บทนำ

การแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิสเป็นการแบ่งนิวเคลียสแบบหนึ่งที่ทำให้นิวเคลียสใหม่ที่ได้มีจำนวนชุดโครโมโซมเท่ากับนิวเคลียสเดิม โดยปกติการแบ่งนิวเคลียสแต่ละครั้งมักจะติดตามด้วยการแบ่งเซลล์ แต่ละเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่จึงมีลักษณะทางกรรมพันธุ์เหมือนเซลล์เดิมทุกประการ

Morphology ของไมโตซิส

ในปี ค.ศ. ๑๘๘๒ Fleming ได้อธิบายไมโตซิสถึงวิธีการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสในการแบ่งออกเป็นสอง daughter nuclei ในการศึกษาพฤติการของการแบ่งนี้เป็นการศึกษาจากเซลล์ที่ fix และย้อมสีแล้ว เขาได้แบ่งแยกไมโตซิสออกเป็นระยะต่างๆตามลักษณะของโครโมโซมที่พบ ปัจจุบันนี้มีผู้หันมาศึกษาไมโตซิสจากเซลล์ที่มีชีวิตมากขึ้น อาจแบ่งวิธีการในการแบ่งแบบไมโตซิสออกเป็นระยะต่างๆได้ดังนี้

๑. Metabolic Stage หรือ Interphase เป็นระยะที่เซลล์สร้างจำลองโครโมโซมขึ้นใหม่เหมือนเดิมทุกประการเท่ากับจำนวนโครโมโซมที่มีอยู่เดิม นอกจากนี้ยังสร้างส่วนประกอบอื่นๆของเซลล์พร้อมทั้งสะสมพลังงานไว้ใช้ในการแบ่ง

๒. Prophase ระยะนี้โครโมโซมจะหดตัวสั้นเข้าและขวั้นเป็นเกลียวมองเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนขึ้น แต่ละโครโมโซมที่เห็นประกอบด้วยโครโมโซมเดิมและโครโมโซมที่จำลองขึ้นใหม่ ในระยะนี้นิวคลีโอลัสจะค่อยๆหายไป เซลล์ของสัตว์ centrosome จะแบ่งออกเป็นสองแล้วเคลื่อนที่ไปอยู่คนละข้างของเซลล์ ในที่สุด nuclear membrane จะหายไป Nuclear sap จะรวมกับ cytoplasm เกิด spindle โครโมโซมจะหดสั้นเข้ายิ่งขึ้นลอยอยู่ใน cytoplasm

๓. Contraction Stage ระยะนี้นับจากโครโมโซมที่ลอยตัวอยู่เคลื่อนเข้ามาจับกลุ่มกันตรงกลางมากขึ้นแล้วกระจายออกจากกันอย่างรวดเร็ว เป็นระยะที่ spindle จะจับกันโครโมโซมที่ kinetochore นิวคลีโอลัสจะหายหมดไปในระยะนี้ (Bajer& Molé-Bajer 1956)

๔. Metakinesis และ Metaphase ระยะนี้โครโมโซมจะเคลื่อนเข้ามาอยู่ระหว่างกลางของ spindle Kinetochore จะเคลื่อนเข้ามาอยู่ในแนวเดียวกันที่

equatorial plate Chromosome arm ชี้ออกในแนวขนานกับ spindle พร้อมกับหดสั้นเข้าอีก เป็นระยะที่โครโมโซมจะหดสั้นมากที่สุดเห็นเป็นสองโครมาติดชัดเจนโดยติดกันที่ kinetochore

๕. Anaphase ระยะนี้แต่ละโครมาติดจะแยกออกจากกันเริ่มจาก kinetochore เป็น daughter chromosome แล้วเคลื่อนไปอยู่คนละข้างของเซลล์

๖. Telophase ระยะนี้นับจากเมื่อโครโมโซมเคลื่อนมาอยู่ที่ขั้วของเซลล์เรียบร้อยแล้ว แต่ละโครโมโซมจะคลายเกลียวและยืดขยายออก เกิด imbibition ของ karyoplasm เกิด nuclear membrane และนิวคลีโอลัส คือเกิดการจัดตัวของนิวเคลียสใหม่ที่เหมือนนิวเคลียสเดิม

ในการแบ่งนิวเคลียสนี้ในระยะ telophase จะเกิด cytokinesis ขึ้นทำให้ได้เซลล์ใหม่สองเซลล์ ในเซลล์ของสัตว์จะเกิด furrow formation แต่ในเซลล์ของพืชจะเกิด cell plate ขึ้นแทน (Brachet 1957, De Robertis et al 1961)

การเจริญของเซลล์

การแบ่งเซลล์ใดๆก็ตามจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์นั้นมีการเจริญ โดยปกติเมื่อเกิดการเจริญจะเกิดการเพิ่มปริมาณของส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ซึ่งแต่ละส่วนก็มีสภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของมันเอง ส่วนประกอบบางอย่าง เช่น mitochondria, chloroplast แม้กระทั่งโครโมโซมเองสามารถจะเพิ่มปริมาณขึ้นได้โดยไม่ขึ้นกับการแบ่งเซลล์ (Stern 1956) การเจริญที่ชักนำให้เกิดการแบ่งเพื่อเพิ่มปริมาณนั้นจะต้องมีการสร้าง cellular organelle และ cellular constituent อื่นๆให้สมดุล การเจริญจะไม่สมดุลเมื่อส่วนประกอบอื่นๆเพิ่มปริมาณขึ้นแต่อีกอย่างหนึ่งไม่เพิ่ม ที่สำคัญคือการสร้าง DNA ตัวอย่างเช่นจากการทดลองโดยใช้ UV ซึ่งห้ามการสร้าง DNA พบว่าเซลล์สามารถจะเจริญใหญ่ขึ้นได้โดยมีการสะสม RNA และโปรตีน ไม่มีการสร้าง DNA เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นเกิดการเจริญที่ไม่สมดุลแล้วตาย(Giese 1962) ในการเพิ่มปริมาณนี้เซลล์สามารถจะแบ่งได้แม้จะยังเพิ่มปริมาณได้ไม่ถึงสองเท่าตัว คล้ายกับว่าเซลล์มีการเตรียมพร้อมโดยเฉพาะสำหรับการแบ่ง เมื่อพร้อมแล้วก็สามารถจะแบ่งได้โดยยังเพิ่ม cellular constituent อื่นๆไม่ครบ (Mazia 1961)

การแบ่งเซลล์ซึ่งเป็นผลจากการเจริญเติบโตของเซลล์นี้เป็นการ doubling ของ potentiality ในเซลล์ทั้งหมด เป็นการสร้าง twoness ซึ่งมิได้หมายถึงการ doubling ในทางปริมาณเท่านั้น แต่หมายถึงการสร้าง twoness ของการแยกและเป็นอิสระต่อกัน ในเซลล์หนึ่งๆจะสามารถรับการเจริญในวงจำกัด และวงจำกัดนี้จะบ่งเฉพาะถึงสิ่งภายในเซลล์ทั้งหมดซึ่งสามารถจะอยู่ได้ภายใต้การบริหารของนิวเคลียสอันเดียว (Mazia 1961) เซลล์ที่มีการเจริญที่ไม่สมดุลซึ่งอาจจะเนื่องจากการขาดอาหารหรือสาเหตุอื่นๆก็ตามสามารถจะทำให้เซลล์ตายได้ (Giese 1962) สำหรับ polyploid เซลล์สามารถจะเจริญได้ในขนาดที่เป็นสัดส่วนกับจำนวนชุดของโครโมโซม (Mazia 1961)

<u>ความสำเร็จของการแบ่งเซลล์ขึ้นอยู่กับแฟคเตอร์ ๓ ประการ คือ</u>

๑. การสร้างสรร biosynthetic system เพื่อสร้าง chromosomal และ spindle body substance.

๒. Modification ของ energetic metabolism เพื่อสร้างและสะสมพลังงานไว้ใช้ในการแบ่ง

๓. Polarization ของ cell structure เพื่อจะให้เกิดการแบ่งแยกของโครโมโซมเท่าๆกัน (Stern 1956)

<u>ลำดับของ Biosyntheses สำหรับ Mitotic Division</u>

จากแฟคเตอร์ต่างๆที่ควบคุมไมโตซิสนี้จะเห็นได้ว่าการเกิดไมโตซิสเซลล์จะต้องมีการสร้างสะสมสิ่งต่างๆเหล่านี้ คือ

๑. การจำลองตัวของโครโมโซม โดยมีการสร้าง DNA และโปรตีนขึ้นในปริมาณเป็นสองเท่าตัว

๒. การสร้างสะสมพลังงานเพื่อใช้ในการแบ่ง

๓. การจำลองตัวของ cell center เพื่อให้เกิด polarization ของเซลล์ในการควบคุมทิศทางการเคลื่อนที่ของโครโมโซม

๔. การสร้าง achromatic apparatus เพื่อการแบ่งแยกโครโมโซมให้ได้เป็นนิวเคลียสใหม่สองอัน

การจำลองตัวของโครโมโซม

ได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านพยายามศึกษาว่าการจำลองตัวของโครโมโซมเกิดขึ้นในระยะใดของการแบ่ง เนื่องจากโครโมโซมประกอบด้วย DNA และโปรตีนเป็นส่วนสำคัญ การจำลองตัวของโครโมโซมจะต้องมีการสร้าง DNA และโปรตีนประกอบกันไป จึงอาจหาการสร้าง DNA ได้เทียบเท่าหาการสร้างโครโมโซม จากการทดลองพบว่าการสร้าง DNA จะเกิดขึ้นก่อนเริ่มการแบ่งหรือในระยะ metabolic stage ในกรณีที่มีการแบ่งอย่างรวดเร็ว เช่น egg cleavage จะมีการสร้าง DNA ในระยะ telophase ด้วย นอกจากนี้บางชนิดอาจจะพบในระยะ anaphase อีก การทดลองหาปริมาณของ DNA ใน liver regeneration พบว่ามีการสร้าง DNA ใหม่ครึ่งหนึ่ง และอีกครึ่งหนึ่งเป็น DNA ที่มีอยู่เดิม ซึ่งแสดงว่ามี duplication ของ DNA เกิดขึ้น (Brachet 1957) การเพิ่มปริมาณของ DNA ใหม่นี้สำคัญ นิวเคลียสไม่สามารถจะมีไมโตซิสได้ถ้าไม่เกิดการเพิ่มของ DNA ใหม่ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณของ DNA อยู่ในระดับ polyploid ก็ตาม (Patau et al 1957)

ตาม model ของ Watson-Crick ซึ่งแสดงว่า DNA โมเลกุลประกอบด้วย polynucleotide 2 chain พันกันเป็นเกลียวแบบ double helix Model นี้ได้ชักนำให้เกิดความคิดว่าการสร้าง DNA ใหม่จะเป็นแบบ template โดยเกิด DNA ใหม่ขึ้นสองโมเลกุลที่เหมือนกันทุกประการ DNA โมเลกุลหนึ่งจะประกอบด้วย polynucleotide strand เดิมและ strand ที่เพิ่งสร้างขึ้นใหม่ ดังนั้นในการสร้างโครโมโซมใหม่จึงควรประกอบด้วย DNA เดิมและ DNA ที่เพิ่งสร้างขึ้นใหม่อย่างละครึ่งด้วยกัน ผู้ที่ทำการทดลองสนับสนุนสมมุติฐานข้อนี้ คือ Taylor et al โดยใช้ Tritium labeled thymidine ใน Vicia faba พบว่าโครโมโซมที่แยกออกจากกันประกอบด้วยส่วนของโครโมโซมที่สร้างขึ้นใหม่เหมือนกัน จึงแสดงว่า duplicationของDNA เกิดขึ้นแบบ template ตาม Watson-Crick Model (Brachet 1957, De Robertis et al 1961)

จากการทดลองของ Kornbergeในปี ค.ศ. ๑๙๕๙ โดยสร้าง DNA in vitro เขาได้พบกลไกในการสร้าง DNA โมเลกุล และพบว่าการที่จะเกิด polymerization ของ nucleotide ได้จะต้องมี DNA primer ซึ่งแสดงว่าจะต้องมี DNA เดิม

template ให้เกิด DNA โมเลกุลใหม่ขึ้น(Giese 1962) ดังนั้นในการสร้าง DNA in vivo ก็ควรจะเป็นวิธีการที่คล้ายคลึงกัน

เนื่องจากโครโมโซมประกอบด้วย DNA และโปรตีน เช่น histone เป็น nucleoprotein Bloch & Godman พบว่ามีการสร้าง DNA และ histone ขึ้นพร้อมๆ กันก่อนเริ่มไมโตซิส (Brachet 1957) และจาก autoradiographic technique โดยใช้ P^{32} เป็น DNA indicator และ S^{35} เป็นโปรตีน indicator พบว่าสารเหล่านี้เข้าไปในโครโมโซมในระยะก่อนเริ่ม prophase เกือบพร้อมๆกัน (Stern 1956)

โครโมโซมอาจจะเพิ่มปริมาณได้โดยไม่มีการแบ่งเป็น multistranded chromosome (polyteny) หรือเป็น polyploid นิวเคลียสซึ่งเป็นเหตุการณ์ปกติที่พบทั้งในเซลล์ของพืชและสัตว์ (Stern 1956)

การเพิ่มปริมาณของโครโมโซมขึ้นก่อนเริ่มการแบ่งนี้สำคัญ เนื่องจากการแบ่งเซลล์ถ้าจะให้ผล functional และ viable offspring จะต้องมี chromosome duplication ก่อน โดยเมื่อคิดทางด้าน inheritance โครโมโซมชุดจะ double เพื่อให้เกิด continuity ในทางด้าน physiology โครโมโซมชุดที่เกิดขึ้นใหม่นี้เพื่อให้มี viability (Stern 1956)

<u>การสร้างและสะสมพลังงาน</u>

ในการแบ่งเซลล์ทุกครั้งจะต้องมีการใช้พลังงาน พลังงานนี้จะสร้างสะสมไว้ก่อนเริ่มการแบ่งเช่นเดียวกับการสร้าง DNA ในการสร้างพลังงานนี้เกี่ยวโยงกับออกซิเจน consumption ของเซลล์ Bullough ศึกษา somatic cell ของหนูพบว่าออกซิเจนและกลูโคสสำคัญที่สุดสำหรับไมโตซิส เซลล์จะมีการ uptake ออกซิเจนอย่างมากก่อนเริ่มไมโตซิส หลังจากเริ่มแล้วก็อาจแบ่งต่อไปได้โดยไม่มีออกซิเจน (Brachet 1957) เซลล์แต่ละอย่างก็มี susceptibility ต่อ anaerobiosis ไม่เหมือนกัน เซลล์ที่ต้องการออกซิเจนสำหรับการแบ่งจะมีอัตราของ glycolysis ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราของ respirstion และเซลล์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนจะมีอัตราของ glycolysis สูงกว่าอัตราของ respiration มาก (Giese 1962) โดยทั่วๆไปเซลล์ต้องการออกซิเจนในการสร้างสมพลังงาน carbohydrate metabolism ที่เกี่ยวโยงกับกลไกในการสร้าง

พลังงานนี้คือ Krebs cycle (Brachet 1957, Giese 1962) และในระหว่างที่มีไมโตซิสนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงพลังงานบ้างเล็กน้อย ในระยะ interphase และ prophase ซึ่งเป็นระยะที่มี nuclear membrane หุ้มอยู่จะมีอัตราของออกซิเจน consumption สูงกว่าระยะที่มี spindle และ aster อยู่ (Giese 1962) อาจเป็นเครื่องแสดงว่าเซลล์สร้างสมพลังงานไว้ในระยะนี้ แต่ความต้องการพลังงานของเซลล์นี้จะขึ้นอยู่กับชนิดและ activity ของเซลล์อีก เช่น ใน Vicia faba root tip จากการวัดออกซิเจน consumption พบว่าแถบของ cell elongation respiratory activity สูงกว่า meristematic region (Stern 1956)

ในปี ค.ศ. ๑๙๕๖ Clowes และ Krabl พบว่า nitro และ halogen derivative ของ phenol เพิ่มอัตราของ respiration แต่กลับหยุดไมโตซิสในระยะ prophase ของ sea urchin egg การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการแบ่งเซลล์และ respiration rate ไม่ขึ้นต่อกัน จากการทดลองของนักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่านพบว่าสารที่ inhibit oxidative phosphorylation จะ inhibit uptake ของ radioactive phosphate และไมโตซิสใน sea urchin egg จึงสรุปได้ว่าการแบ่งนิวเคลียสเกี่ยวโยงกับ oxidative phosphorylation มากกว่า respiration

หลักฐานต่อมาที่แสดงว่า oxidative phosphorylation เป็น main energy source สำหรับไมโตซิสมาจากการค้นพบว่าปริมาณ ATP ในไข่กบจะลดลงอย่างมากใน anaerobiosis และ development จะหยุดเมื่อปริมาณ ATP ลดต่ำลงกว่าขั้นวิกฤต นอกจากนี้ยังพบว่า activity ของ mitochondria ซึ่งมีความสำคัญเกี่ยวโยงกับ oxidative phosphorylation จะลดลงอย่างมากในเซลล์ที่มีการแบ่ง โดยที่การเคลื่อนไหวของ mitochondria จะหยุดชงัก ขนาดลดลง และบางครั้งจะละลายหายไป (Brachet 1957) นอกจากนี้ยังมีผู้พบว่าในขณะที่นิวเคลียสใกล้จะถึงระยะ prophase mitochondria จะมา accumulate อยู่รอบๆนิวเคลียสซึ่งดูคล้ายกับเพื่อจะให้พลังงานแก่นิวเคลียสได้ทันทีในขณะที่นิวเคลียสจะแบ่งตัว (Riker & Hildebrandt 1962)

จากเหตุผลต่างๆเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ได้รับพลังงานมาจาก oxidative phosphorylation และ carbohydrate metabolism ระยะที่มี metabolism สูง

คือ เมื่อนิวเคลียสกำลัง intact มากกว่าจะอยู่ใน mitotic stage ซึ่งอาจจะเป็นระยะ interphase ที่เซลล์สร้างสะสมพลังงานเพื่อใช้ในการแบ่ง (Brachet 1957)

การสร้างสมพลังงานในรูปของ energy rich substance นี้เมื่อถึงขั้นวิกฤต เซลล์จะเริ่มดำเนินการแบ่งได้เลย พฤติการณ์นี้คล้ายกับเซลล์สร้าง energy reservior ขึ้นสะสมไว้เรื่อยๆจนกระทั่งเต็ม เมื่อพลังงานนี้ถูกดึงเอาออกมาใช้ก็จะพาให้เซลล์เข้าสู่ไมโตซิส เมื่อเซลล์ทำการแบ่งก็จะแบ่งจนครบวงจรโดยไม่หยุดยั้งแม้ว่าเซลล์ได้รับสารหรือรังสีที่เป็นอันตราย ถ้าได้รับอันตราย cytolysis จะเกิดขึ้นภายหลังการแบ่งแล้ว (Giese 1962)

Energy reservior สำหรับไมโตซิสอาจจะไม่ได้อยู่ในรูปของ high energy phosphate bond อย่างเดียว เนื่องจาก ATP และ CP ไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปมากนักในระหว่างที่มีการแบ่ง High energy phosphate อาจจะสร้างขึ้นเป็นอันดับแรกติดต่อกันมาแล้วใช้ไปในการสร้างสารประกอบอื่นๆหลายอย่างที่มี complex nature และ structure ที่จำเป็นสำหรับการแบ่งเซลล์ซึ่งปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบกันแน่ชัด(Giese 1962)

<u>การจำลองตัวของ Cell Center</u>

ในการแบ่งโครโมโซมทุกครั้งจะต้องมี polarity คือมีขั้วของเซลล์ซึ่งโครโมโซมจะเคลื่อนเข้าไปหาในระยะ anaphase ในเซลล์ของสัตว์พบว่าทิศทางที่โครโมโซมเคลื่อนไปสู่นั้นจะเป็นทิศทางที่มี centriole หรือ cell center อยู่ Centriole นี้จะอยู่เดี่ยวๆหรืออยู่เป็นคู่ จากการศึกษาด้วย electron micrograph พบว่าcentriole ที่อยู่เป็นคู่นี้จะตั้งฉากซึ่งกันและกัน (De Robertis et al 1961, Mazia 1961) การแบ่งเซลล์ทุกครั้งจะมีการจำลองตัวของ centriole ประกอบด้วย เชื่อกันว่า centriole นี้จะ replicate ตัวเองก่อนในระยะanaphase ในเซลล์ที่กำลัง active ในการแบ่งเพื่อเตรียมพร้อมที่จะเป็นขั้วของเซลล์ในการแบ่งครั้งต่อไป ในระยะ prophase centriole ที่เกิดขึ้นแล้วนี้จะแยกออกจากกัน เมื่อทราบขั้วของเซลล์อยู่ในทิศใดก็ทราบทิศทางการเคลื่อนที่ของโครโมโซมและ plane ของเซลล์ที่จะแบ่ง (Mazia 1961)

หน้าที่ของ centriole ที่เกี่ยวข้องกับไมโตซิสนี้มีผู้สันนิฐานว่าอาจจะมีอิทธิพลต่อการเกิด fibrillar protein ของ spindle โดยทำให้เกิดการเรียงตัวของ

spindle fiber จากลักษณะที่พบ centriole และ spindle fiber นี้คล้ายว่าไม่มีความสัมพันธ์ต่อกันโดยตรงโดย spindle fiber ที่เกิดขึ้นมาสิ้นสุดอยู่ในระยะห่างจาก centriole เล็กน้อย (De Robertis et al 1961) แต่ศูนย์กลางของการเรียงตัวของ spindle fiber นี้เป็น centriole เสมอ เมื่อเกิด centriole ขึ้นสามคู่เช่นใน polyspermic egg การจัดเรียงตัวของ spindle จะเป็นไปทางสามขั้วนี้ (Giese 1962) นอกจากนี้จากการศึกษาโดยใช้ mercaptoethanal ซึ่งห้ามการจำลองตัวของ centriole แต่ไม่ห้ามการแยก พบว่าถ้าให้ก่อนที่โครโมโซมจะมาเรียงตัวและแยกออกจากกันก็จะห้ามไมโตซิสด้วย เมื่อนำเอา block นี้ออก centriole ที่แยกออกจากกันเป็นสามหรือสี่ขั้วก็จะทำให้โครโมโซมแยกออกจากกันสามหรือสี่ทางตามไปด้วย (Mazia 1961)

พฤติการณ์ในการเกิดการเรียงตัวของ spindle fiber นี้อาจจะเกิดจากการโยงกันระหว่าง centriole และ fiber protein ของ spindle ทำให้ fiber protein เรียงตัวอยู่ในแนวขนานกัน (Brachet 1957) วิธีการตามที่จะได้อธิบายไว้ตอนการเกิดของ spindle fiber หรืออาจจะเป็นว่ามีสารบางอย่างถูกปล่อยออกมาจาก centriole ทำให้เกิดการเรียงตัวของ spindle แต่ก็ยังไม่มีหลักฐานยืนยันถึงการเกิดและการเคลื่อนย้ายของมัน (Giese 1962)

ในเซลล์ของพืช polar cap ซึ่งเคยเชื่อกันว่าเป็นตัวชี้ทิศทางการเคลื่อนที่ของโครโมโซมนั้น ปัจจุบันนี้เมื่อศึกษาโดยใช้ polarizing microscope พบว่าอาจจะเป็นเพียง clear zone แบบพิเศษอย่างหนึ่งที่จะเกิดเป็น spindle fiber ขึ้น (Inoué & Bajer 1961) ฉะนั้นควรจะไม่เป็น polarity ที่แท้จริงในการชี้ทิศทางการเคลื่อนที่ของโครโมโซม

ปัจจุบันในเซลล์ของพืชยังไม่พบว่ามี centriole แต่จากลักษณะของไมโตซิสทั้งปกติและไม่ปกติซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วย centriole เช่นเดียวกับเซลล์ของสัตว์ทำให้คิดว่าต่อไปอาจจะพบ centriole ในพืชได้ (Mazia 1961)

<u>การสร้าง Achromatic Apparatus</u>

การแยกและการเคลื่อนที่ของโครโมโซมจะเกิดขึ้นได้จะต้องมี spindle ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้โครโมโซมเคลื่อนที่ Achromatic apparatus ได้แก่ spindle, aster

และ center หรือ pole (De Robertis et al 1961)

Spindle เป็นตัวที่ดึงพาให้โครโมโซมเคลื่อนที่ประกอบด้วยโปรตีนและ RNA มี lipid อยู่บ้างเล็กน้อย โปรตีนนี้จะเป็นชนิดเดียวกันเกือบทั้งหมด (Mazia 1961) ส่วนประกอบส่วนใหญ่ของ spindle จะมาจาก cytoplasm รวมกับ nuclear sap ทำให้เกิดเป็น spindle fiber ขึ้น จากการศึกษาโดยใช้ interference microscope ของ Mitchinsonและ Swann พบว่า spindle นี้มี dry matter น้อยกว่า cytoplasm ที่ล้อมรอบอยู่ (Brachet 1957) ในเซลล์ของพืชก่อนเกิด spindle จะเกิด clear zone ขึ้นรอบๆนิวเคลียสในระยะ early prophase และขยายใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ late prophase Clear zone นี้มีรูปร่างไม่แน่นอนและเป็น semiliquid เมื่อ nuclear membrane ละลายก็จะเกิดการสร้าง spindle ขึ้น Polar cap ที่เห็นอยู่ในเซลล์ของพืชทั่วไปอาจจะเป็นเพียง clear zone แบบพิเศษอย่างหนึ่ง (Bajer 1957) Clear zoneนี้แสดง uniformly birefringence แต่ nuclear sap จะไม่มี birefringence จากผลการศึกษาโดยใช้ interference microscope ของ Ambroseและ Bajer (1961) พบว่ามีสารที่ขับออกจากโครโมโซมในขณะที่เกิด clear zone นี้ สารนี้อาจจะช่วยในการเกิด clear zone และ spindle สารที่ขับออกมานี้อาจจะเป็น non-histone protein และ RNA RNA ใน mitotic apparatus นี้จะ associate กับ majer protein (Mazia 1961)

หลังจาก nuclear membrane ละลายแล้วในระยะ contraction stage birefringence material จะจัดตัวกันเป็น spindle fibrile หรือ fiber ภายใน spindle จะเกิด birefringence มากที่สุดตอนที่ติดกับโครโมโซม (Inoué & Bajer 1961)

ผู้ที่ให้ความคิดเห็นเกี่ยวกับการสร้าง spindle เป็นคนแรก คือ Louise Rapkine ในปี ค.ศ. ๑๙๓๑ ซึ่งเชื่อว่า spindle และ aster เกิดจาก reversible denaturationของโปรตีน เป็น process ที่ -SH และ -S-S group มีความเกี่ยวพันอยู่มาก ต่อมา Mazia พบว่า โปรตีน -SH เปลี่ยนแปลงเป็นอัตราส่วนกลับกับ glutathione เขาให้ความคิดเห็นว่า spindle เกิดจาก polymerization ของโปรตีนชนิด

เดียวโดย -S-S- bonding จาก oxidation-reduction ของ glutathione และโปรตีน เกิด -S-S- bonded protein fibrillae Bond ที่เหลือจะเกิด secondary bonding กับ centrosome ของโครโมโซมและ cell center หรือ cell pole ทำให้เกิด parallel orientation ของ protein fibrillae ระหว่าง centromere และ cell center ซึ่งทำให้โครโมโซมเคลื่อนที่ไปในแนวเดียวกัน ข้อสนับสนุนสมมุติฐาน คือ เขาพบว่า mitotic apparatus ของ colchicine-blocked sea urchin egg เป็น amorphous gel ซึ่ง colchicine นี้ไปblock secondary bonding ทำให้เกิด disorientation ของ protein fibrillae โครโมโซมจึงไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้วได้ (Brachet 1957) นอกจากนี้จากการทดลองของ Mazia & Dan สามารถจะแยกเอา mitotic apparatus ออกมาได้ในระยะ metaphase และ anaphase โดยคงอยู่ในลักษณะเดิม ทำให้เห็นว่าโครโมโซมนี้ผูกพันติดอยู่กับ spindle (Brachet 1957) และจากการศึกษาในเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้ polarized light ของ Inoué ทำให้เชื่อว่า molecular elementของ mitotic apparatus นี้มีสองสถานะคือ oriented (fibrous) และ disoriented (Mazia 1961) ในเซลล์ของพืช Stern พบว่า glutathione จะเพิ่มปริมาณมากขึ้นก่อนเกิดไมโตซิสใน Lily anther (Brachet 1957) Spindle นี้จะแสดง birefringence มากเมื่อถึงระยะ anaphase ก่อนที่โครโมโซมจะแยกออกจากกัน และ birefringence จะมากที่สุดที่ spindle ต่อกับ centromere (Inoué & Bajer 1961) ในเซลล์ของสัตว์ aster ที่เกิดขึ้นอาจจะเกิดจากการจัดเรียงตัวของโปรตีนโมเลกุลเช่นเดียวกับการเกิด spindle (Brachet 1957)

การเคลื่อนที่ของโครโมโซมที่เคลื่อนไดตามทิศทางการเรียงตัวของ spindle นี้อาจจะเนื่องจากโปรตีนของ mitotic apparatus นี้คล้ายกับ contractile protein ของกล้ามเนื้อซึ่งทำปฏิกริยากับ ATP (Brachet 1957) นอกจากนี้ Iverson & Rowland และ Mazia ยังได้พบ active enzyme ใน mitotic apparatus ที่ split ATP อีก จึงทำให้คิดว่าโปรตีนของ mitotic apparatus อาจจะคล้ายกับ contractile protein ของกล้ามเนื้อที่ทำปฏิกริยาด้วยการ split ATP (Mazia 1961)

จากผลการวิเคราะห์อย่างละเอียดพบว่าการเคลื่อนที่ของโครโมโซมเกิดขึ้นโดย contraction ของ spindle fiber เพียงเฉพาะระยะต้นๆของ anaphase หลักฐานเหล่านี้ได้จากเช่น birefringence ของ spindle ลดน้อยลงและจากการแผ่ขยายของ spindle Contraction ของ spindle เพียงครั้งเดียวก็เพียงพอที่จะแยก duplicated chromosome ออกจากกัน นอกจากนี้ก็เกือบจะเป็นที่ประจักษ์ว่าโครโมโซมขณะที่เคลื่อนไปสู่ขั้วจะปล่อยสารบางอย่างออกมาละลาย spindle fiber อย่างไรก็ตามปัญหาเรื่องการเคลื่อนที่ของโครโมโซมก็ยังไม่กระจ่างถ้าไม่คำนึงถึงสมมุติฐานของ contraction fiber (Giese 1962)

การเคลื่อนที่ของโครโมโซมนั้นมีผู้ให้ความคิดเห็นอีกคือ Stern (1956) เขาคิดว่าการเคลื่อนที่นี้อาจเกิดจากผลรวมระหว่าง autonomous chromosome movement และ contraction ของ spindle

<u>การเกิดไมโตซิส</u>

ไมโตซิสอาจจะมี stimulater และ inhibitor ต่างๆกันซึ่งแต่ละอย่างก็ให้ผลสะท้อนไม่เหมือนกัน สารต่างๆที่พบว่าเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดไมโตซิส เช่น IAA kinetin, 1-3 diphenylurea จากการทดลองของ Patau et al (1957) เขาพบว่า IAA และ kinetin เป็นตัวชักนำให้เกิด DNA synthesis และไมโตซิส โดย IAA ชักนำให้เกิด DNA synthesis แลไมโตซิส Kinetin เป็นตัวชักนำให้เกิดไมโตซิส cytokinesis และอาจมีส่วนร่วมทำให้เกิด DNA synthesis ด้วย เมื่อใช้สารทั้งสองชนิดนี้รวมกันในปริมาณที่พอเหมาะจะทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ขึ้นอย่างมากมาย

สิ่งที่กระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่ไมโตซิสนี้มีผู้สันนิฐานว่าอาจเกิดขึ้นได้อีกหลายแบบเช่น อาจจะเกิด doubling in mass ของเซลล์ อัตราส่วนระหว่างปริมาณและพื้นผิว doubling ของ DNA หรืออาจจะเกิดจากโครโมโซมหรือ organelle อื่นๆภายในเซลล์ส่งสารออกมากระตุ้น (Giese 1962) การเพิ่มปริมาณของโครโมโซมเป็นการบ่งว่าจะเกิดไมโตซิสได้ แต่ทั้งนี้มิได้หมายความว่าเซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นจะมีการแบ่งเสมอไป ใน differentiated cell หลายชนิดจะพบว่ามีการเพิ่มปริมาณของโครโมโซมขึ้นโดยมิได้มีการแบ่ง (Northcote 1963)

พฤติการที่เกิดขึ้นในระหว่างที่มีไมโตซิส

หลังจากเกิดการเพิ่มปริมาณของโครโมโซมแล้วจะเกิด physiological relation ๓ แบบที่แสดงถึงไมโตซิสคือ

๑) เริ่มจากระยะ preprophase ถึง metaphase ระยะนี้จะมีความโน้มเอียงที่จะดำเนินไปจนจบได้ยาก ต้องการ inhibitor มา apply จึงจะห้ามได้ ภายในสภาพธรรมชาติจะถูกขัดขวางน้อยมาก

๒) จาก metaphase ไปจนกระทั่งโครโมโซมแยกออกจากกัน ความต้องการของระยะ postmetaphase คือการกลับไปสู่สภาพ interphase ความต้องการนี้สำเร็จลงได้หลายแบบ โดยมากเกิดเป็นสอง daughter cell มีน้อยครั้งที่ได้เป็น polyploid หรือ binucleate cell

๓) Physiological relation ตอนนี้ over lap ข้อที่สองไปจนกระทั่งจบการแบ่ง คุณสมบัติที่สำคัญคือการกลับไปควบคุม cell organization ตามเดิม Cytokinesis ที่เกิดขึ้นคล้ายกับเป็น response ของ cytoplasm ต่อ nuclear center สองอัน ผลที่ได้เป็นสอง daughter cell ที่มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์เดิม (Stern 1956)

Cytokinesis

Cytokinesis เป็นพฤติการณ์ที่เกิดขึ้นหลังจากจบการแบ่งนิวเคลียสแล้ว Cytokinesis นี้มีความสัมพันธ์ในวงจำกัดต่อ mitotic cycle บางชนิดการแบ่งนิวเคลียสและการแบ่ง cytoplasm จะแยกออกจากกันเป็นระยะเวลานาน เช่น spore บาง species ของ Phycomycetes จะอยู่ในสภาวะ multinucleate จนกระทั่งเกิดการงอกจึงเกิดการแบ่ง cytoplasm เป็น uninucleate นอกจากนี้โดยการทดลองสามารถจะแยกการแบ่ง cytoplasm และการแบ่งนิวเคลียสออกจากกันด้วยวิธีต่างๆ เช่น การเอาออกซิเจนออก หรือการให้ hydrostatic pressure suffice (Stern1956)

Cytokinesis ในเซลล์ของสัตว์เกิด furrow formation ในเซลล์ของพืชเกิด cell plate ขึ้นแทน จากผลการวิเคราะห์อย่างละเอียดพบว่า cell plate เกิดขึ้นจากสารที่ขับออกมาจาก vesicle ของ endoplasmic reticulum ซึ่งมา

accumulate อยู่ที่ equqtorial plane ระหว่าง telophase nuclei Cell plate เกิดขึ้นจาก fusion ของสารที่ออกมาจาก vesicle นี้ (Northcote 1963)

The Endosperm

Endosperm คือเนื้อเยื่อที่เกิดจาก fusion ของ sperm nucleus และ polar nuclei ภายใน embryo sac มีจำนวนโครโมโซมสามชุด (Maheshwari 1950) Endosperm มีความสำคัญเนื่องจากเป็นเนื้อเยื่อที่เก็บอาหารสำหรับ embryo ภายในเมล็ด อาหารต่างๆที่สะสมอยู่นี้เช่น แป้ง โปรตีน organic nutritional source เช่น amino acid, auxin และ cell division-stimulating substance ซึ่งเป็นตัวการสำคัญใน morphogenetic process ของ embryo (Nakajima 1962) Development ของ endosperm เป็นไปได้หลายแบบ โดยจาก proendosperm nucleus เป็น free nuclei ก่อนหรือเกิดเป็นเนื้อเยื่อเลย (Maheshwari 1950)

ขนาดของ endosperm นิวเคลียสนี้จะไม่เท่ากันโดยเฉพาะจะมีการเพิ่มขนาดและจำนวนนิวเคลียสขึ้นซึ่งทำให้คิดว่าเกิดจาก degree ของ polyploidy นอกจากนี้ยังพบ irregular division ของ endosperm นิวเคลียสอีกจากการแบ่งแบบ amitosis ทำให้ได้นิวเคลียสที่มีขนาดต่างๆกัน (Maheshwari 1950) และจากการเลี้ยง endosperm tissue ของ Nakajima (1962) พบว่า endosperm tissue จะมีการเจริญและแบ่งเป็น callus tissue โดยไม่เกิด differentiation เลย ทำให้คิดว่า endosperm tissue นี้มีการแบ่งนิวเคลียสที่ผิดปกติ

ในการศึกษาไมโตซิสของ endosperm ในระยะ free cell in vitro นี้จำเป็นจะต้องทราบถึง nutritional requirement ของ endosperm เพื่อการเจริญ จากการศึกษาของ Nakajima (1962) เขาพบว่า endosperm นี้ไม่เป็น autonomous จึงต้องการ auxin, cell division-stimulating substance และ organic nutritional source จากต้นแม่อยู่ Artificial medium ที่ใช้เลี้ยง endosperm tissue คือ yeast extract, White's basic medium, sucrose, IAA และ kinetin หรือ 1-3 diphenylurea ซึ่งเป็น cell division-stimulating

substance ช่วยในการกระตุ้นให้เกิด DNA synthesis

<u>จุดประสงค์ของการศึกษาและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์นี้</u>

เพื่อศึกษาไมโตซิสดูการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสในการแบ่งออกเป็นสองนิวเคลียสขณะที่มีชีวิตทั้งแบบปกติและผิดปกติภายใต้สภาพธรรมชาติ เนื่องจากการแบ่งเซลล์หรือ cell reproduction ซึ่งเป็นขบวนการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตทั่วๆไปมีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิส ประโยชน์ที่จะได้รับจึงเป็นไปได้หลายทาง เช่น

๑. พฤติการณ์ในการแบ่งนิวเคลียสแบบปกติ ทำให้เข้าใจถึงสาเหตุและวิธีการในการเพิ่มปริมาณของสิ่งมีชีวิต อันเป็นขบวนการของการเจริญเติบโต

๒. พฤติการณ์ในการแบ่งนิวเคลียสที่ผิดปกติ อาจทำให้เข้าใจถึงสาเหตุและวิธีการในการแบ่งนิวเคลียสที่ปกติได้ นอกจากนี้ยังทำให้เข้าใจถึงขบวนการเจริญและเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิตซึ่งมีทั้งการแบ่งและเพิ่มปริมาณของนิวเคลียสที่ปกติและไม่ปกติ

๓. การเข้าใจถึงหลักการและขบวนการในการแบ่งและเพิ่มปริมาณของนิวเคลียสทำให้เราสามารถจะศึกษาหาวิธีการในการกระตุ้นหรือลดการแบ่งและเพิ่มปริมาณของนิวเคลียส อันเป็นผลให้เกิดการเร่งหรือหยุดยั้งการเจริญเติบโต ความรู้นี้เป็นบันไดสำคัญในการศึกษาปรากฏการณ์อื่นๆของสิ่งมีชีวิตทั้งทางชีววิทยาและทางการแพทย์