

Wykorzystując adaksjalną epidermę łuski cebuli (*Allium cepa*) badano zależność odkształcenia towarzyszącego plazmolizie oraz deplazmolizie od właściwości mechanicznych ścian komórkowych oraz geometrii komórek. Tkanka ta jest słabo przyczepiona do leżącego pod nią mięksiszu, przez co brak w niej naprężeń tkankowych, a ponadto można ją łatwo wyizolować bez uszkodzenia komórek. Plazmoliza oraz deplazmoliza komórek epidermy cebuli powodują więc odpowiednio całkowite zniesienie lub odtworzenie naprężeń rozciągających ścianę komórkową, którym towarzyszy odkształcenie ściany.

W trakcie badań testowano następujące hipotezy robocze:

Hipoteza 1: Plazmolizie oraz deplazmolizie komórek adaksjalnej epidermy łuski cebuli towarzyszy odpowiednio zmniejszenie oraz zwiększenie objętości komórki oraz powierzchni zewnętrznej ściany peryklinalnej.

Hipoteza 2: Wielkość odkształcenia objętościowego oraz powierzchniowego towarzyszącego plazmolizie oraz deplazmolizie zależy od: stopnia dojrzałości cebuli, z której pochodzą badane komórki epidermy; wielkości zmiany ciśnienia osmotycznego; kształtu i rozmiarów komórek.

Hipoteza 3: Odkształcenie komórek martwych towarzyszące traktowaniu osmotycznemu epidermy zależy od odkształcenia komórek sąsiednich.

Hipoteza 4: Anizotropia towarzyszącego plazmolizie odkształcenia powierzchniowego zewnętrznej ściany peryklinalnej komórki epidermy cebuli zależy od geometrii komórki, anizotropii naprężenia w ścianie komórki w stanie turgoru oraz anizotropowych właściwości mechanicznych ściany.

W pierwszej kolejności w mikroskopie konfokalnym przeprowadzono przyżyciowe obrazowanie komórek, których ściany barwiono jodkiem propidyny (*Propidium Iodide* - PI). Barwienie komórek PI dodatkowo pozwoliło określić żywotność komórek, ponieważ komórki o jądrach zabarwionych PI w literaturze często uznawane są za martwe. Następnie wykorzystując obrazy otrzymane w mikroskopie konfokalnym oraz program MorphoGraphX obliczono odkształcenia towarzyszące traktowaniu osmotycznemu komórek. Na tej podstawie stwierdzono, że odkształcenia objętościowe większości komórek o jądrach niezabarwionych PI są zgodne z oczekiwaniami, tj. plazmolizie oraz deplazmolizie towarzyszy odpowiednio zmniejszenie oraz zwiększenie objętości komórek (potwierdzono pierwszą hipotezę roboczą).

Następnie poszukiwano czynników wpływających na wielkość tych odkształceń. W tym celu porównywano odkształcenia objętościowe, towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie, komórek pochodzących z cebul młodych i dojrzałych, które przed plazmolizą inkubowano w roztworze hipotonicznym lub izotonicznym zawierającym PI. Badania te wykazały, że odkształcenia objętościowe są większe w komórkach pochodzących z cebul młodych, których ściany są najprawdopodobniej cieńsze i bardziej elastyczne niż w przypadku komórek cebul dojrzałych. Większe odkształcenia objętościowe stwierdzono również wtedy, gdy zmiana ciśnienia osmotycznego jest większa: przy przejściu z roztworu hipotonicznego do hipertonicznego zmiana jest większa niż przy przejściu z roztworu izotonicznego do hipertonicznego. Ponadto badania wykazały, że wielkość odkształcenia objętościowego może zależeć od kształtu oraz rozmiaru komórek (potwierdzono zatem drugą hipotezę roboczą).

Badano również odkształcenia objętościowe towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie komórek o jądrach zabarwionych PI. Wbrew założeniu, że komórki te są martwe, stwierdzono, że część z nich odkształcała się podobnie jak komórki o jądrach niezabarwionych PI (tj. plazmolizie towarzyszyło zmniejszenie, a deplazmolizie zwiększenie objętości komórek). Z badań na komórkach drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) wiadomo jednak, że traktowaniu osmotycznemu towarzyszy tymczasowe zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej, co umożliwia wnikanie PI do jąder żywych komórek. Być może traktowanie osmotyczne powoduje podobną permeabilizację błony w komórkach epidermy cebuli. Prawdopodobnie więc część komórek o jądrach zabarwionych PI była żywa i dlatego odkształcała się zgodnie z oczekiwaniami. Inne komórki o jądrach zabarwionych PI odkształcały się jednak inaczej: plazmolizie towarzyszyło zwiększenie a deplazmolizie zmniejszenie ich objętości. Poszukując przyczyny takich odkształceń dla każdej komórki o jądrze zabarwionym PI wyznaczono część obwodu sąsiadującą z komórkami

o jądrach zabarwionych PI. Na tej podstawie stwierdzono, że odkształcenie komórek martwych towarzyszące plazmolizie (zwiększenie objętości) najprawdopodobniej wynika z biernego odkształcenia tych komórek pod wpływem odkształcenia żywych komórek sąsiednich (potwierdzono trzecią hipotezę roboczą).

Następnie badano, jakie odkształcenia powierzchniowe zewnętrznej ściany peryklinalnej towarzyszą traktowaniu osmotycznemu komórek adaksjalnej epidermy cebuli. Dla wielu komórek odkształcenia powierzchniowe były zgodne z oczekiwaniami (tj. plazmolizie towarzyszyło zmniejszenie powierzchni ściany, a deplazmolizie – zwiększenie), ale wielkość odkształceń była bardzo mała (bliska błędowi pomiarów). Analiza optycznych przekrojów poprzecznych przez te same komórki epidermy cebuli przed plazmolizą, po plazmolizie oraz po deplazmolizie, wykazała zaś, że mimo niewielkich odkształceń powierzchniowych traktowaniu osmotycznemu towarzyszą zmiany krzywizny zewnętrznej ściany peryklinalnej przypominające zmiany powierzchni towarzyszące pompowaniu oraz spuszczeniu powietrza z materaca kieszeniowego.

W drugiej części badań analizowano układ prążków widocznych w mikroskopie Nomarskiego na wewnętrznej powierzchni ściany po zniesieniu naprężeń, aby na tej podstawie wnioskować o anizotropii odkształcenia zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy cebuli towarzyszącego plazmolizie. Wiadomo bowiem, że orientacja prążków jest prostopadła do kierunku maksymalnego odkształcenia. Analiza wykazała, że układ prążków jest zróżnicowany w obrębie ściany pojedynczej komórki, ale równocześnie zbliżony w części równowąskiej różnych komórek. Natomiast układ prążków na końcach komórek zależy od ich kształtu. Na tej podstawie stwierdzono, że odkształcenie powierzchniowe ściany towarzyszące plazmolizie jest anizotropowe, a maksymalne kurczenie w równowąskiej części komórek zachodzi w kierunku poprzecznym do osi komórki.

Następnie badano układ fibryl celulozowych w części równowąskiej komórek, na wewnętrznej powierzchni ściany, czyli powierzchni, na której pojawiają się prążki (mikroskop sił atomowych), oraz na całej grubości ściany osobno w części równowąskiej komórek oraz na końcach o różnych kształtach (mikroskopia polaryzacyjna). Miało to na celu sprawdzenie, czy anizotropia odkształcenia powierzchniowego ściany zależy od jej anizotropowych właściwości mechanicznych wynikających z układu fibryl celulozowych. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że anizotropia odkształcenia powierzchniowego ściany nie zależy od układu fibryl celulozowych w ścianie, ale od geometrii komórki (częściowo potwierdzono czwartą hipotezę roboczą).