

Mieczysław Rozmus, Józef Krawczyk, Andrzej Komaś,
Maria Drewniak, Marian Kobrzyński

Metody pomiaru cyklu życiowego komórki

Streszczenie

Cykl komórkowy jest czasem życia jednego pokolenia komórek, trwającym od jednego podziału do następnego. Zależy on od gatunku, rodzaju komórek i warunków środowiska. W cyklu komórkowym zachodzi cały szereg skomplikowanych procesów zarówno w jądrze jak i w cytoplazmie.

Dokonano przeglądu bezpośrednich i pośrednich metod pomiaru czasu trwania cyklu komórkowego. Przeanalizowano aktywność mitotyczną w cyklu dobowym w komórkach merystematycznych stożków wzrostu korzeni u 6 gatunków roślin: *Vicia sativa* L., *Vicia villosa* Roth, *Lupinus angustifolius* L., *Lupinus polyphyllus* Ldl, *Brassica oleracea* L. var. *capitata* (biała wczesna), *Allium cepa* L.

Wstęp

Cykl komórkowy jest to szereg zmian fizycznych i chemicznych zachodzących w komórce między kolejnymi jej podziałami. Rozpoczyna się w momencie zakończenia cytokinezy. Powstałe komórki posiadają informację genetyczną, która daje jej szansę na przeżycie, spełnienie jej określonych funkcji życiowych. Wśród cytologów panuje powszechne przekonanie, że poznanie prawidłowego przebiegu procesu podziału komórki jest jednym z podstawowych problemów biologii (Dirksen 1978).

Cykl życiowy komórki somatycznej obejmuje dwa okresy: interfazę i podział jądra oraz cytoplazmy; w wyniku tych procesów powstają dwie komórki potomne. Następstwo tych faz powtarza się w każdym pokoleniu. Długość cyklu życiowego zależy od typu komórek. W tkance merystematycznej podziały zachodzą często i dlatego komórki te mają krótki cykl życiowy, u innych zaś interfaza trwa bardzo długo, nieraz tak długo jak życie organizmu np. komórki nerwowe (Olszewska 1971; Kłyszajko-Stefanowicz 1995).

Interfaza została podzielona na trzy fazy; G₁, S i G₂. Faza G₁ zwana jest inaczej okresem posttelofazowym i rozpoczyna się zaraz po zakończeniu podziału. Jest to decydujący

moment, w którym komórka „podejmuje decyzję”, czy przygotowuje się do kolejnego podziału, czy też pozostaje w fazie G₁ i będzie się różnicowała w tkankę stałą. Pewne dane wskazują, że los komórek zostaje ustalony w czasie poprzedniego cyklu. W fazie S i G₂ oraz mitozie zdeterminowana zostaje ekspresja genów aktywnych w następnym cyklu życiowym (Wheatley 1986).

Pomiary cyklu komórkowego opierają się na bezpośredniej obserwacji procesów życiowych zachodzących w komórce lub na obliczeniu indeksu mitotycznego.

Metody pomiaru cyklu życiowego komórki

A. Obserwacja przyżyciowa

Bezpośrednie pomiary czasu trwania cyklu życiowego komórek mogą być dokonane poprzez obserwację przyżyciową komórek pod mikroskopem. Jest to jednak metoda bardzo uciążliwa, ponieważ wymaga ciągłej i długiej pracy przy mikroskopie. Pewnym udoskonaleniem tej metody jest zastosowanie kamery do zdjęć poklatkowych. Stosując technikę zdjęć poklatkowych, w latach pięćdziesiątych sfilmowano przebieg mitozy (Bajer 1954). Kamera filmowa wykonuje 25 zdjęć w ciągu sekundy i z tą samą prędkością odbywa się projekcja filmu. Przy tej prędkości wyświetlania oko nasze nie rejestruje pojedynczych obrazów tylko efekt ruchu. W przypadku filmowania bardzo długich procesów, charakteryzujących się powolnymi zmianami, zdjęcia wykonuje się w znacznie większych odstępach. Po wywołaniu, film jest odtwarzany z normalną prędkością. Mnożąc czas trwania filmu przez czas, w którym wykonywano zdjęcia i prędkość projekcji (mierzona ilością obrazów wyświetlanych na sekundę) wyliczymy rzeczywisty czas trwania procesu mitozy.

Przykład: projekcja filmu pt. *Mitoza* trwa dziesięć minut. Zdjęcia wykonano techniką poklatkową, w odstępach trzydziestosekundowych. Rzeczywisty czas trwania mitozy można obliczyć następująco.

$$10 \text{ min.} \times 0,5 \text{ min.} \times 25 = 125 \text{ min.}$$

W badanym materiale mitoza trwa 125 minut.

Ze względu na przyspieszenie dostrzegalne stają się powolne ruchy struktur komórkowych niewidoczne w bezpośredniej obserwacji. Obok niewątpliwych zalet metoda ta posiada wiele ograniczeń. Obserwacje muszą być przeprowadzone *in vitro* na obiektach jednokomórkowych lub na kulturach tkankowych jednowarstwowych. W komórkach merystematycznych roślin, bezpośrednia obserwacja jest niemożliwa. Stosowane są inne metody obliczenia czasu trwania cyklu życiowego.

B. Znakowanie izotopami promieniotwórczymi

Izotopy promieniotwórcze wprowadza się do komórki w postaci prekursorów DNA. Najczęściej jest to znakowana tymidyna, specyficzny składnik DNA. Znakowanym pierwiastkiem jest wodór (³H) lub węgiel (¹⁴C). W metodzie tej zakłada się, że komórka nie odróżnia podawanych w pożywce izotopów promieniotwórczych i że związki zawierające radioaktywne izotopy pierwiastków nie wpływają na procesy komórkowe. Hodowlę przenosi-

my na krótki okres czasu do pożywki ze znakowaną tymidyną. Radioaktywną zasadę azotową wbudowują w swoje DNA tylko te komórki, które znajdują się w fazie S. Po ponownym umieszczeniu hodowli w nie radioaktywnym środowisku, utrwalamy części materiału w określonych odstępach czasu. Metodą autoradiograficzną identyfikujemy znakowane mitozy. Początkowo na autoradiogramach nie wykrywa się znakowanych jąder w stadium mitozy, ponieważ komórki nie ukończyły fazy G₂. Pojawienie się sygnału na błonie fotograficznej potwierdzające obecność radioaktywnych mitoz pozwala określić średni czas trwania fazy S i G₂. Metoda znakowania izotopami została omówiona szczegółowo przez Aheme (1977).

C. Obliczenie wartości indeksu mitotycznego

Indeks mitotyczny jest to procent komórek w stadium mitozy obliczony w stosunku do wszystkich komórek danej tkanki. Umożliwia on obliczenie względnego czasu trwania mitozy w stosunku do czasu trwania całego cyklu komórkowego. Opiera się na założeniu, że liczba komórek będących w stadium podziału jest wprost proporcjonalna do czasu trwania mitozy. Jest to metoda najprostsza, najczęściej stosowana w odniesieniu do komórek merystematycznych, w których bezpośrednia obserwacja procesów podziałowych jest niemożliwa.

Poniżej omówiono metodę pomiaru cyklu życiowego komórki, opartą na obliczeniu wartości indeksu mitotycznego w cyklu dobowym. Obliczenie czasu trwania cyklu życiowego komórki na podstawie wartości indeksu mitotycznego jest metodą prostą. Pomimo pewnych niedoskonałości (wynik w jednostkach względnych) jest ona powszechnie stosowana w badaniu efektów wpływu inhibitorów i stymulatorów na procesy podziałowe (Jagoda 1980; Klein 1994).

Materiał i metody

Doświadczenie przeprowadzono na stożkach wzrostu korzeni gatunków następujących roślin: *Vicia sativa* L., *Vicia villosa* Roth, *Lupinus angustifolius* L., *Lupinus polyphyllus* Ldl, *Brassica oleracea* L. var. *capitata* (biała wczesna), *Allium cepa* L. Materiał badawczy w postaci nasion uzyskano ze stacji Oceny Nasion w Krakowie. Hodowle prowadzono na bibule filtracyjnej zwilżonej wodą destylowaną, na szalkach Petriego w temperaturze pokojowej. Stożki wzrostu korzeni siewek utrwalano w utrwalaczu Carnoy'a o godzinach: 3⁰⁰, 6⁰⁰, 9⁰⁰, 12⁰⁰, 15⁰⁰, 18⁰⁰, 21⁰⁰ i 24⁰⁰. W każdej próbie pobierano losowo po 15 korzeni. Z przygotowanego materiału wykonano preparaty rozgniotowe, barwione metodą Feulgena. Przeanalizowano co najmniej 36 000 komórek merystematycznych dla każdego gatunku i na tej podstawie obliczono indeks mitotyczny. Eksperyment przeprowadzono w zimie (styczeń, luty) w latach 1972–1976, w ramach realizacji tematów prac magisterskich na studiach zaocznych i dziennych.

Wyniki i ich interpretacja

Szczegółowe dane dotyczące zmian indeksu mitotycznego w cyklu dobowym przedstawiono w tabeli 1–6 i fig. 1–6.

Godziny	Ogólna liczba komórek	Liczba mitoz	Indeks fazowy				Indeks mitotyczny
			profaza	metafaza	anafaza	telofaza	
3	7500	507	189 2,5%	72 1,0%	39 0,5%	207 2,8%	6,8%
6	7500	654	237 3,2%	93 1,2%	51 0,7%	273 3,6%	8,7%
9	7500	603	216 2,9%	69 0,9%	30 0,4%	186 3,8%	8,0%
12	7500	702	396 5,3%	78 1,0%	42 0,6%	183 2,5%	9,4%
15	7500	786	489 6,5%	60 0,8%	30 0,7%	282 2,4%	10,5%
18	7500	753	342 4,6%	99 1,3%	30 0,4%	282 3,8%	10,0%
21	7500	747	324 4,3%	138 1,8%	102 1,4%	183 2,4%	9,7%
24	7500	573	213 2,8%	87 1,2%	48 0,6%	225 3,0%	7,6%
Suma	60000	5325	2406	696	396	1827	
Średnia			4,0%	1,2%	0,7%	3,0%	8,9%

Tabela 1. Ilościowy i procentowy udział dzielących się komórek w meryście wierzchołkowym korzeni *Vicia sativa* L. w cyklu dobowym

Godziny	Ogólna liczba komórek	Liczba mitoz	Indeks fazowy				Indeks mitotyczny
			profaza	metafaza	anafaza	telofaza	
3	7500	339	174 2,3%	78 1,0%	39 0,5%	48 0,6%	4,5%
6	7500	432	168 2,5%	120 1,6%	66 0,9%	60 0,8%	5,8%
9	7500	567	315 4,2%	117 1,6%	78 1,0%	57 0,8%	7,6%
12	7500	744	411 5,5%	111 1,5%	102 1,4%	120 1,6%	9,9%
15	7500	642	2,55 3,4%	153 2,0%	117 1,6%	117 1,6%	8,5%
18	7500	372	186 2,5%	75 1,0%	63 0,8%	48 0,6%	5,0%
21	7500	303	102 1,4%	51 0,7%	60 0,8%	90 1,2%	4,0%
24	7500	285	114 1,5%	72 1,0%	26 0,5%	63 0,8%	3,8%
Suma	60000	3684	1743	777	561	1228	
Średnia			2,9%	1,3%	0,9%	1,0%	6,1%

Tabela 2. Ilościowy i procentowy udział dzielących się komórek w meryście wierzchołkowym korzeni *Vicia villosa* Roth w cyklu dobowym

Godziny	Ogólna liczba komórek	Liczba mitoz	Indeks fazowy				Indeks mitotyczny
			profaza	metafaza	anafaza	telofaza	
3	4500	219	96 2,1%	69 1,5%	30 0,7%	24 0,5%	4,9%
6	4500	108	33 0,7%	30 0,7%	33 0,7%	12 0,3%	2,4%
9	5116	292	138 2,7%	76 1,5%	39 0,8%	39 0,8%	5,7%
12	4500	399	171 3,8%	96 2,1%	81 1,8%	51 1,1%	8,9%
15	4496	242	98 2,2%	69 1,5%	24 0,5%	51 1,1%	5,4%
18	4500	159	69 1,5%	48 1,1%	12 0,3%	30 0,7%	3,5%
21	4500	195	111 2,5%	42 0,9%	18 0,4%	24 0,5%	4,3%
24	4568	281	141 3,1%	63 1,4%	35 0,8%	42 0,9%	6,1%
Suma	36680	1895	857	439	172	171	
Średnia			2,3%	1,3%	0,7%	0,7%	5,2%

Tabela 3. Ilościowy i procentowy udział dzielących się komórek w merystemie wierzchołkowym korzeni *Brassica oleracea* L. w cyklu dobowym

Godziny	Ogólna liczba komórek	Liczba mitoz	Indeks fazowy				Indeks mitotyczny
			profaza	metafaza	anafaza	telofaza	
3	9970	410	76 0,8%	96 1,0%	90 0,9%	148 1,5%	4,1%
6	9920	600	108 1,1%	208 2,1%	148 1,5%	136 1,4%	6,0%
9	10000	516	140 1,4%	128 1,3%	104 1,0%	144 1,4%	5,2%
12	10000	1020	116 1,2%	328 3,3%	320 3,2%	256 2,6%	10,2%
15	10000	844	304 3,0%	224 2,2%	200 2,0%	116 1,2%	8,4%
18	10000	748	204 2,0%	300 3,0%	152 1,5%	92 0,9%	7,5%
21	10028	348	52 0,5%	112 1,1%	84 0,8%	100 1,0%	3,5%
24	10000	808	176 1,8%	312 3,1%	172 1,7%	148 1,5%	8,1%
Suma	79918	5294	1176	1708	1270	1140	
Średnia			1,5%	2,1%	1,6%	1,4%	6,6%

Tabela 4. Ilościowy i procentowy udział dzielących się komórek w merystemie wierzchołkowym korzeni *Lupinus angustifolius* L. w cyklu dobowym

Godziny	Ogólna liczba komórek	Liczba mitoz	Indeks fazowy				Indeks mitotyczny
			profaza	metafaza	anafaza	telofaza	
3	4500	336	222 4,9%	36 0,8%	42 0,9%	36 0,8%	7,5%
6	4500	267	156 3,5%	51 1,1%	39 0,9%	21 0,5%	5,9%
9	4500	432	264 5,9%	63 1,4%	57 1,3%	48 1,1%	9,6%
12	4500	510	285 6,3%	105 2,3%	78 1,7%	42 0,9%	11,3%
15	4500	369	201 4,5%	90 2,0%	42 0,9%	36 0,8%	8,2%
18	4500	369	222 4,9%	60 1,3%	54 1,2%	33 0,7%	8,2%
21	4500	468	267 5,9%	84 1,9%	75 1,7%	49 0,9%	10,4%
24	4500	300	162 3,6%	57 1,3%	63 1,4%	18 0,4%	6,7%
Suma	12000	3051	1779	546	450	92	
Średnia			4,9%	1,5%	1,2%	0,8%	8,5%

Tabela 5. Ilościowy i procentowy udział dzielących się komórek w merystemie wierzchołkowym korzeni *Lupinus polyphyllus* Ldl w cyklu dobowym

Godziny	Ogólna liczba komórek	Liczba mitoz	Indeks fazowy				Indeks mitotyczny
			profaza	metafaza	anafaza	telofaza	
3	17903	726	426 2,4%	123 0,7%	58 0,3%	726 0,7%	4,1%
6	17697	841	527 3,0%	119 0,7%	72 0,4%	841 0,7%	4,7%
9	17501	1067	754 4,3%	107 0,6%	75 0,4%	1067 0,7%	6,1%
12	17878	1621	1166 6,5%	172 1,0%	127 0,7%	1621 0,9%	9,1%
15	17451	1354	882 5,0%	171 1,0%	199 0,6%	1354 1,1%	7,8%
18	17536	1182	775 4,4%	162 0,9%	154 0,5%	1182 0,9%	6,7%
21	17816	922	446 2,5%	178 1,0%	187 0,6%	922 1,0%	5,2%
24	17679	678	402 2,3%	96 0,5%	102 0,4%	678 0,6%	3,8%
Suma	133067	8391	5378	1128	714	1171	
Średnia			3,8%	0,8%	0,5%	0,8%	5,9%

Tabela 6. Ilościowy i procentowy udział dzielących się komórek w merystemie wierzchołkowym korzeni *Allium cepa* L. w cyklu dobowym

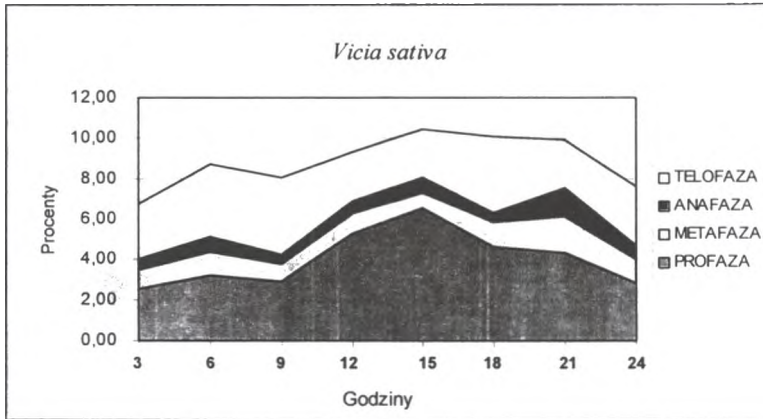


Fig. 1. Wartości indeksu mitotycznego dla komórek merystemu stożków wzrostu korzeni *Vicia sativa* L. w cyklu dobowym

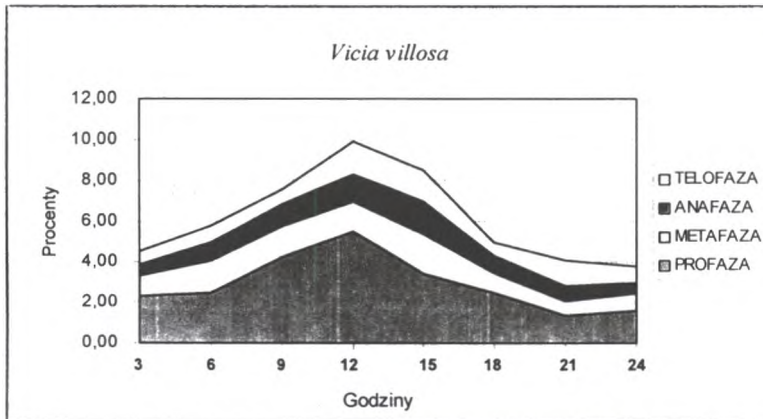


Fig. 2. Wartości indeksu mitotycznego dla komórek merystemu stożków wzrostu korzeni *Vicia villosa* Roth w cyklu dobowym

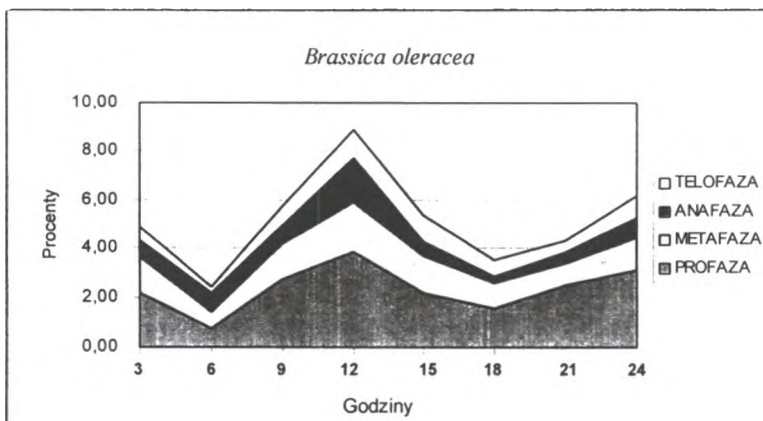


Fig. 3. Wartości indeksu mitotycznego dla komórek merystemu stożków wzrostu korzeni *Brassica oleracea* L. w cyklu dobowym

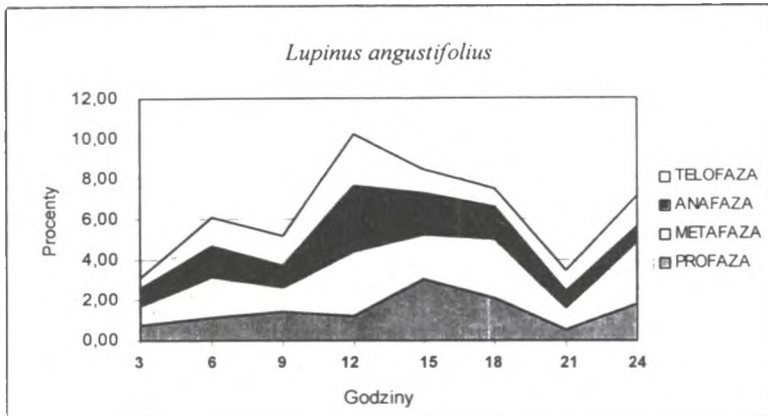


Fig. 4. Wartości indeksu mitotycznego dla komórek merystemu stożków wzrostu korzeni *Lupinus angustifolius* L. w cyklu dobowym

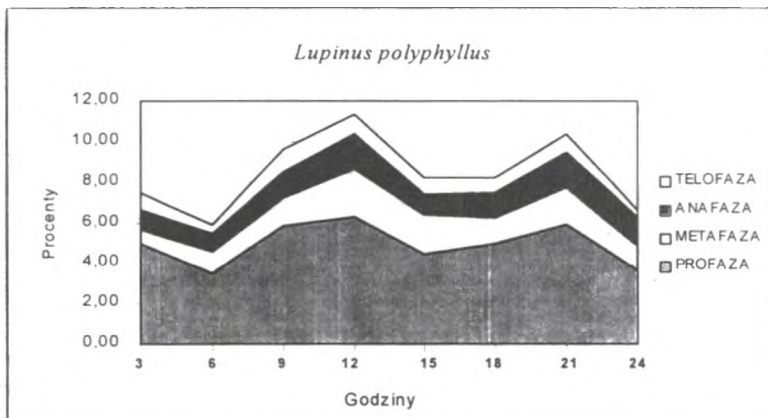


Fig. 5. Wartości indeksu mitotycznego dla komórek merystemu stożków wzrostu korzeni *Lupinus polyphyllus* Ldl w cyklu dobowym

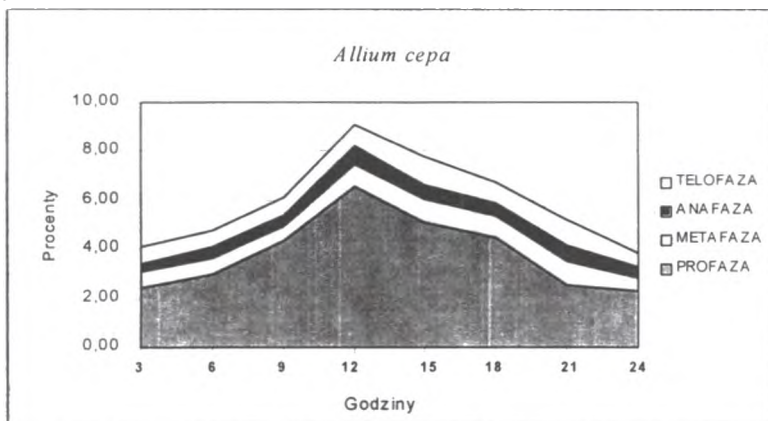


Fig. 6. Wartości indeksu mitotycznego dla komórek merystemu stożków wzrostu korzeni *Allium cepa* L. w cyklu dobowym

Badając zmiany wartości indeksu mitotycznego w cyklu dobowym, stwierdzono różną liczbę jąder podziałowych w zależności od pory utrwalania. Najwyższe wartości indeksu mitotycznego zaobserwowano w stożkach wzrostu korzeni utrwalanych w godzinach południowych. W merystemach korzeniowych *Vicia villosa* Roth, *Lupinus angustifolius* L., *Lupinus polyphyllus* Ldl, *Brassica oleracea* L. var. *capitata* (biała wczesna), *Allium cepa* L., szczyt podziałowy przypada dokładnie na godzinę 12⁰⁰ i na wykresie jest wyraźnie zaznaczony w formie piku (fig. 2–6, tabela 2–6).

Natomiast w przypadku merystemu korzeniowego u *Vicia sativa* L. nie ma wyraźnie zaznaczonego maksimum podziałowego, a wartości indeksu mitotycznego w ciągu doby wykazują niewielkie wahania (fig. 1, tabela 1). Różnica między wartościami maksymalną i minimalną nie przekracza 4%. Największe wartości indeksu mitotycznego uzyskano dla materiału pobranego w godzinach popołudniowych i wieczornych (15⁰⁰, 18⁰⁰, 21⁰⁰). Ustalono dwa maksima podziałowe dla dwu badanych gatunków łubinu i kapusty. Drugi szczyt podziałowy w łubinie trwałym (*Lupinus polyphyllus* Ldl) wystąpił o godzinie 18⁰⁰, natomiast w łubinie wąskolistnym (*Lupinus angustifolius* L.) o 21⁰⁰. W merystemach korzeniowych kapusty (*Brassica oleracea* L.) najwięcej podziałów stwierdzono w materiale utrwalonym w południe (8,9%) i o północy (6,1%). Wystąpienie szczytów podziałowych wskazuje na krótszy cykl komórkowy, związany z małą ilością DNA. U wymienionych trzech gatunków 2C DNA w jądrze nie przekracza 5pg. (Olszewska 1981). U wyki i cebuli, u których poziom DNA w jądrze wynosi około 30pg. (Olszewska 1981), brak jest drugiego wyraźnego szczytu podziałowego.

Najniższą aktywność mitotyczną obserwowano w preparatach wykonanych ze stożków wzrostu utrwalanych po północy. Wyjątek stanowiły korzenie kapusty i łubinu wąskolistnego, dla których najniższe wartości indeksu mitotycznego przypadają na inne godziny. U kapusty minimum przypada na 6⁰⁰, a dla łubinu wąskolistnego – na 18⁰⁰.

Udział poszczególnych faz mitozy w procesie podziałowym jest zróżnicowany w zależności od gatunku. Najdłużej trwającą fazą jest profaza. Szczególnie wyraźnie widoczne są różnice między profazą a pozostałymi fazami w przypadku merystemów korzeniowych *Allium cepa* L., i *Lupinus polyphyllus* Ldl (fig. 5, 6, tabela 5, 6). Proporcje te zgodne są z danymi z literatury (Olszewska 1971; Kawiak 1992; Kłyszajko 1995).

Czas trwania pozostałych faz jest w ogólności zbliżony u wszystkich badanych gatunków za wyjątkiem *Vicia sativa* L., gdzie stwierdzono zdecydowanie dłuższy czas trwania telofazy (fig. 1).

Literatura

- Aherne W.A., Camplejohn R.S., Wright N.A. (1977), *An introduction to cell population kinetics*, Edward Arnold, Londyn
- Bajer A. (1954), *Cine-micrographic studies on mitosis in endosperm. I*, Acta Soc. Bot. Polon. 22: 653
- Dirksen R., Prescott D., Fox C. (1978), *Cell reproduction in honor of Daniel Mazia*, Academic Press, New York
- Jagoda M. (1980), *Cytological disturbances in Allium cepa L. root – meristems induced by herbicides*, Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. XXII/2: 189–211
- Kawiak J., Mirecka M., Olszewska M., Warchoła J. (1992), *Podstawy cytofizjologii*, PWN, Warszawa
- Klein M. (1994), *Zmiany cytogenetyczne u roślin wywołane stosowaniem pestycydów oraz metody ich testowania*, Hodowla Roślin i Nasiennictwo 2: 10–13
- Kłyszewko–Stefanowicz L. (1995), *Cytobiochemia*, PWN, Warszawa
- Olszewska M. (1971), *Cytologia roślin*, PWN, Warszawa
- Olszewska M. (1981), *Metody barwienia chromosomów*, PWRiL, Warszawa
- Wheatley D.N. (1986), *Wzrost i podział komórki*, PWRiL, Warszawa