekintő, részletes vizsgálata.

Dinitrogén-oxid kezelés hatására megfigyeltet a kromoszóma ill. sejtmag kondenzációs zavarait, melyekről egyértelműen nem dönthető el, hogy mennyiben tekinthető a nyomás, illetve a dinitrogén-oxid specifikus hatása következményének. A gázkezelés megszüntetése után megfigyelhető anafázisos zavarok, elsősorban aszimmetrikus kromoszóma-szétválásban, elmaradó kromoszómákban és anafázisos hidakban nyilvánulnak meg. Ezek a zavarok fontos szerepet játszhatnak az aneuploid képződés mechanizmusában.

6. Összefoglalás

1. Megállapítottam a dinitrogén-oxid metafázisblokkoló hatásának függését a gázkoncentrációtól valamint a kezelési idő hosszától. Legnagyasabb mitotikus aktivitás rozs gyökérmerisztéma sejtekben 6 atm dinitrogén-oxid nyomáson /270 mm cc./ 8 órás kezeléssel érhető el.

2. Vizsgálataim szerint a dinitrogén-oxid hatása reverzibilis. A gázkezelés feloldását követően a metafázisos sejtek azonnal többé-kevésbé normális anafázisba mennek át.

3. Rádioaktív izotópos kísérlettel igazoltam, hogy a dinitrogén-oxidos kezelés ideje alatt a sejtek interfázisában intenzív DNS szintézis folyik, azaz a gázkezelés nem gátolja a sejtek DNS szintézisét.

4. Vizsgálataim alapján kiderült, hogy a dinitrogén-oxid nem károsítja strukturálisan a mikrotubulusokat, a dinitrogén-oxid nem a mikrotubulus képzés gátlása révén hat.

5. A kísérleti eredmények alapján úgy tűnik, hogy a gáz a magorsó szervező funkcionális zavarát idézi elő.

6. A dinitrogén-oxid kezelés citológiai következményeinek vizsgálata során megállapítottam, hogy a gázke-

zeléssel poliploid és aneuploid sejtek állíthatók elő. Az aneuploid sejtek elsősorban mikronukleusz képződés útján jönnek létre. A gázkezelés megszüntetése után megfigyelhető anafázisos zavarok /elmaradó kromoszóma, anafázisos híd stb./ szerepet játszhatnak az aneuploid képződés mechanizmusában.

7. A citológiai vizsgálatok során tapasztalt jelentős mértékű mikronukleusz képződés valószínűsíti, hogy a dinitrogén-oxid mutagén hatása. A gáz klinikai alkalmazása miatt az esetleges mutagén hatás, annak mértékének vizsgálata feltétlenül szükségesnek látszik.



7. Irodalom

- BERNHARD, W., and DE HARVEN, E. 1958: L'ultrastructure de centriole et d'autres elements de l'appareil achromatique. Proc. 4th Internat. Conf. Electron Mikroskopy, 2: 217.
- BESSIS, M., BRETON-GORIUS, J. et THIERY J.P. 1958: Centriole, corps de Golgi et aster des leucocytes. Étude au microscope électronique. Rev. Hématol., 13, 363.
- BIESELE, J.J. 1958: Mitotic poisons and the cancer problem. Elsevier Publishing Co. New York.
- BOLLER, K. and SCHMID, W. 1977: Chemische Mutagenese beim Sanger, Das Knochenmark des Chineschen Hamsters als In-vivo- Testsystem. Humangenetik, 11, 35-54.
- BORISY, G.G. 1967: The mechanism of action of colchicine Colchicine binding to sea urchin eggs and mitotic apparatus. J. Cell Biol., 34: 535-548.
- BORISY, G.G., and TAYLOR E.W. 1967: The mechanism of action of colchicine, binding of colchicine-³H to cellular protein. J. Cell Biol., 34, 525-533.
- BRINKLEY B.R. and RAO P.N. 1973: Nitrous oxide: effects on the mitotic apparatus and chromosome movement in HeLa cells. J. Cell Biol. 58, 96-106.

- BRINKLEY, B.R., STUBBLEFIELD, E. and HSU, T.C. 1967: The effects of colcemid inhibition and reversal on the fine structure of the mitotic apparatus of Chinese hamster cells in vitro. J. Ultrastruct. Res., 19, 1-19.
- BRINKLEY, B.R., STUBBLEFIELD, E. 1970: Ultrastructure and interaction of the kinetochore and centriole in mitosis and meiosis. In: "Advances in Cell Biology", eds. D.M. Prescott et al. 1, 119.
- CLEVELAND, L.R. 1963: Function of flagellata and other centrioles in cell reproduction. In: "The Cell in Mitosis" ed. LEVINE L. Acad. Press, New York-London p. 3-51.
- CLOWES, F.A.L. 1976: The root apex. In: "Cell Division in Higher Plants". ed. YBOMAN, M.M., New York London San Francisco p. 253-285.
- CONGER, A.D. and FAIRCHILD, L.M. 1953: A quick-freeze method for making smear slides permanent. Stain Techn., 28, 281-283.
- DE ROBERTIS, E.D.P., NOWINSKI, W.W., SAEZ F.A. 1974: Sejt-biológia. Akadémiai Kiadó, Budapest. p. 306-322; 362-365.
- DU PRAW, J.E. 1970: DNA and chromosomes. Molecular and cell biology series. Eds. Holt, Rinehart and Winston, New York. p. 58-86

DYER, A.F. 1976: Cell Division in Higher Plants.

Ed. YEOMAN, M.M., London, New York, San Francisco
p. 49-111.

DVORAK, J., HARVEY, B.L. and COULMAN, B.E. 1973: The use
of nitrous oxide for producing eupolyploids and
aneuploids in wheat and barley.

Can. J. Genet. Cytol., 15, 205-215.

EIGSTI, O.J. and DUSTIN, P. 1954: Colchicine in agri-
culture, medicine, biology and chemistry.

Iowa State University Press, Ames. p. 391-429.

FERGUSON, J., HAWKINS, S.W. and DOXEY, D. 1950: C-mitotic
action of some simple gases.

Nature, 165, 1021-1022.

FLEMMING, W. 1879: Beiträge zur Kenntnis der Zelle und
ihrer Lebenserscheinungen.

Arch. microsk. Anat., 16, 302.

FOWKE, L.C., BECH-HANSEN, C.W., CONSTABEL, F. and GAMBORG, O.L.
1974: A comparative study of the ultrastructure of
cultured cells and protoplasts of soybean during cell
division. Protoplasma, 81, 189-203.

GALL, J.G. 1961: Centriole replication. A study of
spermatogenesis in the snail Viviparus.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 10, 163.

- KIHARA, H. and TSUNEWAKI, K. 1960: Production of polyploid wheat by nitrous oxide.
Proc. Japan. Acad. Sci., 36, 658-663.
- KIHLMANN, B.A. 1967: "Actions of chemicals on dividing cells". Prentice Hall, Inc., New York. p. 223-224.
- LEVAN, A. 1938: The effect of colchicine on roots mitosis in Allium.
Hereditas, 24, 471-486.
- LIMA DE FARIA, A. and JAWORSKA, H. 1972: The relation between the chromomere size gradient and the sequence of DNA replication in rye. Hereditas, 70, 39-58.
- MARCHANT, H.J. and PICKETT-HEAPS, J.D. 1972: Ultrastructure and differentiation of Hydrodictyon reticulatum. III: Formation of the vegetative daughter net.
Aust. J. Biol. Sci., 25, 265-278.
- MAZIA, D. 1961: Mitosis and the physiology of cell division.
In: "The cell". Vol. III. Academic Press, New York.
p. 77-394.
- MAZIA, D., and DAN, K. 1952: The isolation and biochemical characterization of the mitotic apparatus of dividing cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 38, 826-834.
- McINTOSH, J.R., HEPLER, P.K., VAN WIE, D.G. 1969: Model of mitosis. Nature, 224, 659.

- McLAUGHLIN, D.J. 1971: Centrosomes and microtubules during meiosis in the mushroom Boletus pubinellus.
J. Cell Biol., 50, 737-745.
- MESSELSON, M. and STAHL, F.W. 1958: The replication of DNA in Escherichia coli. Proc.Nat.Acad.Sci., 44, 671-682.
- NYGREN, A. 1955: Polyploids in Melandrium produced by nitrous oxide. Hereditas, 41, 287-290.
- ÖSTERGREN, G. 1944: Colchicine mitosis chromosome contraction, narcosis and protein chain folding. Hereditas, 30, 429-467.
- ÖSTERGREN, G. 1954: Polyploids and aneuploids of Crepis capillaris produced by treatment with nitrous oxide. Genetica, 27, 54-64.
- ÖSTERGREN, G. 1957: Production of polyploids and aneuploids of Phalaris by means of nitrous oxide. Hereditas, 43, 512-516.
- PICKETT-HEAPS, J.D. 1967: The effects of colchicine on the ultrastructure of dividing plant cells, xylem wall differentiation and distribution of cytoplasmic microtubules. Devl. Biol., 15, 206-236.
- PICKETT-HEAPS, J.D. 1969: The evolution of the mitotic apparatus: an attempt at comparative ultrastructural cytology in dividing plant cells. Cytobios, 1, 257-280.

PICKETT-HEAPS, J.D. 1974: Plant microtubules.

In: "Dynamic aspects of plant ultrastructure". ed.
A.W.Robards, p. 219-255.

RAO, P.N. 1968: Mitotic synchrony in mammalian cells
treated with N_2O high pressure. Science, 160, 774-776.

ROBINOW, C.F. and CATEN, C.E. 1969: Mitosis in Aspergillus
nidulans. J. Cell Sci., 5, 403-431.

SÁRKÁNY S., SZALAI I. 1966: Növény szerkezettani gyakor-
latok. Tankönyvkiadó, Budapest. p. 608.

SHELANSKI, M.L. and TAYLOR, E.W. 1967: Isolation of a protein
subunit from microtubules. J. Cell Biol., 34, 549-555.

SPURR, A.R. 1974: A low-viscosity epoxy resin embedding
medium for electron microscopy.
J. Ultrastruct. Res., 26, /1-2/ 31-34.

STANNERS, C.P., and TILL J.E. 1960: DNA synthesis in
individual L-strain mouse cells. Biochim, Biophys.
Acta, 37, 406-419.

STRASSBURGER, E. 1880: Zellbildung und Zelltheilung.
Gustav Fischer, Jena.

STUBBLEFIELD, E. and BRINKLEY, B.R. 1966: Cilia formation
in Chinese hamster fibroblasts in vitro as a response
to colcemid treatment. J. Cell Biol., 30, 645-652.

SUBRAHMANYAM, N.C. and KASHA, K.J. 1973: Selective chromosomal
elimination during haploid formation in barley following
inter-specific hybridization. Chromosoma, 42, 111-125.

SVÁB, J. 1973: Biometriai módszerek a kutatásban.

Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, p. 25-73.

TAY, W. 1970: Multipolar meiosis in diploid crested wheat grass Acropyron cristatum. Am.J.Bot., 57, 1160-1169.

TAYLOR, E.W. 1965: The mechanism of colchicine inhibition of mitosis. I. Kinetics of inhibition and the binding of H^3 -colchicine. J.Cell Biol., 25, 145-161.

TAYLOR, J.H., WOODS, P.S., HUGHES, W.L. 1957: The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine. Proc.Nat.Acad.Sci., /U.S.A./ 43.p. 122-128.

TAYLOR, J.H. 1958: Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. Genetics, 43, 515-529.

TSUNEWAKI, K. 1962: Production of polyploid wheat by nitrous oxide. II. N_2O -treatment during fertilization with reference to culture media. Seiken Zihō, 14, 14-20.

WATSON, J.D. 1980: A gén molekuláris biológiája.

Medicina, Budapest, p. 27-29; 460-466.

WEINGARTEN, M.D., SUTER, M.M., LITTMANN, D.R., KIRSCHNER, M.W.:

1974: Properties of the depolymerization products of microtubules from mammalian brain.

Biochemistry, 13, 5529-5537.

WILSON, H.G. 1970: Endoplasmic reticulum and microtubule formation in dividing cells of higher plants - a postulate. Planta, 94, 184-190.

M E L L É K L E T E K

I.

t á b l á z a t

I. táblázat

Az alapadatok táblázatba foglalása

I. Nyomáskísérlet

Minták száma	N ₂ O nyomás /atm/	1 atm				2 atm				3 atm				4 atm			
		Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis
1		3,90	1,30	1,45	6,65	4,20	1,65	1,55	7,40	5,00	1,20	1,20	7,40	7,10	3,50	1,20	11,80
2		7,15	1,75	1,85	10,75	4,40	0,90	0,95	6,25	5,40	2,00	0,95	8,35	7,50	3,30	1,00	11,80
3		4,40	1,60	1,70	7,70	3,90	0,50	0,70	5,10	4,45	2,75	0,95	8,15	4,30	2,00	1,00	7,30
4		2,90	0,50	0,65	4,05	4,45	0,60	0,45	5,50	5,45	1,60	1,40	8,45	3,90	2,25	1,80	7,95
5		2,60	0,60	0,55	3,75	3,60	0,60	0,80	5,00	4,60	1,60	0,70	6,90	3,30	2,30	0,20	5,80
6		2,40	1,00	0,50	3,90	3,80	0,70	0,40	4,90	5,50	2,50	1,40	9,40	3,00	1,80	0,40	5,20
7		3,90	1,25	0,45	5,60	5,20	1,45	1,15	7,80	6,90	1,80	0,90	9,60	5,40	3,20	0,60	9,20
8		4,90	1,70	0,20	6,80	3,85	1,25	1,80	6,90	4,30	2,20	1,00	7,50	6,30	1,30	1,20	8,80
9		1,95	1,50	0,20	3,65	6,20	0,95	1,05	8,20	4,00	0,90	1,10	6,00	6,70	2,85	0,85	10,40

I	3,79	1,24	0,84	5,87	4,40	0,96	0,98	6,34	5,06	1,84	1,07	7,97	5,28	2,50	0,92	8,70
s	1,60	0,46	0,65	2,38	0,83	0,41	0,47	1,28	0,88	0,59	0,23	1,16	1,71	0,75	0,48	2,39



Minták száma	N ₂ O nyomás /atm	5 atm				6 atm				7 atm				8 atm			
		Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis
1		6,00	2,70	2,70	11,40	1,90	12,50	0,10	14,50	1,60	6,85	0,05	8,50	1,60	3,10	0,05	4,75
2		4,40	6,30	1,20	11,90	3,60	12,70	0,00	16,30	3,50	4,60	0,00	8,10	1,80	2,95	0,60	5,35
3		5,30	6,20	0,10	11,60	2,60	10,70	0,10	13,40	2,70	8,70	0,60	12,00	1,10	5,50	0,00	6,60
4		3,10	6,80	0,20	7,10	2,50	13,00	0,30	15,80	3,25	8,50	0,10	11,85	2,20	5,50	0,15	7,85
5		4,20	5,80	0,45	10,45	4,10	13,40	0,00	17,50	2,90	8,70	0,00	11,60	2,30	5,10	0,35	7,75
6		2,85	6,70	0,75	10,30	3,00	11,40	0,00	14,40	2,45	8,45	0,00	10,90	2,50	5,15	0,05	7,70
7		6,25	3,75	2,40	12,40	3,95	8,25	1,15	13,35	3,03	7,33	0,60	10,96	2,70	4,60	0,00	7,30
8		3,07	9,81	0,00	12,87	3,20	9,30	0,40	12,90	2,13	7,50	0,00	9,63	2,00	7,55	0,10	9,65
9		2,55	7,55	0,20	10,30	1,50	10,90	0,00	12,40	3,10	5,40	0,80	9,30	3,20	5,40	0,05	8,65

$\bar{x}$		4,19	6,18	0,89	11,26	2,93	11,35	0,23	14,51	2,74	7,34	0,24	10,32	2,16	4,98	0,15	7,29
s		1,40	2,06	1,01	1,00	0,89	1,75	0,38	1,71	0,60	1,49	0,33	1,47	0,62	1,38	0,20	1,53

Minták száma	N ₂ O nyomás /atm/	9 atm				10 atm				11 atm				12 atm			
		Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis
1.		2,75	0,95	0,25	3,95	0,65	2,30	0,05	3,00	2,30	2,70	0,20	5,20	5,80	1,35	0,95	8,10
2		1,75	2,10	0,00	3,85	1,00	2,15	0,10	3,25	1,70	3,90	0,10	5,70	5,55	2,00	1,15	8,70
3		2,30	1,70	0,20	4,20	0,85	1,35	0,15	2,35	2,20	2,10	0,20	4,50	6,00	1,60	1,70	8,80
4		1,50	3,40	0,00	4,90	0,60	4,50	0,10	5,20	2,20	2,70	0,10	5,00	4,50	4,00	0,60	9,10
5		0,90	4,10	0,00	5,00	1,70	3,50	0,00	5,20	2,40	2,70	0,30	5,40	5,35	2,45	0,70	8,50
6		1,10	4,50	0,00	5,60	0,80	2,05	0,00	2,85	1,90	3,40	0,05	5,35	5,55	2,00	1,15	8,70
7		2,65	4,35	0,05	7,05	2,90	0,50	0,65	4,05	1,95	2,80	0,05	4,80	6,40	1,00	1,00	8,40
8		2,35	5,80	0,00	8,15	1,35	1,80	0,00	3,15	2,15	3,50	0,00	5,65	5,40	3,20	0,50	9,10
9		2,45	5,60	0,00	8,05	2,00	3,35	0,00	5,35	2,75	4,65	0,00	7,40	5,70	4,00	0,50	10,20

$\bar{x}$	1,97	3,61	0,06	5,64	1,32	2,39	0,12	3,82	2,17	3,17	0,11	5,44	5,58	2,40	0,86	8,84
s	0,68	1,71	0,10	1,70	0,76	1,21	0,21	1,16	0,31	0,78	0,10	0,83	0,52	1,11	0,29	0,60

II.

t á b l á z a t

II. táblázat

Az alapadatok táblázatba foglalása

II. Időkiegészítő

Idő Minták száma	1 óra				2 óra				3 óra				4 óra			
	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis
1	3,70	7,70	0,00	11,40	3,60	12,70	0,10	16,40	2,50	16,00	0,30	18,80	3,30	16,40	0,00	19,70
2	4,40	7,80	0,00	12,20	2,50	13,00	0,30	15,80	1,00	16,50	0,00	17,50	4,60	13,70	0,00	18,30
3	1,40	7,70	0,10	9,20	4,10	13,40	0,00	17,50	2,60	16,70	0,10	19,40	4,60	20,90	0,00	25,50
4	4,80	9,00	0,00	13,80	3,00	11,40	0,00	14,40	3,09	13,80	0,01	16,90	5,50	20,30	0,00	25,80
5	4,30	8,50	0,00	12,80	3,95	8,25	1,15	13,35	2,40	15,10	0,00	17,20	3,40	14,40	0,00	17,80
6	4,10	7,90	0,20	12,20	1,90	12,50	0,10	14,50	4,80	15,90	0,10	17,90	3,80	13,70	0,00	17,50
$\bar{x}$	3,78	8,10	0,05	11,93	3,18	11,88	0,28	15,33	2,20	15,67	0,09	17,95	4,20	16,57	0,00	20,77
s	1,04	0,49	0,08	1,56	0,79	1,73	0,40	1,77	0,43	0,98	0,11	0,97	0,81	3,00	0,00	3,86

Minták száma	Idő /óra/	6 óra				8 óra				10 óra				12 óra			
		Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis
1		7,40	18,70	0,00	26,10	7,30	20,60	0,00	27,90	7,00	18,40	0,20	25,60	4,10	15,90	0,00	20,00
2		5,20	18,40	0,40	24,00	5,90	21,90	0,00	27,80	5,10	19,30	0,00	24,40	5,70	11,50	0,00	17,20
3		6,60	19,30	0,10	26,00	8,20	22,70	0,20	31,10	3,40	13,80	0,00	17,20	3,20	14,20	0,20	17,60
4		3,70	16,60	0,20	20,50	5,20	22,00	0,00	27,20	3,60	14,80	0,00	18,40	2,30	13,40	0,10	15,80
5		4,40	20,70	0,00	25,10	7,50	20,60	0,00	28,10	5,20	15,70	0,40	21,30	3,00	13,30	0,00	16,30
6		5,10	15,70	0,00	20,80	6,90	22,40	0,00	29,30	4,40	13,00	0,20	17,60	5,80	16,10	0,00	21,90

$\bar{x}$	5,40	18,23	0,12	23,75	6,83	21,70	0,03	28,57	4,78	15,83	0,43	20,75	4,02	14,07	0,05	18,13
s	1,24	1,66	0,15	2,52	1,00	0,82	0,07	1,42	1,20	4,59	0,07	3,61	1,36	1,61	0,07	2,15

Idő /óra/ Minták száma	14 óra				16 óra				18 óra				20 óra			
	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis
1	3,20	15,00	0,00	18,20	2,40	8,60	0,00	11,10	1,20	8,80	0,00	10,00	5,20	13,60	0,00	18,80
2	4,20	12,70	0,00	16,90	3,40	11,90	0,00	15,20	1,60	4,60	0,00	6,20	4,40	13,90	0,00	18,30
3	4,90	10,30	0,00	15,20	2,40	8,90	0,10	11,40	3,30	6,20	0,00	9,30	4,50	11,30	0,00	15,80
4	4,80	9,80	0,00	14,60	1,90	8,40	0,00	10,30	2,30	5,50	0,00	8,00	5,30	12,20	0,00	17,50
5	3,20	15,00	0,00	18,20	3,30	13,30	0,00	16,60	2,00	6,10	0,00	8,10	4,00	15,70	0,00	19,70
6	4,20	10,60	0,00	14,80	1,90	8,40	0,00	10,30	1,60	6,30	0,00	7,90	5,40	11,10	0,00	16,50
$\bar{x}$	4,08	12,23	0,00	16,32	2,55	9,92	0,02	12,48	2,00	6,25	0,00	8,25	4,80	12,97	0,00	17,77
s	0,68	2,15	0,00	1,59	0,58	1,95	0,04	2,48	0,68	1,27	0,00	1,20	0,28	2,60	0,00	1,77

Minták száma	Idő /óra/	22 óra				24 óra				26 óra				28 óra			
		Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis
1		3,10	5,70	0,00	8,80	1,80	1,50	0,00	3,30	1,00	3,10	0,00	4,10	0,10	0,40	0,00	0,50
2		3,00	5,70	0,00	8,70	1,30	1,20	0,00	2,50	0,60	2,30	0,00	2,90	0,70	0,80	0,00	1,50
3		2,80	7,40	0,00	10,20	1,10	0,50	0,00	1,60	1,00	1,50	0,00	2,50	0,30	0,40	0,00	0,70
4		2,10	6,40	0,00	8,50	1,20	1,40	0,00	2,60	0,50	1,20	0,00	1,70	0,30	0,40	0,00	0,70
5		3,20	6,80	0,00	10,00	1,30	2,20	0,00	3,50	0,70	2,10	0,00	2,80	0,20	0,60	0,00	0,80
6		4,00	9,90	0,00	13,90	1,20	0,80	0,00	2,00	1,00	2,30	0,00	3,30	0,10	0,80	0,00	0,90
$\bar{x}$		3,03	6,98	0,00	10,02	1,32	1,27	0,00	2,58	0,80	2,08	0,00	2,88	0,28	0,57	0,00	0,85
s		0,32	2,06	0,00	3,44	0,05	0,29	0,00	0,44	0,21	0,61	0,00	0,73	0,20	0,18	0,00	0,31

Minták száma \ Idő /óra/	30 óra				32 óra				34 óra			
	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis
1	0,40	0,50	0,00	0,90	0,60	1,00	0,00	1,60	0,50	1,80	0,00	2,30
2	0,10	0,95	0,00	1,05	0,40	0,90	0,00	1,30	1,80	3,30	0,00	5,10
3	0,70	1,00	0,00	1,70	0,50	1,70	0,00	2,20	2,80	1,50	0,00	4,30
4	0,90	1,25	0,00	2,25	1,10	1,60	0,00	2,70	0,90	1,00	0,00	1,90
5	0,70	1,40	0,00	2,10	0,60	0,40	0,00	1,00	2,00	3,40	0,00	5,40
6	0,80	0,80	0,00	1,60	0,80	0,70	0,00	1,50	2,30	1,60	0,00	3,90

$\bar{x}$	0,60	1,00	0,00	1,60	0,67	1,05	0,00	1,72	1,72	2,10	0,00	3,82
s	0,27	0,28	0,00	0,50	0,23	0,46	0,00	0,57	0,79	0,92	0,00	1,31

III

t á b l á z a t

III. táblázat

Az alapadatok táblázatba foglalása

III. Visszatérés kísérlet

Idő /óra,perc Minták száma	0 óra, 00 perc				0 óra, 30 perc				1 óra, 00 perc				1 óra, 30 perc			
	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis
1	7,30	20,60	0,00	27,90	4,85	11,45	8,90	25,20	2,80	1,20	9,70	13,70	6,90	2,00	5,70	14,60
2	5,90	21,90	0,00	27,80	4,55	13,05	6,25	23,85	3,60	2,30	6,50	12,40	10,20	0,80	5,30	16,10
3	8,20	22,70	0,20	31,10	6,85	10,95	6,75	24,55	3,30	1,90	8,40	13,60	7,90	1,30	2,70	11,90
4	5,20	22,00	0,00	27,20	7,80	6,10	9,30	23,20	4,20	2,10	9,00	15,30	7,50	1,50	3,50	12,50
5	7,50	20,60	0,00	28,10	7,80	5,50	8,20	21,50	4,40	2,80	8,40	15,60	5,10	1,90	3,40	10,40
6	6,90	22,40	0,00	29,30	4,10	10,00	4,30	18,40	4,80	3,00	9,60	17,40	6,40	1,70	4,20	12,30
$\bar{x}$	6,84	21,70	0,03	28,57	5,89	9,51	7,28	22,78	3,85	2,22	8,60	14,67	7,34	1,53	4,13	12,97
s	1,00	0,82	0,07	1,30	1,63	3,04	1,89	2,49	0,75	0,65	1,17	1,79	1,71	0,44	1,17	2,04

Idő /óra,perc/ Minták száma	2 óra, 00 perc				3 óra, 00 perc				4 óra, 00 perc				5 óra, 00 perc			
	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis
1	10,90	1,70	1,70	14,30	2,90	2,00	3,40	8,30	3,30	0,70	2,90	6,90	5,90	2,20	1,90	10,00
2	8,00	3,00	2,71	13,70	4,10	2,80	2,70	9,60	3,20	1,80	2,50	7,50	5,50	1,40	1,90	8,80
3	4,40	1,80	3,50	9,70	5,30	1,20	3,10	9,60	4,60	1,40	2,30	8,30	4,80	2,40	1,90	9,10
4	4,40	1,50	3,70	9,60	5,10	3,00	3,30	11,40	5,20	1,20	1,40	7,80	5,20	1,20	1,80	8,20
5	3,60	2,00	3,70	9,30	5,60	1,40	3,10	10,10	2,50	1,50	2,00	6,00	4,55	1,39	1,67	7,61
6	7,55	2,75	2,70	13,00	6,50	2,20	3,40	12,00	3,30	1,30	2,70	7,30	5,06	1,60	1,97	8,63

$\bar{x}$	6,48	2,12	3,00	11,60	4,90	2,10	3,17	10,17	3,68	1,32	2,30	7,30	5,17	1,68	1,86	8,72
s	2,83	0,61	0,79	2,30	1,23	0,72	0,27	1,34	1,01	0,37	0,54	0,79	0,48	0,49	0,11	0,81

Idő /óra,perc/ Minták száma	6 óra, 00 perc				7 óra, 00 perc				8 óra, 00 perc				9 óra, 00 perc			
	pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis
1	3,60	0,90	1,50	6,00	2,60	0,50	1,20	4,30	1,50	0,70	0,60	2,80	2,20	0,40	1,20	3,80
2	3,50	0,90	1,10	5,50	2,00	0,50	0,80	3,30	1,60	0,60	0,00	2,20	3,70	0,90	0,80	5,40
3	3,20	1,00	2,00	6,20	2,30	0,80	1,20	4,30	1,00	0,50	0,10	1,60	1,20	0,90	0,20	2,30
4	2,50	0,90	1,30	4,70	1,80	1,40	1,20	4,40	1,60	0,70	0,40	2,70	2,60	0,40	0,20	3,20
5	4,20	1,90	1,30	7,40	2,10	0,30	0,70	3,10	1,80	0,20	0,10	2,10	1,90	0,30	0,50	2,70
6	1,80	0,80	0,60	3,20	2,30	0,80	1,10	4,20	1,90	0,50	0,10	2,50	2,10	0,70	0,60	3,40

$\bar{x}$	3,13	1,07	1,30	5,50	2,18	0,72	1,03	3,93	1,57	0,53	0,22	2,32	2,28	0,60	0,58	3,47
s	0,86	0,41	0,46	1,43	0,28	0,39	0,23	0,54	0,31	0,19	0,23	0,44	0,83	0,27	0,38	1,08

Mintak Id6 /ore, pere/	10 ore, 00 pere						11 ore, 00 pere						12 ore, 00 pere						13 ore, 00 pere					
	Pro- fazis	Meta- fazis	Ana- fazis	Mit6- zis	Pro- fazis	Meta- fazis	Ana- fazis	Mit6- zis	Pro- fazis	Meta- fazis	Ana- fazis	Mit6- zis	Pro- fazis	Meta- fazis	Ana- fazis	Mit6- zis	Pro- fazis	Meta- fazis	Ana- fazis	Mit6- zis				
1	4,30	2,40	1,40	8,10	2,00	0,80	0,70	3,50	2,50	0,10	0,20	2,80	1,50	0,80	0,00	2,30								
2	7,70	2,10	1,70	11,50	2,60	1,30	0,80	4,70	3,90	1,10	1,00	6,00	1,80	0,70	0,20	2,70								
3	6,30	1,60	3,00	10,90	2,30	0,90	1,50	4,70	4,60	1,00	1,30	6,90	5,60	0,20	0,50	6,30								
4	9,40	2,10	2,60	14,20	2,90	1,00	0,80	4,70	6,10	1,20	1,30	8,70	1,00	1,00	0,10	2,10								
5	11,20	2,00	4,80	18,00	3,40	1,40	5,20	6,00	2,50	0,80	0,70	3,90	5,20	1,50	0,70	7,40								
6	3,70	1,20	1,30	6,20	1,60	0,70	0,50	2,80	5,30	1,40	1,80	8,50	3,00	1,10	0,90	5,00								
<u>X</u>	7,10	1,90	2,47	11,47	2,47	1,02	0,92	4,40	4,15	0,93	1,05	6,13	3,02	0,88	0,40	4,30								
9	2,92	0,43	1,33	4,22	0,64	0,28	0,37	1,11	1,47	0,48	0,51	2,40	1,96	0,44	0,36	2,26								

Idő /óra,perc/ Minták száma	14 óra, 00 perc				15 óra, 00 perc				16 óra, 00 perc				17 óra, 00 perc			
	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis
1	4,20	0,60	0,50	5,30	8,70	3,40	2,00	14,10	3,80	1,30	0,30	5,40	3,40	1,10	1,40	5,90
2	3,30	1,30	0,80	5,40	11,70	2,90	2,90	17,50	4,90	1,50	1,00	7,40	3,90	0,70	1,10	5,70
3	4,30	0,60	0,40	5,30	9,40	2,00	2,10	13,50	3,80	0,80	0,70	5,30	5,00	1,20	0,20	6,40
4	4,70	1,60	0,80	7,10	7,90	2,10	1,90	11,90	4,40	0,70	0,70	5,80	5,60	0,70	0,30	6,60
5	4,50	0,60	1,10	6,20	14,90	4,40	3,50	22,80	4,60	1,00	1,10	6,70	4,90	0,60	0,30	5,80
6	6,80	0,50	1,10	8,40	8,70	2,20	1,70	12,60	3,20	0,50	0,50	4,20	3,20	0,70	0,70	4,60

$\bar{x}$	4,63	0,87	0,78	6,28	10,22	2,83	2,35	15,40	4,12	0,97	0,72	5,80	4,33	0,83	0,67	5,83
s	1,17	0,46	0,29	1,25	2,64	0,94	0,70	4,11	0,63	0,38	0,30	1,13	0,97	0,25	0,49	0,70

Minták száma \ Idő /óra,perc/	18 óra 00 perc				19 óra, 00 perc				20 óra, 00 perc				21 óra, 00 perc			
	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis	Pro- fázis	Meta- fázis	Ana- fázis	Mitó- zis
1	4,50	0,50	1,90	6,90	4,30	0,20	0,90	5,40	5,50	2,00	1,00	8,50	4,10	1,20	1,40	6,70
2	5,70	1,50	2,00	9,20	3,10	0,10	0,00	3,20	5,70	1,60	1,40	8,70	8,80	1,00	1,30	21,10
3	4,90	1,30	1,80	8,00	3,30	0,30	0,60	4,20	9,70	0,80	1,70	12,20	5,10	1,50	1,80	8,40
4	5,00	1,90	0,70	7,60	2,80	0,90	0,20	3,90	6,90	1,70	0,80	9,40	8,60	1,50	1,30	11,40
5	4,70	1,00	1,40	7,10	3,80	0,80	0,40	5,00	8,00	1,30	1,30	10,60	3,60	1,30	1,00	5,90
6	5,60	1,80	2,00	9,40	1,20	0,00	0,20	1,40	8,80	1,60	1,50	11,90	5,00	1,20	1,80	8,00

$\bar{x}$	5,07	1,33	1,63	8,03	3,08	0,38	0,38	3,85	7,43	1,50	1,28	10,22	5,87	1,28	1,43	8,58
s	0,48	0,52	0,51	1,06	1,06	0,38	0,33	1,43	1,69	0,41	0,33	1,60	2,27	0,19	0,31	2,25