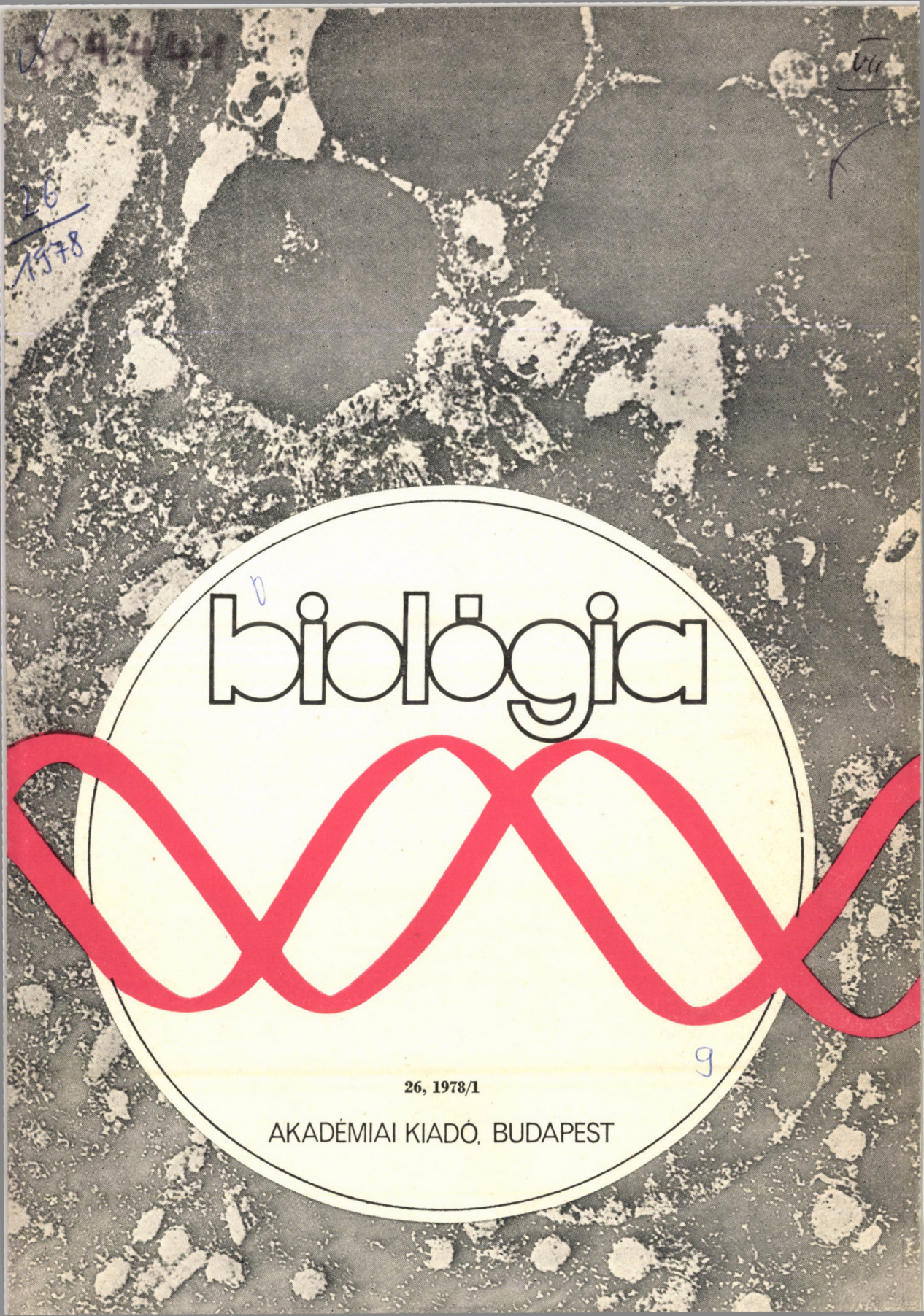


biológia

26, 1978/1

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

SZERZŐINK SZÍVES FIGYELMÉBE

1974-től a BIOLÓGIA (korábban: *Biológiai Közlemények)* tartalmilag és technikailag korszerűsített alakban jelenik meg. Kötetszámozása folyamatos (1974: 22. kötet), évente két füzetet tartalmaz. Elsősorban az *elméleti és molekuláris biológia, a sejttan, öröklestan, kísérletes onto- és filogenetika* tárgyköréből közöl cikkeket. A dolgozatok következő típusait részesítjük előnyben:

— *teoretikus* cikkek
— valamely *munkacsoport* kísérletekre alapozott *elméletének* ismertetése, elsősorban a koncepció bővebb kifejtése
— a biológia valamely részterületének legújabb irodalmát *összefoglaló (review)* munkák
— az adott formában másutt nem publikált *kísérleti* beszámolók.

A lap ezenkívül *vitákat indító* vagy azokhoz *hozzászóló* cikkeket, valamint *könyvismertetéseket* és *kongresszusi beszámolókat* is közöl.

A kéziratokat gépelve, két példányban, a mellékleteket (rajzokat, fényképeket) egy példányban — az intézmény vezetőjének jóváhagyása után — a következő címre kérjük beküldeni:

BIOLÓGIA Szerkesztősége
Dobozy Ottó technikai szerkesztő
Budapest VIII., Nagyvárad tér 4.
Levélcím: 1445 Budapest, Pf. 370

A dolgozatok fejléce tartalmazza a címet, a szerző(k) teljes nevét, az intézet és a város megnevezését, valamint a kulcsszavakat. A lapban megjelenő dolgozatokat a legfontosabb külföldi *referáló folyóiratok* angol nyelvű összefoglalójuk, illetve címük alapján *ismertetik.* Ezért célszerű a külön angol fordítás céljára készült összefoglalók szövegének informatív, szabatos megfogalmazása. A dolgozat végén jelöljék meg a *szerző nevét* és munkahelyének pontos *címét* (irányítószámmal). A kéziratok elkészítéséhez a Szerkesztőség — előzetes kérésre — *Útmutatót* bocsát a szerzők rendelkezésére. Folyóiratunk egységes technikai kivitelezése érdekében *kizárólag az Útmutató figyelembevételével készült munkákat fogadhatunk el.*

Szerzőinket a megjelent cikkekért az Akadémiai Kiadó által szabályozott ívhonorárium illeti meg, és — amennyiben előzetesen nem rendelkeznek másként — térítés ellenében 100—100 különlenyomatot bocsátunk rendelkezésükre.

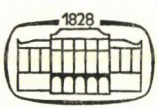
BIOLÓGIA

ELMÉLETI ÉS KÍSÉRLETI BIOLÓGIAI FOLYÓIRAT

Főszerkesztő:
CSABA GYÖRGY

Szerkesztő bizottság:

BALÁZS ANDRÁS
CSÁNYI VILMOS
DOBOZY OTTÓ
(technikai szerkesztő)
GUBA FERENC
KISZELY GYÖRGY
TÖRÖK LÁSZLÓ
VIDA GÁBOR



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

MAGYAR
TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
KÖNYVTÁRA

Biológia, **26**, 1978, 3—23.

ADALÉKOK AZ EVOLÚCIÓELMÉLET TOVÁBBFEJLESZTÉSÉHEZ*

ÚJHELYI MÁRIA
Semmelweis Orvostudományi Egyetem Marxizmus—Leninizmus Intézete, Budapest

Beérkezett: 1978. február 10.

Kulcsszavak: evolúció, mutáció, szelekció, környezet, komplexitás

Bevezetés

Az utóbbi években a biológia különböző kutatási területein számos olyan eredmény született, amely közvetve vagy közvetlenül kapcsolatba hozható az élővilág fejlődéséről alkotott képpel. Megemlíthetők — többek között — az örökítő anyag struktúrájára vonatkozó újabb adatok, a mutációs mechanizmusok feltárására irányuló kutatások, vagy más oldalról kiindulva a rokonsági és csoportszelekció mechanizmusainak vizsgálata. Új technikai eljárások alkalmazásával pontosítható a kronológia vagy a fajok leszármazási rendje stb.

Egyes vélemények szerint, annak ellenére, hogy a molekuláris biológiai kutatások eddigi eredményei hozzájárultak a leszármazási elmélet újabb oldalról történő alátámasztásához azzal, hogy feltárták a legkülönbözőbb élő formákat alkotó „alapanyag" azonosságát az élővilágban, az organikus világ fejlődésének elméletére semmilyen hatást nem gyakoroltak [pl. 26].

Ez a megállapítás arra céloz, hogy az a szemléleti keret, mely a tények rendezésének, értelmezésének alapját képezi, DARWIN óta szinte semmit nem változott, azaz lényegében az a jellemzés tekinthető általánosnak ma is, miszerint a véletlenül megjelenő (mutációk által előidézett) variációk közötti természetes szelekció a fejlődés fő hajtóereje, amely megszabja annak irányát.

Úgy tűnik azonban, hogy a fenti megállapítás némi módosításra szorul. Azt kellene inkább mondani, hogy a felhalmozódó eredmények kezdik szétfeszíteni az adott szemléleti keretet. Ez elsősorban abban nyilvánul meg, hogy a különböző kutatási területeken feltárt tények esetenként ellentmondanak egymásnak, vagy legalábbis nehezen egyeztethetők össze egymással, ami abból adódik, hogy e szemléletmód alapján értelmezzük őket. Lehetőség lenne és szükség lenne bizonyos kategóriák újragondolására, használatuk egyértelműbbé, pontosabbá tételére. Elsősorban az evolúció két alaptényezőjének — a mutációnak és a szelekciónak — értelmezéséről, s ezek egymáshoz való viszonyáról van szó, arról, hogy mennyiben lehet a mutációkat az evolúció puszta „alapanyagának", míg a szelekciót „irányt adó" tényezőnek tekinteni.

A fejlődést, más változásokkal szemben, legáltalánosabban úgy szoktuk meghatározni, mint valamely iránnyal bíró folyamatot. Így a fejlődés kritéri-

* A BIOLÓGIA szerkesztősége a cikket vitaindítónak is szánja. Várjuk a problémakörrel kapcsolatos hozzászólásokat.

riumának megadása nem más, mint a folyamat irányának megadása. Ha a szelekcióból, mint irányt adó mozzanatból indulunk ki, azt kell mondani, hogy az élővilág fejlődése az alkalmazkodottságban való előrehaladást, tökéletesedést jelenti, hiszen a szelekció — bármely formáját, szintjét tekintjük is — az adott feltételeknek leginkább megfelelő, *legalkalmasabb* változatot részesíti előnyben.

Azt tapasztaljuk ugyanakkor, hogy léteznek ősibb alakulatok, melyek e szempont szerint fejlettebbeknek tekinthetők az újabban keletkezetteknél, vagy — s ez a helyzet az esetek többségénél — nem is tudunk összehasonlítást tenni, azaz semmiféle alapunk sincs valamely csoportot alkalmazkodottabbnak tekinteni egy másiknál.

Így a szelekcióra, mint „teremtő", irányt adó mechanizmusra támaszkodva elveszítjük a fejlődés egységes, általános kritériumát, sőt, szigorúan véve, kétségbe kell vonnunk magának a fejlődésnek a létét, megelégedve egy, az időben kiterjedő változás, *mássá levés* mozgásának lehetőségével.

Amennyiben mégis fenn akarjuk tartani az élővilág fejlődésébe vetett meggyőződést, az evolúció kategóriáját, meg kell vizsgálni azt a lehetőséget, hogy a folyamat irányát más kritériumokban ragadjuk meg, s ezzel együtt azt is, hogy a szelekción kívül más, olyan mechanizmusokat találjunk, amelyek létrehozzák, biztosítják az előrehaladást.

Ehhez a problémához kapcsolódik az a más oldalról kiinduló kérdésfeltevés, hogy vajon természeti folyamatok koherens leírása megvalósítható-e a véletlenszerűség és szükségszerűség kategóriáinak merev egymásmellettiségben történő alkalmazásával. Egy korábbi közismert, voluntarisztikus állásponttal szemben természetesen pozitívnak tekinthető az a felfogás, amelyben a fejlődés dialektikája a mutáció véletlenszerűségének és a szelekció szükségszerűségének egységeként jelenik meg [pl. 36]. Valójában ez a megoldás inkább a két kategória egymásmellettiségét — mivel két elkülönült szférában és időben is elkülönülve jelenik meg — demonstrálja, semmint egységüket.

E dilemma megoldására többen felvetik, hogy szükséges lenne magának a mutációnak dialektikus interpretációja, mégpedig oly módon, hogy a szelekciós mechanizmus működését molekuláris szinten is ki kell mutatni. Ezzel megteremthető lenne a véletlen és szükségszerű egysége a mutáció szféráján belül is [27].

Hogy e megoldási lehetőség használhatóságát felmérjük, mindenekelőtt meg kell vizsgálni, hogy egyáltalán mit értünk véletlenszerűség alatt, s mi a tartalma a mutáció véletlenszerűségének. Ez az elemzés vissza fog vezetni a kiinduló kérdésfeltevéshez is.

Problémák a mutáció és a szelekció értelmezése körül

1. A véletlenszerűség követelményének motívumai

Mindenekelőtt különbséget kell tenni a változások azon típusai, amelyek egy adott struktúra lényegéhez tartozó, belsőnek nevezhető mozgásából erednek, s azok között, amelyek e belső mozgástól független tényező (a genetikai struktúra esetében például sugárzás) hatására jönnek létre, ez utóbbiak számára fenntartva a véletlen kategóriáját. Így eredetileg a mutáció véletlenszerűségének tétele valószínűleg összefüggésben állt a DNS-struktúra stabili-

tásáról, lényegi változatlanságáról vallott felfogással, hiszen ebben a koncepcióban a struktúra *önmozgása* által létrehozott ismétlődéshez — a DNS replikációja során keletkező azonos utódmolekulákhoz — képest, a változás esetleges, idegen mozzanat. Jól illusztrálja ezt a megközelítésmódot JACOB fogalmazásmódja, aki többször nyomdai szövegbe csúszott hibához hasonlítja a mutációkat [16].

A mutációk esetlegessége — azon túl, hogy külső hatásra lépnek fel — egyben azt is jelenti, hogy meghatározhatatlan, hogy hol, a genom mely részén, s milyen típusú változás következik be. Ez az esetlegesség ugyanúgy benne van a WATSON-CRICK modellben, mint a struktúra lényegi stabilitása. Miközben ugyanis a komplementer bázispárok, illetve a két szál között a legszigorúbb törvényszerűségeket állapítja meg, a láncok hosszában, az egymást követő bázisok sorrendjének tekintetében — ami végül is a genetikai információt hordozza — teljes esetlegességet enged meg. A bázisok sorrendjében a variációk végtelen száma valósulhat meg. A változatok e — gyakorlatilag — végtelen lehetőségéből az élővilág egész fennállása folyamán viszonylag mégiscsak kisszámú variációt valósított meg. Vajon ezt a véletlen művének kell-e tekinteni?

Az utóbbi időben vannak már arra vonatkozó megfigyelések, hogy a DNS lánc bizonyos helyeinek bázisösszetétele befolyásolja a mutáció-rátát vagy akár a bekövetkezhető mutáció típusát. PRESBER és mtsai ismertetnek ilyen adatokat [27]. Közlik, többek között, hogy a T4 fág lizozim génje tartalmaz egy AT sorozatot, ahol az ún. fáziseltolódás mutációk egy véletlenszerű eloszláshoz képest nagyobb gyakorisággal fordulnak elő. Eukarióták szatellita DNS-eiben, amelyek poli-AT sávokat tartalmaznak, szintén nagyobb arányú mutáció található. Viszont azok a fragmentumok, ahol a CG bázispár koncentrálódik (például a riboszomális RNS-t kódoló gének ilyenek) nagymértékben védve vannak a mutációktól.

Noha az ilyen természetű adatok még meglehetősen korlátozottan állnak rendelkezésre — nem utolsósorban a bázissorrendre vonatkozó ismereteink hiányosságai következtében — elkerülhetetlen az a hipotézis, hogy a genetikai struktúra, ugyanúgy mint más strukturált rendszer, nem passzív elviselője az őt érő hatásoknak. Egy ténylegesen bekövetkező változás mindig az adott, a hatásoknak kitett struktúra *„szűrőjén"* keresztül valósul meg. Ez azt jelenti, hogy a kiinduló struktúra minősége egyrészt behatárolja azokat a tényezőket, amelyek változtató hatást gyakorolhatnak rá, másrészt behatárolja azokat a változásokat, amelyek adott minőségéből kiindulva bekövetkezhetnek. A reális folyamatokban tehát nem létezik a mutációk és az általuk létrehozható eredmények matematikailag kalkulált végtelen variációja, hanem csak a lehetséges változásoknak egy — a struktúrától függő — *spektruma.*

A véletlennek az a felfogása, amely a változásoknak végtelen lehetőséget biztosít, tulajdonképpen azzal az elvárással van szembeállítva, amely egy hatásra egy adott kimenetelt ír elő, azaz a determinizmus mechanikus értelmezésével. Az a tapasztalat tehát, hogy valamely hatásra nem egy lehetséges változás következik be, implikálja annak véletlenként való minősítését. A felszínen mutatkozó ellentét mellett valójában mindkét megközelítésmód közös abban, hogy a kiinduló struktúra minőségét közömbösnek tekinti a változás szempontjából. Csakis e közömbösség alapján gondolható el akár a változások végtelen, akár az előre megadható egyetlen kimenetel lehetősége. Így a fenti értelemben vett véletlen és szükségszerű egysége sem fogja a folyamatokat

precízebben leírni. E kategóriákhoz tapadt egyoldalú interpretációk miatt helyesebbnek látszik a *valószínűség* kategóriájának alkalmazása, amely kifejezi a hatások és a struktúra kölcsönhatásaként kialakított spektrum-jellegű változási tendenciákat, a determináltság szelektív jellegét. A véletlenség mozzanata pedig annyit jelent, hogy egyetlen struktúra sem annyira zárt, hogy rajta kívüli tényezők ne gyakorolnának befolyást belső mozgásaira.

Amikor azt állítjuk, hogy a struktúra minősége behatárolja a változások, a mutációk lehetőség-tartományát, azt is mondjuk, hogy a különböző minőségű, szervezettségi-fokú struktúrák ezt különbözőképpen valósítják meg. Azokban a példákban, amelyekből a gondolatmenet kiindult (az AT bázispárok nagyobb és a CG párok kisebb mutáció-rátája) a DNS-struktúra általános kémiai törvényszerűségei — a gyengébb, illetve erősebb hidrogénkötések — képezték a rendszer „szűrőmechanizmusát". Ezek mindenféle DNS-molekulában megtalálhatók, tekintet nélkül annak egyéb lehetséges szerveződésétől. Amint később majd látni fogjuk, magasabb rendű organizmusokban találhatók olyan DNS részstruktúrák, amelyek a láncokat hosszában tagolják, például az ismétlődő szekvenciák. Ezek fajról fajra mutációk következtében megváltoznak, de valamiképpen egymással szinkronban, ami arra utal, hogy ezekben a részstruktúrákban jóval szűkebb a változás spektruma, mint rajtuk kívül. Feltehető, hogy az organikus fejlődés során a mutációk valószínűségének skálája csökken, amennyiben a belső szervezettségi-fok növekszik.

Itt azonban még egy lépéssel tovább kell mennünk. Elfogadva azt a megszorítást, hogy adott lehetőségtartományban lépnek fel változások, még mondhatjuk azt, hogy mivel a genetikai struktúra lényegi mozgása, a DNS replikáció változatlan ismétlődés, a változás pedig külső hatásra következik be, a mutációkat továbbra is véletlennek tartjuk. Ebben az esetben a véletlen jelentése nem az lesz, hogy meghatározatlan, hanem az, hogy a rendszeren kívüli tényező hatásának eredménye.

A populációgenetika már hosszabb idő óta abból indul ki, hogy a faj egysége, állandósága mellett a faj tagjainak genetikai állománya nagyfokú heterogenitást mutat. Ez azt is jelenti, hogy minden faj életképessége egy specifikusan optimalizált mutációrátát igényel, amely elég magas ahhoz, hogy lehetővé tegye az adaptációt, de elég alacsony, hogy garantálja a faj genetikai stabilitását [27]. Mindez azt jelenti, hogy a mutabilitást biztosítani és egyben kontrollálni kell, nem lehetséges a mutációkat pusztán külső hatások eredményének tulajdonítani, azoknak valamiféleképpen kapcsolatban kell lenniük a genetikai struktúra belső működésével.

Molekuláris biológiai kutatások nyomán ténylegesen fény derült arra, hogy a mutabilitás szempontjából a külső „katasztrófaszerű" hatásoknál jelentékenyebb tényezőnek kell tekinteni magának a belső miliőnek a változékonyságát, amelyet a sejt normális működése teremt meg, azaz a mutációk a genetikai anyag belső természetéből (is) adódnak.

A mutáció-gyakoriság és a replikációs hibák alapvetően a replikációs mechanizmus kémiájától és maguknak a DNS-ben szereplő bázisoknak a kémiai tulajdonságaitól függnek — állapítja meg RICHARDS, hivatkozva TOPAL és FRESCO modelljére, amelyben két gyakran előforduló pontmutáció-típust (a transzverziót és a transzíziót) a bázisok termodinamikai tulajdonságai által meghatározott tautomer átrendeződésére vezettek vissza [29].

Más vizsgálatok kimutatták, hogy bizonyos polimerázok és a DNS-szintézisben szerepet játszó más proteinek befolyást gyakorolnak a mutációk gyakori-

ságára, ennek alapján ezek génjeit mutátor géneknek nevezték el. PRESBER és mtsai több adatot ismertetnek a polimerázok mutátor hatásával kapcsolatban fágokban és baktériumokban, s hozzáteszik, hogy valószínűleg minden polimeráz génje rendelkezik mutátor tulajdonsággal, aminek segítségével például a sejtek természetes öregedését is magyarázni lehet [27].

A polimerázok mutátor tulajdonságának jelentősége még fokozódik, ha — korábbi hipotézisekkel ellentétben — beigazolódik az a feltevés, miszerint a DNS-nek nemcsak egyik, hanem mindkét szála rövidebb szakaszokban replikálódik, amelyeket utólag polimerázok kapcsolnak össze [24].

Az élő szerveződés azonban nemcsak a mutációk előidézésének képességével, de azok kontrolljának képességével is rendelkezik. Ismeretesek reparációs mechanizmusok, illetve olyan enzimek, amelyek kihasítják a hibásan szintetizálódott DNS-szakaszokat, lehetővé téve a pontos újramásolást.

Mindezek alapján a mutációk véletlen eseményként való értelmezése, amennyiben ennek tartalma akár az esetlegesség, akár a struktúra-idegenség, pontatlan. Semmi sem indokolja, hogy a mutációkat bármely más természeti jelenséghez képest inkább véletlennek, vagy egyáltalán véletlennek tartsuk. Feltehetően ezen a területen is ki lehet mutatni majd olyan valószínűségi törvényeket, amelyek leírják a változások tendenciáit.

A mutációk véletlenszerűségének a fenti, tulajdonképpen a meghatározatlanság értelmében vett használati módja mellett, van egy másik értelmezése is, mégpedig a *célszerűség* ellentéteként való értelmezése. Röviden megfogalmazva, a mutációk azért véletlenek, mert nem célszerűek. Ebben az esetben e kategória használatával azt akarják kifejezni, hogy a genetikai struktúrában bekövetkező változások nincsenek összefüggésben, előzetes összhangban az élőlény alkalmazkodási szükségleteivel. Ez a követelmény természetesen helytálló. Csupán azt a kérdést veti fel, hogy mi indokolja a célszerűséggel szemben a véletlen kategória használatát, hiszen a célszerűség ellentéte a „hátulról jövő", oksági értelmű meghatározottság. Ebben a kritikai észrevételben nemcsak a filozófusnak a kategóriák precíz használata iránti igénye szólal meg. Sokkal nagyobb problémának látszik, hogy a tisztázatlan fogalomhasználat következtében a véletlen különböző jelentéstartalmai folytonosan összemosódnak, s az a látszat keletkezik, hogy a véletlen e két — valójában független — vonatkozása csak együttesen fogadható vagy vethető el. Igen pregnánsan fogalmazódik meg ez az összefüggés a *Vaproszi Filoszofii* hasábjain nemrég lezajlott vitában. Az egyik álláspont azt hangsúlyozza, hogy az evolúció során kidolgozódik az élő rendszer önszabályozó mechanizmusa, amely a mutációk kontrolljával is rendelkezik. De ez egyben azt is jelenti, hogy *a mutációk* nem tisztán véletlenszerűek, *nem irányítatlanok* [40]. A másik álláspont a mutációs folyamat véletlenszerű jellegét védelmezve, felsorolja az azt igazoló tényezőket. Ezek közül kiemeli bármiféle törvényszerű kapcsolat hiányát az újonnan keletkező mutáció és annak a külső környezethez való adaptivitása között, valamint a mutációk keletkezésének véletlenségét időben és térben, s az egyes mutációk egymástól való függetlenségét [15].

Világos, hogy az első esetben a struktúratörvényszerűségeknek a tudományos eredményeken alapuló megállapítása összekapcsolódott némi teleologikus mozzanattal, a második esetben fordítva, a teleologikus elem elvetése maga után vonta a strukturális összefüggések elvetését is.

2. *A mutáció véletlenségi elméletéből fakadó nehézségek*

A mutáció véletlenségi felfogása — többek között az előbb említett összemosási tendenciák következtében — egy sor nehézségre vezet a biológiai evolúció értelmezésében.

Áthidalhatatlan szakadék keletkezik az élő szerveződés szintjei között, a molekuláris-szint és az organizmus-szint között. Az természetesen nem vitatható, hogy a strukturális szintek minőségileg különbözőek, s az élő szervezetet mint egészt — sőt a szervezetek csoportjait mint még magasabb strukturáltsági szinteket, ezek működését, változását — nem lehet redukálni, visszavezetni a molekuláris-szint, s ezen belül az örökítő anyag biokémiájának törvényszerűségeire. (Mint ahogy nem lehet egy-egy génből *közvetlenül* egy-egy morfológiai vagy viselkedésbeli tulajdonságot levezetni, mégha egyes vizsgálatok ilyen közvetlen megfelelést ki is mutatnak.)

A magasabb strukturális szint az alacsonyabb szint elemeiből egységgé, totalitássá szerveződve a megelőzőhöz képest új mozgásmódra, s ezzel együtt a rajta kívülihez való viszonyában új kapcsolódási lehetőségekre, új determinálódási formákra tesz szert, röviden szólva új törvényszerűségek fogják jellemezni. Mindez azonban nem jelenti és nem jelentheti e szintek egymástól való teljes függetlenségét.

Hogy a véletlenségi felfogásból ilyen szétszakítás következik, jól illusztrálja Kimura és Ohta — az ún. neutralista vagy nem-darwinista fejlődéselmélet reprezentáns képviselőinek — munkássága. A mutációk véletlenszerűségét, „neutrális" voltát bizonyítandó — mint később látni fogjuk erre az előfeltevésre alapozva — összehasonlították a fejlődéstörténet különböző fokain álló fajok néhány tipikus fehérjéjét (globinokat, albuminokat, fibrineket). Az összehasonlítás eredményeképpen azt kapták, hogy a homológ fehérjék változási üteme, az aminosav-pótlás rátája az evolúció során állandónak bizonyul. A mutációk tehát semlegesek a szelekcióval szemben, így függetlenek az organizmusok evolúciójától, hiszen a változások tempóját egyáltalán nem érinti, hogy ősi, konzervatív, nem, vagy alig változó csoportokról, vagy pedig gyorsan fejlődő csoportokról van-e szó. Úgy látszik tehát, hogy nincs korreláció az organizmusok morfológiai evolúciója és a fehérjék, illetve a megfelelő DNS-ek evolúciója között [18].

Egyes szerzők szerint a neutralisták számítási hibákat követtek el, olyan hosszú periódusokra adják meg az átlagos változási rátákat, hogy a különbségek eltűnnek. Ha ez így van, ez csak kifejeződése egy hamis elméleti előfeltevésnek, a véletlenszerűségnek. Olenov egy, a neutralista felfogást bíráló cikkében a következőket írja: „Még ha a további kutatások feltárják is, hogy különbségek némelykor mégis vannak (ti. az aminosav-pótlás rátájában) az aminosav-összetétel változásainak hasonló tempói konzervatív szisztematikai csoportoknál, amelyek megőrződtek tíz- és százmillió éveken át, anélkül, hogy organizációjukat lényegesen átépítették volna, és a progresszív formáknál, amelyek ugyanezen idő alatt radikálisan megváltoztatták felépítésüket, magyarázatot követel. Előfordul, hogy egy kérdésre azért nem lehet válaszolni, mert rosszul van megfogalmazva" [26].

A mutáció véletlenszerűségének alapján azonban nemcsak az mondódik ki, hogy a szintek fejlődése között nincs összefüggés, hanem az is, hogy a morfológiai szinttel szemben a molekuláris szinten a fejlődés kategóriája értelmezhetetlen, alkalmazhatatlan. Amennyiben használjuk is ezt a kifejezést, pusztán

annyit jelent, hogy a genetikai struktúra mássá lett. Sem mechanizmusa, sem kritériuma nincs molekuláris szinten a fejlődésnek.

A neutralista felfogással szemben egyre gyakrabban találkozhatunk egy olyan megközelítésmóddal, amely szerint a szelekció az élő szerveződés minden szintjén működő mechanizmus, így molekuláris szinten is [14, 17, 26]. Ez a megközelítésmód lehetővé teszi, hogy a genetikai struktúrát vagy annak egyes elemeit fejlődési folyamat eredményeként fogjuk fel. Így például ISHIGAMI [14] véleménye szerint a mai univerzális kodon-aminosav megfelelés nem véletlen (egy csapásra megjelenő) kapcsolódás, hanem fokozatos kidolgozódás eredménye a szelekció mechanizmusán keresztül. Felteszi, hogy a primitív körülmények között ugyanazzal az antikodonnal rendelkező, de különféle aminosavakat szállító (és fordítva) t-RNS-ek lehetségesek, amelyek közül egymással versengve, az alkalmatlanok kihullanak, elvesznek. Természetesen azonnal felmerül a kérdés, hogy mi a kritériuma a szelekciónak, mi dönti el ezen a szinten, hogy valamely változat alkalmas-e vagy alkalmatlan. A szerző válasza az, hogy az ősi polipeptid láncoknak (primitív fehérjéknek) az a tendenciájuk, hogy minél változatosabbá váljanak.

A neutralisták azzal érvelnek a szelekció, mint a molekuláris fejlődést biztosító tényező ellen, hogy az ártalmas mutánsok szelektív eliminációja (negatív szelekciója) és a neutrális (vagy csak csekély mértékben káros) mutációk véletlenszerű megrögződése (amelyek éppen semlegességüknél fogva tekinthetők véletlenszerűnek) sokkal gyakrabban fordul elő az evolúcióban, mint a határozottan előnyös mutánsok pozitív darwini szelekciója. Ezt az a tény is bizonyítja, hogy nem a funkcionálisan fontos DNS részek változnak gyorsan, ami igényelné az előnyös mutánsok felhalmozódásának magyarázatát, hanem a funkcionálisan semleges területek.

Az érvelés korrektsége — noha a fenti tényt sokan bizonyították — vitatható, hiszen olyan szelekciós kritériumot alkalmaz (az előnyös-hátrányos jelleg), ami az organizmus egésze szempontjából releváns, a makromolekulák szintjén és „nézőpontjából" csak teleologikus értelme lehet. Ezzel szemben a tiltakozás jogos. Ugyanakkor nem lehet kizárni azt a lehetőséget, hogy a molekuláris rendszer saját természetéből fakadó szelekciós elvet találjunk. Ebbe az irányba mutatnak JORRE és CURNOW kutatásai [17], melyek eredményeként azt a konzekvenciát vonják le, hogy a szelektív tendenciák az aminosavak termodinamikai tulajdonságaival vannak kapcsolatban. Ez a megállapítás összhangban áll azzal a korábbi feltevésünkkel, hogy a lehetséges mutációs eseményeket a kiinduló struktúra határolja be.

A molekuláris szinten felmerült szelekciós problémák átvezetnek magának a szelekciónak általánosabb, a szelekció és evolúció összefüggését érintő kérdéseihez.

3. A szelekció szintjei

A természetes szelekciót DARWIN elsősorban mint individuális szelekciót írja le, az egyedek között a létért, a szaporodásért folyó küzdelem során kiválogatódnak a többiekhez képest előnyösebb tulajdonságokkal rendelkezők. Mivel a környezeti adottságok helyről helyre, s időben is változók, e különböző feltételekhez mérten a faj egyes csoportjaiban más és más tulajdonságok válhatnak előnyössé, ami a faj fokozatos divergenciáját, majd új faj megjelenését idézi elő.

DARWIN maga is felismerte, hogy vannak olyan jelenségek, amelyeket az individuális szelekció nem magyaráz meg kielégítően. A szociális rovarok között található ivartalan (tehát szaporodásra képtelen) egyedekkel kapcsolatban megjegyzi, hogy „ha ezek a rovarok társas életet élnének, és a közösségek hasznára válna, hogy évente nagyszámú munkaképes, de szaporodásra képtelen egyed szülessék, akkor nem látom semmi akadályát annak, hogy ez miért ne történhetnék természetes kiválasztás útján" [14].

Valóban itt felmerül az egyed fölötti szelekciós mechanizmus lehetősége, amelyet a 30-as évektől kezdve mindinkább általánosítanak. A csoportszelekció elméletének rendszeres kidolgozását WYNNE-EDWARDS nevéhez szokták kötni, aki mindazoknak a mechanizmusoknak a kialakulását, amelyek a populációnagyság, s egyáltalán a populáció-működés (pl. territorialitás, ritualizált agresszió) szabályozásában szerepet játszanak, a csoportszelekció működésére alapozta [38].

A csoportszelekció elve nem kérdőjelezi meg az individuális szelekció szerepét, de az evolúció szempontjából az egyed helyett a csoportra helyezi a nagyobb hangsúlyt. Egyes kísérleti vizsgálatok eredményei is alátámasztják ezt a hangsúly-eltolódást. Ha az individuális- és csoportszelekció ugyanabba az irányba hat, a kérdéses jelleg változásának rátája szignifikánsan nagyobb, mint egyedül individuális szelekció alapján várható, ha viszont ellentétes irányban hatnak, a csoportszelekció bizonyul erősebbnek [37].

A populáció tehát nem pusztán kerete az egyedek életének, hanem önálló egység, totalitás, az egyedekhez képest magasabb szintű organizáltság, amely egészként állhat szembe valamely hatással. Ez a megközelítésmód lehetővé tette bizonyos evolúciós problémák differenciáltabb megválaszolását.

Az alapvetően individuális szelekcióra alapozott elmélet csak a lassú, fokozatos, átmeneti formákat létrehozó evolúció lehetőségével áll összhangban. A fejlődés ettől eltérő ütemére, stagnáló vagy igen gyorsan változó taxonok létére extrém környezeti hatásokban található magyarázat. Kiderült azonban, hogy eltérő populációk analóg környezeti változásokra eltérően reagálnak, ami a populáció-nagyság és a genotípus variabilitásának összefüggésével áll kapcsolatban. E szerint elszigetelt kis populációk csak stabil környezetben képesek fennmaradni, lassan vagy gyorsabban változó környezetben egyaránt kipusztulnak. A nagyméretű populációk számára a lassan változó környezet a legalkalmasabb, ahol lassan és biztosan fejlődnek. A gyors evolúciós változások lehetősége a faj területének perifériáján alakuló, a nagy populációból kiszakadó, félig-izolált leány-kolóniáknak jut, illetve ilyen kolóniák sorozatának, melyek közül sok kipusztul [10]. A csoport szelekción keresztül megvalósuló evolúció éppúgy igényli az egyes csoportok keletkezését és kihalását, mint az individuális szelekció az egyedek születését és halálát.

A természetes szelekció, mint azt DARWIN többször hangsúlyozta, fokozatos fejlődést involvál, számos átmeneti típust létrehozva. Hogy nincs empirikus bizonyítékunk ezekre az átmeneti fajokra, ezért a paleontológiai kutatások nagyfokú korlátoltsága tehető felelőssé. Az utóbbi időben vannak, akik úgy vélik, hogy újabb és újabb fosszíliák felszínre hozása sem fogja igazolni az evolúció graduális modelljét, ellenkezőleg: a meglevő adatok pozitívan bizonyítják a fejlődésben bekövetkezett ugrásszerű változásokat. Így például a legtöbb emlősrend megjelenése a Paleocén és a legkorábbi Eocén közötti időre tehető, ami azt jelenti, hogy a primitív őstől kb. 12 millió év alatt differenciálódtak. Mivel egy emlősfaj átlagos létideje (amelyen belül lényeges strukturális

változást nem szenved) 1—2 millió év között van, a rendelkezésre álló idő nyilvánvalóan kevésnek bizonyul, ha a természetes szelekciót tekintjük alapvető mechanizmusnak, így átmeneti alakzatokat elvi megfontolásokból nem is várhatunk [33]. A szerző maga egy, a természetes szelekcióval analóg mechanizmust javasol, amely nem az egyed és nem a populáció, hanem a faj szintjén működik, s amelyet speciációnak nevez. Minthogy azonban erről a mechanizmusról néhány homályos analógián túl semmi határozottat nem tud mondani azon kívül, hogy fellépését a véletlen körébe utalja, ezt a problémát is — több eddig felvetett kérdéshez hasonlóan — egyelőre nyitva hagyjuk.

Megengedve azt a lehetőséget, hogy a szelekció az organizáltság különböző szintjein működik, látni kell, hogy az adaptáltság nem tekinthető általános érvényű kritériumnak. Amit az egyed szintjén működő természetes szelekció lényeges mozzanatának tartottunk, nem vihető át változatlanul más szintek leírására. A csoportszelekció működése keresztezi az individuális szelekciót, hiszen ami a csoport számára előnyös, az egyed számára hátrányos lehet és fordítva. E szintekkel kapcsolatban tehát az adaptáltság kategóriáját differenciáltabban kell meghatározni. Ami pedig a molekuláris szintű szelekciót illeti, egészen más természetű kritériumokat kell találni. Sokkal valószínűbb azonban, hogy ezen a szinten a változások értelmezésére nem a szelekció a legadekvátabb kategória.

4. Az alkalmazkodás kategóriájának nehézségei

De vajon az a tény, hogy a természetes szelekció az alkalmasabb egyedeket részesíti előnyben (az alkalmasságot itt már — a korábban elmondottak alapján — rugalmasan értelmezve, tehát konkrét feltételektől függő, s nem elszigetelt, hanem csoportkapcsolataiban létező egyed tulajdonságaként felfogva) szükségképpen azt is jelenti-e egyben, hogy az evolúció az alkalmasságban történő előrehaladás, tökéletesedés? Nem lehetséges-e, hogy mivel az élővilág fejlődését, sőt magának az életnek a keletkezését is akarva-akaratlanul a ma létező, élő formák nézőpontjából vizsgáljuk, a természet „harmóniájának" nézőpontjából, amely felöleli az élő sejt parányi, de hihetetlenül precíz vegykonyháját, az organizmusok alkalmazkodottságát környezetükhöz, az ökoszisztéma egyensúlyát stb., az alkalmazkodást biztosító mechanizmust az egész folyamatra eme előítélet alapján extrapoláljuk, ezzel bizonyos teleologikus mozzanatokat megőrizve? „Látjuk tehát — írja SZMIRNOV [36] —, hogy az egyes mutációs változásnak nincs előre megszabott iránya. Ez kizárja a teleologikus magyarázat lehetőségét, hiszen a mindenkori változás bizonyulhat hasznosnak is, károsnak is. A változások irányát a természetes szelekció határozza meg." De vajon ez utóbbi nem engedi meg a teleologikus magyarázat lehetőségét?

Valójában nehezen lehetne a szerves evolúció nagy állomásait úgy leírni, mint amelyek az egyre tökéletesebb alkalmazkodást reprezentálják. GÁNTI TIBOR egy sor meglepő példát hoz fel annak illusztrálására, hogy a primitív szervezetek — pl. algák, baktériumok — milyen fantasztikusan tudnak alkalmazkodni egészen szélsőséges feltételekhez. Majd megállapítja, hogy az élőlények teherbírását nem a magas rendűek körében kell vizsgálnunk, mert ezek bizony csak elég kis mértékben képesek alkalmazkodni a külső környezet változásaihoz. Minél primitívebbek az élő organizmusok, annál szélsőségesebb körülmények között képesek élni [8].

Egy közelmúltban megjelent tanulmány [31] határozottan leszögezi, hogy a természetes szelekció elmélete nem implikálja szükségképpen az alkalmasság növekedését az evolúció során. Az alkalmasság részben nem is tekinthető olyan mennyiségi meghatározottságnak, melynek növekedését le lehetne írni. Másrészt nem lehet az élő fajokat alkalmasság szerint rendezni.

Ez utóbbi megállapításoknak éppen azáltal van értelmük, hogy az alkalmasságot (vagy alkalmazkodottságot) nem tekinthetjük konkrét feltételektől független, azoktól elvonatkoztatható, absztrakt minőségnek. Csakis a fennálló környezeti adottságok relációjában dől el, hogy egy organizmus rendelkezik-e ezzel a meghatározottsággal vagy sem. Ezért adekvátabbnak tűnik úgy fogalmazni, hogy a természetes szelekció rövid távon (természetesen természettörténeti értelemben rövid távon), meghatározott intervallumon belül szab irányt a mozgásoknak, de az össz fejlődési folyamat irányát mégsem határozza meg. Amennyiben mégis arra az álláspontra helyezkedünk, hogy a természetes szelekció az evolúció egészének irányát kijelöli, azt kell mondani, hogy a még mindig meglevő teleologikus szemléletmód maradványa, a fejlődési folyamat célszerűsége iránti lappangó igény fogalmazódik meg ebben.

Így mindaddig, ameddig a fejlődési folyamat irányát az alkalmazkodottsághoz mérjük, a genetikai változások ehhez képest mindig esetlegesnek, véletlenszerűnek tűnnek, mivel egy mutáció önmagában valóban mindig lehet hasznos is, káros is, vagy közömbös.

Amikor tehát a molekuláris biológia a genetikai anyagban történő változás véletlenszerűségét hangsúlyozza, az organizmus-szintű fejlődést teleologikus jellegűnek elismerve, s azzal szembeállítva teszi.

Ennek az elméleti megközelítésmódnak az alapján mindig megőrződik a molekuláris-szint és az organizmus-szint elválasztottsága, még akkor is, ha — mint ahogy korábban már utaltunk rá — a mutáció determinisztikus értelmezéséhez vannak már kísérleti adatok, és ez irányba mutató interpretációk. Noha ezek az eredmények alapvetően fontosak a továbblépés szempontjából, még csak az mondódik ki, hogy a természetnek ez a szférája nem unikum, törvényszerűségek itt is érvényesülnek, a genetikai anyag változása azonban továbbra is „puszta nyersanyag" marad egy hozzá képest idegen fejlődési folyamat számára.

Az evolúció komplexebb értelmezésének lehetősége

1. A fejlődés fogalmáról

Mindenekelőtt meg kell állapítani, hogy a környezet fogalmát az eddigiekben magunk is egyoldalúan, tulajdonképpen meg nem engedhető értelemben, a tiszta objektivitás értelmében használtuk. Azaz környezet alatt az adott organizmus *lététől* függetlenül létező, függetlenül változó természetet (vagy annak egy darabját) értettük. Amikor ezt az értelmezést egyoldalúnak tartjuk, nem arra gondolunk, hogy az élő szervezet maga is aktívan „visszahat" a környezetre, a környezet milyenségét az élettevékenység befolyásolja, ami egyébként reális és lényeges összefüggés. (Az élővilág eme aktív környezetformáló hatásával kapcsolatban leggyakrabban a légköri szabad oxigén keletkezését szokták példának felhozni.)

Az egyoldalúság abban nyilvánul meg, hogy a fenti környezet-fogalomban az organizmust körülvevő természet az organizmus *minőségétől* függetlenül

jelenik meg környezetként. Csakis ennek alapján lehetett azt állítani, hogy a primitív szervezetek jobban alkalmazkodnak környezetükhöz, mint a magasabb rendűek.

Valójában az a helyzet, hogy az élőlényt környező természet nem a maga egészében, nem a maga objektív végtelenségében (egy térbelileg körülhatárolt természetdarab is végtelen minőségi sokféleség) funkcionál környezetként, hanem csak olyan vonatkozásaiban, amik hozzáférhetők az adott élőlény számára, éppen az ő minősége, képessége, struktúrája alapján. Minél primitívebb egy szervezet, annál kevésbé tagolt, sokoldalú számára a külvilág, amelynek objektíve végtelen komplexitását, heterogenitását a saját korlátoltsága — a hatások differenciálására való korlátozott képessége — homogenizálja. Ezért lehetséges az, hogy a „legszélsőségesebb" környezeti feltételeket képes elviselni. A magasabb rendű szervezetek, amelyek a képességek összetettebb rendszerével rendelkeznek, a külvilág többféle tényezőjére tudnak reagálni, a környezet maga differenciáltabbá válik számukra. Ez ugyanakkor nagyobb függőséget is eredményez. Így a magasabb rendűek gyengébb alkalmazkodóképessége, pontosabban nagyobb fokú érzékenysége éppen annak a következménye, hogy több információ, többféle hatás jut el hozzájuk.

Persze az a tény, hogy a szervezet minőségének óriási szerepe van a természet-darab környezetté tagolásában, nem jelenti azt, hogy ezáltal az objektum minősége válik közömbössé. A vagy-vagyok alternatívája — vagy a környezet vagy a szervezet — itt is hamisnak bizonyul. A különböző természeti szférák a maguk objektivitásában teszik többé vagy kevésbé lehetővé a tagolást. Így a víz például sokkal kevésbé alkalmas közeg a tagolásra, mint a szárazföld. Nem véletlen, hogy a legmagasabb rendű szerveződésformák nem a tengerben, hanem a szárazföldön jöhettek létre.

Mindezek alapján az élő szervezet és környezet kapcsolatában nem az alkalmazkodottság értékkritériumát, hanem a tagoltságot, a komplexitást kell kiemelni, ami evolúciós vonatkozásban nem az egyre tökéletesebb alkalmazkodás megvalósulását, hanem e kapcsolatban a komplexitás növekedését, azaz végső soron az élő anyag szervezettségének növekedését jelenti.

Nem véletlenül használtuk az alkalmazkodottsággal kapcsolatban az értékkritérium kifejezést. Az alkalmazkodottság foka az élő egyed vagy a faj számára az életben maradás, a túlélés esélyének a foka, ami pedig az élő anyag törekvése, „célja". Valójában az értékmozzanat bevitele egy (bármilyen) fejlődési folyamat interpretációjába, óhatatlanul teleologikussá teszi azt, hiszen egy kívánatos állapot — retrospektíve megragadva — szabja meg, tereli mintegy a maga irányába a folyamatot.

A komplexitás-növekedésként felfogott evolúció kikerüli ezt a nehézséget. Lehetővé válik következetessé tenni azt a megállapítást, hogy olyan iránynyal rendelkező (hiszen fejlődő és nemcsak mássá váló) folyamatról van szó, amelyben az irányt semmilyen vonatkozásban sem a jövő, hanem a múlt, a megelőző történelem adja, amely valóban hátulról és nem visszamenőlegesen határozódik meg. Egy, a megelőzőhöz képest komplexebb rendszer nem azáltal áll elő, hogy valamely eleme pusztán mássá lesz, hanem azáltal, hogy a már meglevő struktúrához új elem adódik hozzá. Az új elem hozzáadásának lehetőségét, valamint a lehetséges új elemeknek a körét, spektrumát a kiinduló struktúra határozza meg. Az új elem beépülése természetesen nem hagyja érintetlenül a bázist sem, az új elemmel kiegészülve, módosult, új totalitás jön létre. Ezt a mozgást a *ráépülés* fogalmával lehetne kifejezni. Mindez nem azt jelenti,

hogy minden változás ilyen jellegű — hiszen nem minden változás evolúció is egyben — csupán azt, hogy az evolúciós változásokban kimutatható. Másrészt nem is minden rendszer képes a fejlődésre.

Az evolúció itt vázolt értelmezése azonban felvet egy másik problémát, azt tudniillik, hogy milyen mechanizmus hozza létre a rendszer komplexitásának növekedését. Kétségtelennek tűnik, hogy a szelekció önmagában nem tehető felelőssé ezért, hiszen csak meglevő lehetőségek közül tud válogatni, új lehetőségeket nem teremt. Továbbá, ha a molekuláris változások puszta mássá levések (irány nélküli változások), megint csak érthetetlen, hogy miként jön létre az összetettebb rendszer. Kényszerítő erejű az a feltevés, hogy a genetikai anyagnak mégiscsak rendelkeznie kell a fejlődés tendenciáját hordozó változás lehetőségével.

Miután megkíséreltük az organizmus-szintű evolúció fogalmából a feltevésünk szerint még mindig meglevő teleologikus mozzanatot kiiktatni, meg kell vizsgálni annak a lehetőségét, hogy az integráció-növekedésként felfogott fejlődés, tehát ebből a szempontból iránnyal bíró változási folyamatok a genetikai anyag szintjén kimutatható-e. Amennyiben igen, ez egyben azt is jelenti, hogy korán sincs olyan szakadék a két szint — egyazon totalitás két szintje — között, mint ahogy azt némelyek vélik, s az egységet nem is a véletlen és szükségszerű külsődleges egyesítése teremti meg.

Azt azonban elöljáróban meg kell állapítani, hogy a bizonyításra felhozható tényanyag jelenleg még meglehetősen csekély. Ennek alapvetően két okát lehet megjelölni. Az egyik az az előítéletes kutatói beállítottság, amely egyáltalán nem is keres fejlődésgenetikai összefüggéseket. A másik, s ez talán pillanatnyilag még komolyabb nehézség, még mindig korlátozottan állnak rendelkezésre olyan technikák, melyek segítségével az összehasonlító genetika számára nagy mennyiségű és sokoldalú adatot lehetne adni.

2. Duplázódási tendenciák a DNS-ben

Amennyiben a magasabb rendű szervezeteket komplexebbnek, többféle funkció elvégzésére képesnek tartjuk, mint az alacsonyabb rendűeket, ennek a különbségnek meg kell mutatkoznia az információt hordozó anyagi szubsztancia, a DNS mennyiségi különbségében. Valóban azt találjuk, hogy a legprimitívebb szervezetek és a fejlettebbek DNS mennyiségében több nagyságrendű különbség van. Az *Escherichia coli* baktérium sejtjében levő DNS hossza kb. 1,1 mm, az ember sejtmagjában található fonalak kiterítve kb. 1,74 m hosszúak lennének [35]. (Ez a mennyiségi különbség nem jelenti azt, hogy a struktúrgének számában is ugyanakkora eltérés található.)

Nyilvánvaló, hogy ez a mennyiségi növekedés nem tulajdonítható pontmutációnak, olyan mutációnak, melynek során egy-egy bázis cserélődik ki. Ohno [25] más problémával kapcsolatban felvetette egy olyan mechanizmus — a génduplikáció — lehetőségét, ami ezt a jelenséget is magyarázhatja. Abból indult ki, hogy a természetes szelekció nem engedi meg olyan mutációk megőrzését, amelyek funkcionális polipeptid láncokat kódoló géneket érintenek. Így az allél-mutációk nem vezethetnek már meglevő gének funkcióváltozásához. A gén duplikációjának eredményeként azonban létrejön az eredetivel azonos, tehát funkcionálisan felesleges lokusz, amelyen lehetőség nyílik korábban tiltott mutációk felhalmozódására is [25]. (Meg kell jegyezni, hogy a dupli-

káció lehetőségét valójában már sokkal korábban felvetették, a 40-es évek közepén, a pszeudoallélia jelenségének magyarázatára.)

OHNO duplikációs hipotézisét az utóbbi években sokan felhasználták, s gyakorlati tapasztalatok is vannak már, amelyek alátámasztják a gén-fejlődésnek ezt a mechanizmusát. MARKERT a tejsav dehidrogenáz enzim génjének duplikációját és azt követő differenciálódását írja le [20], a fejlődéstörténet különböző fokain álló organizmusokkal illusztrálva.

Ennek az enzimnek több izozimje ismeretes magasabb rendű gerincesekben. Az orsóhalnak csak egy LDH-t kódoló génje van, melynek terméke hasonlít az A-val jelölt LDH enzimhez. Ez tekinthető a duplikáció előtti, ősi állapotnak, melynek az orsóhal élő példája. A duplikáció következtében két, az eredetivel azonos gén keletkezik. A megduplázódott géneknek ezt az átmeneti állapotát lazacfélékben sikerült kimutatni. A fejlődési folyamat során a duplikátumon felhalmozódhatnak mutációk, az új gén fokozatosan elkülönül strukturálisan az eredetitől, ami egyben az eredetihez képest némileg módosult funkcionális tulajdonság megjelenését is eredményezi. A genetikai apparátus kezdi megkülönböztetni ezeket az eredetileg azonos géneket, módosulás jön létre a regulációban is, azaz e gének differenciált manifesztációjával találkozunk. Ezt az állapotot képviseli a legtöbb gerinces. A gén-evolúció utolsó állomása az, amikor ezek a gének teljesen függetlenné válnak egymástól.

A génduplikáció speciális esetének tekinthető, amikor a megkettőződött szakasz nem különül el önálló génné, hanem hosszabb láncot képezve az eredetihez képest bonyolultabb fehérjemolekulát hoz létre. A fehérje-szerkezet alapján ilyen mechanizmust feltételeznek többek között a kollagén kialakulásában [22].

A gén-fejlődés fent vázolt mechanizmusának két fontos mozzanatát kell kiemelni. Az egyik az, hogy a mutáció következtében megjelent új gén nem egyszerűen csak más funkcióval rendelkező, mint az eredeti, hanem általa a szervezet — az eredeti képesség több-kevesebb megőrzése mellett — plusz képességre (vagy lehetőségre) tesz szert. A másik az, hogy az új gén nem az eredeti struktúrától izoláltan tesz szert az új funkcióra, hanem azzal kölcsönös feltételezettségben, tehát csak azáltal, hogy beilleszkedik az eredeti regulációs rendszerbe.

A génszakasz vagy egy teljes gén duplikációja mellett felmerült a teljes genom megduplázódásának lehetősége. Megállapították például, hogy az *Escherichia coli* genomja egy ősi genom két egymást követő duplikációján keresztül jött létre. A következtetés azon a megfigyelésen alapult, hogy az *Escherichia coli* gyűrű alakú kromoszómáján a funkcionálisan rokon gének $^3/_4$ része 90° vagy 180° különbséggel helyezkedik el [39].

A teljes genom megduplázódása eredményezheti a legnagyobb taxonomiai csoportok, új törzsek megjelenését. E hipotézis ellenőrzése céljából SPARROW és NAUMANN közel 2500 prokarióta növény- illetve állatfajra vonatkozóan gyűjtötte össze a DNS/genom adatokat. Minden filogenetikai csoportból kiemelték a legalacsonyabb értéket – feltételezve, hogy ez az a minimális nukleinsav mennyiség, amennyi feltétlenül szükséges az adott filogenetikai csoport számára, az „alapterv" számára s ezeket függvényben ábrázolva megkétszereződések sorozatát kapták [32]. Figyelemre méltó, hogy hasonló értékek adódtak régen elkülönült, külön ágon fejlődő csoportoknál, mint például a nyitvatermőknél (növényvilág) és gerinceseknél (állatvilág), ami arra utal, hogy a duplikáció független, a törzsfejlődés során törvényszerűen

bekövetkező esemény. (Az okról és mechanizmusról inkább csak hipotézisek vannak, mintsem bizonyítékok.)

Az adatokból ugyanakkor az is nyilvánvaló, hogy a mennyiségi növekedés önmagában nem azonos a szervezettség fejlődésével, csupán ennek lehetőségét teremti meg. Már csak azért sem, mert az egyes taxonómiai csoportokon belül az egyes fajok a DNS/genom mennyiség széles skáláját reprezentálják, ami esetenként eléri vagy meghaladja a magasabb rendű taxon minimumát. A szerzők ezzel a jelenséggel magyarázzák, hogy bár a legmagasabb individuális értékek a gerinceseknél, illetve a zárvatermőknél találhatók, vannak primitívebb csoportok, pl. a tüskésbőrűek, ahol a minimális érték meghaladja a gerincesek minimális értékét, aminek valószínűleg az az oka, hogy ez az érték a törzs fejlődésének előrehaladottabb stádiumát képviseli, míg a valóságos minimális értékhez tartozó formák kihaltak. Mindenesetre a legegyértelműbben szembeállítható mennyiségi különbség a prokarióták és eukarióták között mutatkozik, ami egyúttal azt is jelenti, hogy ez utóbbiaknál a DNS már kromoszomális organizációba szerveződik.

3. DNS szekvenciák és kromoszómák

Az eddigiekben láttuk, hogy a DNS mennyiségi növekedése alapját képezi bonyolultabb, többféle funkció elvégzésére képes szerveződés létrejöttének. Valószínűnek látszik, hogy ez a mennyiség egy kritikus érték felett csak többkromoszómás rendszerbe szerveződve őrződhet meg. A mennyiség maga azonban nem biztosíthatja a kromoszómának mint alakzatnak a megjelenését, számát vagy formáját egy specifikus sejtben. Fel kell tételeznünk, hogy a DNS bázissorrendje — azaz speciális bázissorrend a DNS-ben szerepet játszik a kromoszomális organizáció kialakulásában. (DNS-és kromoszómafehérjék kapcsolatáról itt nem lesz szó.) Az utóbbi évek kutatásai alapján rendelkezünk egy-két olyan eredménnyel, amelyek a DNS-struktúra és a kromoszóma-struktúra kapcsolatára utalnak.

Anélkül, hogy az adott szakaszok pontos bázissorrendjét ismernénk, kimutatható, hogy a DNS kettős láncának vannak olyan szegmentumai, ahol az egyik lánc bázissorrendje a másik láncon fordítottan ismétlődik meg, ami annak következménye, hogy az egyik lánc hosszában egy szimmetriaponthoz viszonyítva (tehát fordított sorrendben) kiegészítő szekvencia található. Ezt a jelenséget palindromának nevezik az „indul a görög aludni" típusú nyelvi fordulatok analógiájára. Rövidebb palindroma szekvenciák el vannak szórva a DNS hosszában. Ugyanakkor csillósok kromoszómavégein, telomerjein hosszabb palindromák jelenlétét mutatták ki. Feltehető, hogy a kromoszómakarok végei általában palindromát tartalmaznak, minthogy ezek a szekvenciák igen stabilak azáltal, hogy önmagukkal hurkot képezve a DNS kettős spiráljának foszfát-oszlopa folytonos marad. CAVALIER-SMITH felveti, hogy a palindromáknak nagy jelentősége lehet az eukarióták genomjának kromoszomális szerveződésében, annál is inkább, mert hosszabb kiterjedésű palindromákat a prokariótákban nem találtak [2].

Amíg a palindroma szekvenciák feltehetően az eukarióta szervezetek kialakulásában, fejlődésében játszanak szerepet, a DNS-lánc egy másik, strukturálisan elkülöníthető szegmentuma valószínűleg a soksejtű szerveződési formák, a metazoák megjelenésében és továbbfejlődésében fontos tényező.

A DNS-ben vannak olyan szegmentumok, amelyek egy-egy példányban vannak jelen a genomban, ezeket nem-ismétlődő (single copy) szekvenciáknak nevezik. Ezekkel szembeállíthatók olyan DNS-részek, amelyek többszörösen fordulnak elő, ismétlődnek. Az ismétlődő szekvenciák lehetnek közepesen ismétlődőek, ezek 10—100 ezerszer fordulnak elő, és nagy mértékben ismétlődő szekvenciák (amit szatellita DNS-nek is neveznek, de ez nem azonos a kromoszóma szatellitának nevezett részével), amelyek milliószoros példányban is jelen lehetnek.

A közepesen ismétlődő szekvenciák a kromoszómák hosszában elszórva találhatók, nem ismétlődő szekvenciákkal váltakozva, azok közé beékelődve. Ezt az elrendeződést „Xenopus pattern"-ként is emlegetik, mivel először a *Xenopus laevis*-ben sikerült kimutatni [5], de megfigyelhető puhatestűektől az emlősökig, tehát olyan ősi struktúráról van szó, amely megelőzi a metazoák ősszájú és újszájú vonulatának divergenciáját. DAVIDSON és mtsai feltételezik, hogy az ismétlődő és nem-ismétlődő szekvenciák közbeékelődő, alternáló rendje, mintázata a soksejtű organizmusok evolúciójában játszik szerepet, amennyiben ez a struktúra szükséges a génaktivitás regulálásához, ami a sejtdifferenciálódás alapját képezi [5]. (Tudjuk, hogy a differenciált sejtekkel, szövetekkel rendelkező organizmusok minden sejtje ugyanazzal a génkészlettel rendelkezik, a zigotából kiinduló differenciálódás során a speciális sejtekben a génkészlet egy része aktiválódik, más része inaktív.)

Ezzel a feltevéssel összhangban van, hogy míg a struktúrgének (struktúrfehérjék) távoli fajok között is viszonylag kevéssé különböznek egymástól, főleg, ami az aktív centrumukat illeti, az ismétlődő szekvenciák még közeli rokon fajok esetében is nagyfokú eltérést mutatnak. (Az eltérés fokát hibridizációs kísérletekkel lehet kimutatni, a pontos bázissorrendet ezekben az esetekben sem ismerjük.) MIZUMO és mtsai szalamandra fajok ismétlődő szekvenciáit hasonlította össze, s kiderült, hogy két, azonos nembe tartozó (tehát igen közeli rokonságban levő) fajnál e szekvenciáknak csak 10%-a közös. E 10%-ba tartozó közös szekvencia megegyezett a nem többi fajánál is, míg a többiek jelentős eltérést mutattak. Ugyanakkor az ismétlődő szakaszok hosszúsága — a szekvenciát alkotó bázisok száma — konzervatív természetű [23]. Hasonló eredménnyel járt az ember és csimpánz ismétlődő szekvenciáinak összehasonlítása is [6]. Az eddigiekből nyilvánvaló, hogy míg a fajfejlődés során számos mutáció zajlik le az ismétlődő szekvenciákban, ezek egymás közt valamiképpen szinkronban vannak.

Az ismétlődő DNS másik típusa, a szatellita DNS az előbbitől eltérően nincs szétszórva a genom hosszában, hanem meghatározott helyeken, elsősorban a kromoszómák centromer régióiban lokalizálódik, azaz a heterokromatin állományában dúsul fel. A legutóbbi időkben kimutatták, hogy a főemlősökben — köztük az emberben is — a heterokromatinban a nagymértékben ismétlődő szekvenciák négy típusa található. Ennek a frakciónak a kariotípus fejlődése, és ezen keresztül a fajfejlődés szempontjából alapvető jelentősége van [28].

4. A kariotípus evolúciója

A genetikának talán ez a területe — a kromoszómák számának, alakjának, belső felépítésének változása, fejlődése — az, ahol a legtöbb, és egymással megegyező felfedezés született az utóbbi időben. Ez nagymértékben a különböző

festési eljárások kidolgozásának köszönhető, aminek alapján a különböző fajok homológ kromoszómái jól összehasonlíthatók egymással.

A kariotípus fejlődését az emlősök osztályának legkülönbözőbb rendjeiben vizsgálták. Így kengurufélékben [11], főemlősökben [30] ragadozókban [9] patásokban [1], rágcsálókban [21] és nyúlfélékben [34]. IMAI 723 emlősfaj kromoszómájának felhasználásával adott összehasonlító elemzést a centroméra lokalizációjának törvényszerűségeiről [12].

Először is megállapították, hogy egy nemen belül a fajok között az eukromatint tartalmazó kromoszómakarok hasonlóak. A hasonlóságot, illetve a rokonság fokát — úgy tűnik — legbiztosabban a festési eljárással kapott sávok (ún. G-sávok) megfelelése alapján lehet kimutatni. Ennek alapján megkonstruálható a leszármazási sor, s ennek relációjában más jegyek változási tendenciája.

Az eukromatikus régiókkal szemben a különböző, még rokon fajoknál is a heterokromatin mennyiségében eltérések vannak. Pontosabban kimutatható a heterokromatikus régió növekedése, ami újonnan keletkező kromoszómakarok megjelenéséhez vezet. A heterokromatin-növekedés az akrocentrikus, tehát egykarú kromoszómákon figyelhető meg. Így a heterokromatin hozzáadása következtében megváltozik a kromoszóma alakja. [Meg kell jegyezni, hogy a különböző alakú kromoszómák elnevezése még nem vált teljesen egységessé a szakirodalomban, bár ugyanazt a három alaptípust jelölik. Itt az *akrocentrikus* (az a típus, amelynek csak egy karja van, a centroméra a kromoszóma végén helyezkedik el), *szubmetacentrikus* (amelynek egy rövid karja és egy hosszú karja van), valamint *metacentrikus* (ahol a két kar hossza nagyjából azonos, a centroméra a középtájon helyezkedik el) elnevezéseket használjuk.] A heterokromatikus rövid karok megjelenése tehát akrocentrikus kromoszómából szubmetacentrikus kromoszóma megjelenését eredményezi. A vizsgálatok azt mutatják, hogy egy filogenetikai csoporton belül a legősibb típus rendelkezik a legtöbb akrocentrikus kromoszómával. A lemurok között például a legidősebb faj összes autoszómája akrocentrikusnak bizonyult [30]. GRAFODATSZKIJ megállapítja [9], hogy a menyétfélék kariotípusának evolúciója a kétkarú kromoszómák számbeli növekedésének irányába ment végbe. Ez a tendencia a többi vizsgált emlősrendben is megtalálható.

A kétkarú kromoszómák számának növekedését egy másik mechanizmus, az ún. Robertson-féle fúzió is előidézheti. Ennek során két akrocentrikus kromoszóma egyesül egy metacentrikussá. IMAI úgy véli, hogy az akrocentrikus kromoszómák fúziója nem közvetlenül következik be, az első lépésben szubmetacentrikus alakok keletkeznek heterokromatikus karok hozzáadódásával, majd ezek egyesülnek metacentrikussá, mégpedig a heterokromatikus karok hosszának — egy általa kiszámított — határértékénél szükségszerűen [12]. Úgy látszik, hogy ez a folyamat, az akrocentrikus és szubmetacentrikus kromoszómák elvesztése, illetve átalakulása irreverzibilis.

A kromoszómafúzió következménye természetszerűen a kromoszómák számának csökkenése. Ez a folyamat, az előbb említett tendenciákhoz hasonlóan, szintén kimutatható a vizsgált csoportokban.

A kariotípus evolúciója emlősöknél tehát két alapvető és egymással kapcsolatban levő tendenciával jellemezhető. Az egyik az akrocentrikus kromoszómák átalakulása szubmeta- és metacentrikussá, a másik a kromoszómaszám redukciója, mely folyamatok, strukturális átalakulások kiindulópontját, a heterokromatin mennyiségi növekedése adja. Lényeges mozzanat, hogy a kromoszómáknak csak egy része kerül be az evolúciós változások folyamatába, más

részük, (elsősorban a metacentrikusok) konzervatív természetűek, legalábbis egy családon belül azonosak maradnak minden fajnál.

Ez az evolúciós trend egyben azt is jelzi, hogy egy csoport változékonysága, továbbfejlődési képessége a kezdeti nagyobb lehetőségekhez képest a fejlődés előrehaladtával csökken.

A variabilitás képességének foka részben a heterokromatin (illetve a benne levő nagymértékben ismétlődő szekvenciák) mennyiségének függvénye. Azok a fajok, amelyeket a szatellita-DNS gazdagsága jellemez, változékonyak, sok alfajra tagozódnak, tehát jól tudnak alkalmazkodni változó feltételekhez, míg azok, amelyeknél a szatellita-DNS kis mennyiségben található, túlspecializáltak, kevés alfajuk van, s nagyon korlátolt élőhelyhez kötődnek [28]. A heterokromatin növekedésének a periódusa tehát nagy variációs lehetőségeket teremt. Ugyanakkor megfigyelték, hogy a régebben keletkezett (fuzionált) metacentrikus kromoszómák kevesebb heterokromatint tartalmaznak, mint az újabbak, ami azt jelenti, hogy a fúzió után megindul a heterokromatin csökkenése (valószínűleg eukromatinná alakul át differenciálódás során) [30].

Más vizsgálatok azt mutatták ki, hogy egy hörcsögfaj heterokromatinja alig tartalmazott ismétlődő DNS-t. Ez szintén egy ősi faj, ahol feltételezhetően a korábban szintén meglevő ismétlődő szekvenciák addig a pontig divergáltak, ahol már az eredeti ismétlődés nem ismerhető fel [21].

Ugyancsak a variábilitás csökkenését jelenti a kromoszómák számának csökkenése, mivel a kromoszómaszám meghatározza a kromoszóma mutációk (rekombináció, átrendeződés) mértékét. Minél kisebb a kromoszómaszám, annál nagyobb a kapcsolódási csoport, tehát alacsonyabb a rekombináció és átrendeződés foka, a genetikai variabilitás korlátozódik [7]. Érdekes adalék, hogy a tüskés bőrűek egész törzsében csak 44 és 42 kromoszómát találtak. A kromoszóma-számnak ez a minimális variációja a törzs evolúciós kimerültségét mutatja, ami érthető, hiszen ez a törzs a legősibb állattörzsek közé tartozik, amelynek kifejlődése a kambriumban (570 millió évvel ezelőtt) ment végbe [3].

A kariotípus evolúciójának fent vázolt trendje úgy látszik csak az emlősök osztályára érvényes. (Bár más csoportoknál még igen kevés vizsgálatot folytattak, s az adatok nem is teljesen megbízhatóak, mivel az emlőskromoszómák összehasonlításánál alapul szolgáló sávok kimutatása pl. a halaknál még nem tökéletes.) Hangyaféléknél végzett mérések azt mutatják, hogy itt nincs olyan szoros összefüggés a kromoszómaszám és a morfológiai evolúció között, mint az emlősöknél, primitív alcsaládokban egyaránt találhatók alacsony és magas kromoszómaszámú fajok [13]. A szerző szerint ez a heterokromatikus régió növekedésének sebességével függ össze. Ahol ez a mechanizmus lassan dolgozik, a fúzió aránya magas, gyors heterokromatikus növekedése esetén viszont kromoszómák szétválása várható.

Mindenesetre le lehet vonni azt a következtetést, hogy az evolúció konkrét mechanizmusai, törvényszerűségei a fejlődés különböző fokán álló csoportok esetében, vagy a fejlődés különböző ágain, nem szükségképpen azonosak.

Következtetések

A genetikai anyagnak az eddigiekben ismertetett változási tendenciái olyan tendenciák meglétére utalnak, amelyek korrelálnak a morfológiai evolúcióval, s egyáltalán e szint változásait fejlődésként írják le. Röviden azt lehet mondani, hogy ezt a fejlődési folyamatot a változás két alaptípusával, két,

egymást követő — és egymást feltételező — etapjával jellemezhetjük. Valamely mennyiségi felhalmozódás, a meglevő struktúrához hozzáépülő differenciálatlan anyag képezi az első mozzanatot, majd ezt követi a differenciálódás, strukturális átrendeződés.

Természetesen a felsorolt mutáció-típusok nem merítik ki az összes lehetséges, vagy ismert mutációt, amelyek között vannak olyanok, amelyek ténylegesen közömbösek a fejlődéssel szemben, vagy amelyekről még pillanatnyilag nem tudunk ilyen természetű összefüggést kimutatni. A fejlődés szempontjából — úgy látszik — azok a mutációk, amelyek a DNS-lánc egy-egy bázisának kicserélődését eredményezik, kevésbé jelentősek. Valóban, azok a vizsgálatok, amelyek különböző fajok homológ struktúr-fehérjéinek összehasonlítására irányultak, arra az eredményre vezettek, hogy ezekben minimális eltérések találhatók, de legalábbis nem indokolják az adott fajok fenotípusának különbségeit. King és Wilson összehasonlította az ember és a csimpánz 44 homológ fehérjéjét. A többféle eljárással is elvégzett analízis szerint több mint 99%-os azonosság található [19]. Sokkal távolabbi fajok között sem tapasztalható lényegesen nagyobb differencia, s a meglevő aminosav különbségek esetén is, az adott fehérjék alapvető biokémiai tulajdonságaik és metabolikus szerepük alapvetően azonos marad [20].

A pontmutációkra, illetve az aminosav-pótlásokra vonatkozó eredmények azt a feltevést látszottak igazolni, hogy a molekuláris-szint és az organizmusszint változásai között nincs összefüggés, hogy a fejlődés a két síkon egymáshoz képest véletlenszerűen megy végbe. Ezt a következtetést vonják le a neutralisták, amint ezt korábban láttuk.

A struktúr-fehérjék hasonlóságának a ténye azonban megenged egy másféle interpretációt is, azt tudniillik, hogy a különbségek a rendszer egészének, s alapvetően működésbeli különbségeinek eredménye. A morfológiai (és viselkedésbeli) különbségek tehát nem a struktúrgének, hanem a reguláció különbségeire vezethetők vissza, nem a géntermékek struktúrájának, hanem ezek relatív mennyiségének és manifesztálódásának különbségeire.

Noha a génreguláció mechanizmusáról ma még viszonylag keveset tudunk, de valószínűnek látszik, hogy éppen azoknak a tényezőknek, amelyekről korábban szó esett, tehát például az ismétlődő szekvenciáknak, vagy a gének elhelyezkedésének, a kromoszómák morfológiájának lényeges szerepük van. Az ember és a csimpánz esetén ez utóbbinak van döntőbb szerepe az elkülönülés előidézésében. Az ember 46-os kromoszómaszáma a csimpánz 48-asával szemben két akrocentrikus kromoszóma fúziójának eredménye, a G-sávtechnika alkalmazásával kimutatható volt, hogy mely két kromoszóma fuzionált az embernél metacentrikussá, de ugyanezzel a módszerrel további eltérések is kimutathatók, legalább 10 nagy inverzió és transzlokáció bekövetkezése a két ág szétválása óta.

További mérések is azt igazolják, hogy a génátrendeződés rátája és a morfológiai evolúció rátája korrelál egymással.

A genetikai struktúra és az organizmus, mint egész evolúciója között van tehát összefüggés, ami azonban csak abban az esetben látható be, ha a genetikai struktúrát valóban struktúraként kezeljük, azaz olyan rendszerként, melynek alkotórészei nem esetlegesen vannak jelen. Ez a megállapítás elsősorban nem is a primer bázissorrendre vonatkozik, hanem a bázisok nagyobb egységeire, szegmentumaira, amelyek már nem viselkednek közömbösen egymással szemben, megengedve a sorrend, az összekapcsolódás tetszőleges variációját. Ez egyben

azt is jelenti, hogy ha a struktúra egészéből egy-egy vonatkozást kiragadunk (tulajdonképpen éppen azon az alapon, hogy a többihez esetlegesen kapcsolódik) pl. a struktúrgének bázissorendjét, vagy a kromoszómaszámot önmagában, semmiféle korrelációt nem fogunk találni. Éppen ebben rejlik a neutralisták rossz kérdésfeltevése.

Hogy a fejlődés nem elemek, hanem struktúrák fejlődése, egyben azt is jelenti, hogy az egyes állomásokat nem lehet matematikai sorba rendezni. Azaz nem lehet egy adott halmaz tagjait valamely szempont, mint előállítási szabály alapján egyetlen sorozat tagjaiként megkonstruálni. Az a tény például, hogy a kariotípus fejlődésének tendenciája a kromoszómaszám csökkenése, nem azt jelenti, hogy a csökkenés sorrendjében fel lehetne állítani egy leszármazási sort. Lehetséges, hogy — a sávok alapján megállapítható — közelebbi rokon fajok között nagyobb számbeli eltérések vannak, mint távolabbiak között. Ez azonban nem a kromoszómaszám esetlegességét, a fejlődéstől való függetlenségét jelenti, hanem azt, hogy a logikai sorozatokkal ellentétben a valóságos fejlődési folyamatok elágazóak. Minden állomás a továbbfejlődésnek, differenciálódásnak valamely lehetőségtartományát képviseli, amelyről tehát nemcsak egyetlen irányba lehet továbblépni. A struktúra, mint a változás bázisa, „alanya" lényegénél fogva nem engedi meg a végtelen variációjú, esetleges változást, de nem szűkíti le egyetlen lehetőség megvalósulására sem. Ami másképpen kifejezve azt jelenti, hogy a véletlen vagy eleve elrendeltség alternatívája hamis.

Továbbá az ismertetett genetikai fejlődéstendenciákból kiderül, hogy nem minden struktúra hordozza a lehetőségeknek ugyanazt a körét. Vannak szűkebb lehetőségekkel rendelkező (vagy a változást esetleg teljesen kizáró, pontosabban új, biológiailag funkcionálni képes rendszerré változást kizáró) struktúrák, és nagyobb lehetőségekkel rendelkezők. Ez összhangban van az evolúcióelméletnek azzal a megállapításával, hogy a túlspecializált fajok nem fejlődőképesek. Esetleg a túlspecializáltságnak, illetve specializálatlanságnak molekuláris alapjáról is lehetne beszélni, azaz a morfológiailag megjelenő túlspecializáltságnak genetikai értelme is van.

A fejlődés fokozatos és ugrásszerű jellegének szembeállítása, egymást kizáróként való feltételezése szintén hamis alternatívának látszik a molekuláris evolúció eredményei alapján. Inkább azt lehet mondani, hogy a biológiai evolúció ugrásszerű változások és fokozatos divergencia egységeként értelmezhető, ahogy például ugrásszerű változást eredményezhet a teljes genom megduplázódása, de egy más típusú mutáció egy-egy jelleg fokozatos megváltozását idézi elő.

Összegezve tehát, nem mondhatjuk azt, hogy a mutációk az evolúció szempontjából csupán közömbös alapanyagot szolgáltatnak, míg a fejlődés irányát meghatározó, „teremtő" szerepe a szelekciónak van.

A mutációk, a genetikai anyag változási tendenciái fejlődést jelentenek éppen a magasabb integráció, a komplexebb rendszer létrehozásában, aminek alapján az organizmus komplexebb kölcsönhatásba léphet a környezetével, míg a szelekció az így létrejött változatok között az adott strukturális szinten lehetséges optimális alakulatot részesíti előnyben, a konkrét feltételek relációjában optimális alakulatot.

A fejlődésnek és mozgatórugóinak ez az értelmezése, ami a szakkutatás eredményein alapul, néhány korábban nyitott, vagy nem megnyugtatóan lezárt kérdés megválaszolását lehetővé teszi, de egyben egy sor újabb kérdést, újabb problémát vet fel, amelyek megoldása a szakkutatás feladata.

Összefoglalás

Az élővilág fejlődését nem lehet az alkalmazkodottság fejlődéseként leírni. Az alkalmazkodottság szerinti sorba rendezés problémájának alapját az organizmus és környezete közötti kapcsolat értelmezésében lehet megtalálni. Az élő szervezetek számára nem a természet egésze a környezet, hanem annak csak olyan vonatkozásai, amelyekkel a szervezet, saját minősége által meghatározva, kapcsolatot tud teremteni. A fejlődés során ez a kapcsolat válik sokoldalúbbá, komplexebbé, azaz élő szervezet organizáltsága válik magasabb fokúvá. A szervezet komplexebbé válása nem elsősorban morfológiailag, hanem funkcionálisan értendő.

A fejlődésnek ez az értelmezése lehetővé teszi, hogy a molekuláris szinten végbemenő változásokat, mutációkat az organizmus-szintű fejlődéssel jobban összhangba hozzuk. A genetikai struktúra történeti változásában kimutathatók olyan tendenciák, amelyek alapját képezik a szervezetek komplexebbé válásának. A mutációk tehát nem pusztán alapanyagot szolgáltatnak egy másik — a fejlődés irányát meghatározó — mechanizmusnak, a szelekciónak, hanem a genetikai struktúra maga rendelkezik a bonyolultabbá válás, a fejlődés képességével.

IRODALOM

1. Bunch, T. D., Foote, W. C. and Spillet, J. J. (1976) Translocations of acrocentric chromosomes and their implications in the evolution of sheep. *Cytogenet. Cell. Genet.*, **17**, 122—136.
2. Cavalier-Smith, T. (1976) Long palindromes in eukaryotic DNA. *Nature*, **262**, 255—256.
3. Colombera, D., Venier, G. and Vitturi, R. (1977) Chromosome and DNA in the evolution of echinoderms, *Biol. Zentralblatt*, **96**, 43—49.
4. Darwin, Ch. (1955) *A fajok eredete.* Akadémiai Kiadó, Budapest.
5. Davidson, E. H., Galau, G. A., Angerer, R. C. and Britten, R. J. (1975) Comparative aspects of DNA organization in metazoa. *Chromosoma*, **51**, 253—259.
6. Deininger, P. L. and Schmid, C. W. (1976) Thermal stability of human and chimpanzee DNA heteroduplexes. *Science*, **194**, 846—848.
7. Eberle, P. (1975) Chromosome finds in primates and cytogenetical aspects in the evolution of man. *J. Human Evol.*, **4**, 435—439.
8. Gánti, T. (1975) *A kvarkoktól a galaktikus társadalmakig.* Kossuth Kiadó, Budapest.
9. Grafodatszkij, A. Sz., Volobujev, V. T., Tyernovszkij, D. V. and Radzsbli, Sz. I. (1976) G-okraszka hromoszom szemi vidov kunyih. *Zoologicseszkij Zsurnal*, **55**, 1704—1709.
10. Grant, V. (1977) Population structure in relation to macroevolution. *Biol. Zentralblatt*, **96**, 129—139.
11. Hatch, F. T., Bodner, A. J., Mazrimas, J. A. and Moore II D. H. (1976) Satellite DNA and cytogenetic evolution. DNA quantity, satellite DNA and karyotypic variations in kangaroo rats. *Chromosoma*, **58**, 155—168.
12. Imai, H. T. (1976) Further evidence and biological significance for non-random localization of the centromere on mammalian chromosomes. *J. Theor. Biol.*, **61**, 195—203.
13. Imai, H. T. (1977) Karyotypic evolution of australian ants. *Chromosoma*, **59**, 341—393.
14. Ishigami, M. and Nagano, K. (1975) The origin of the genetic code. *Origins of Life*, **6**, 551—560.
15. Jablokov, A. (1976) Nyekatorije aszpektü problemü szlucsajnosztyi biologicseszkoj evoljucii. *Voproszi Filoszofii*, **30**, 9. sz. 72—79.
16. Jacob, F. (1974) *A tojás és a tyúk. Az élők logikája.* Európa Könyvkiadó, Budapest.
17. Jorre, R. P. and Curnow, R. N. (1975) The evolution of the genetic code. *Biochimie*, **57**, 1147—1154.
18. Kimura, M. and Ohta, T. (1974) On some principles governing molecular evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **71**, 2848—2852.

19. KING, M. and WILSON, A. C. (1975) Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science*, **188**, 107—116.
20. MARKERT, C. L., SHAKLEE, J. B. and WHITT, G. (1975) Evolution of a gene. *Science*, **189**, 102—114.
21. MASCARELLO, J. T. and HSU, T. C. (1976) Chromosome evolution in woodrats. *Evolution*, **30**, 152—169.
22. MC LACHLAN, A. D. (1976) Evidence for gene duplication in collagen. *J. Mol. Biol.*, **107**, 159—174.
23. MIZUNO, S., ANDREWS, X. C. and MACGREGOR, M. C. (1976) Interspecific „common" repetitive DNA sequences in salamanders. *Chromosoma*, **58**, 1—31.
24. MURAKAMI, H., TAIRA, S. and MORI, H. (1977) Modes of DNA replication primed with the oligomer of palindromes. *J. Theor. Biol.*, **68**, 183—197.
25. OHNO, S. (1970) *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag, New York.
26. OLENOV, J. (1976) Molekularnaja biologija i tyeorija jesztyesztvennovo otbora. *Zsurn. Obscsej Biol.*, **37**, 7—17.
27. PRESBER, W., SCHROEDER, C. and KRUEGER, D. H. (1976) The evolution of mutation via DNA base composition and mutator genes: a proposition. *J. Theor. Biol.*, **59**, 353—360.
28. PROKOFJEVA-BELGOVSZKAJA, A. A. (1977) Geterohromatyicseszkije rajonü hromoszom: sztrojenyije i funkcii. *Zsurn. Obscsej Biol.*, **38**, 735—753.
29. RICHARDS, E. G. (1976) Komplementer mispairs. *Nature*, **263**, 369—370.
30. RUMPLER, Y. and DUTRILLAUX, B. (1976) Chromosomal evolution in malagasy lemurs. *Cytogenet. Cell. Genet.*, **17**, 268—281.
31. SAUNDERS, P. T. and HO, M. W. (1976) On the increase in complexity in evolution. *J. Theor. Biol.*, **63**, 375—384.
32. SPARROW, A. H. and NAUMANN, A. F. (1976) Evolution of genome size by DNA duoblings. *Science*, **192**, 524—529.
33. STANLEY, S. M. (1975) A theory of evolution above the species level. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 646—650.
34. STOCK, A. D. (1976) Chromosome banding pattern relationships of hares, rabbits and pikas. *Cytogenet. Cell. Genet.*, **17**, 78—88.
35. SZESZÁK, F. (1973) Génreguláció a magasabbrendű élőlényekben. *MTA Biol. Közl.*, **16**, 289—316.
36. SZMIRNOV, I. N. (1975) A materialista dialektika és az evolúció elmélete. *In:* FROLOV, I. T. (ed): *Filozófia és modern biológia*. Kossuth Könyvkiadó, Budapest.
37. WADE, M. J. (1977) An experimental study of group selection. *Evolution*, **31**, 134—153.
38. WYNNE-EDWARDS, V. C. (1962) *Animal dispersion in relation to social behavior*. Edinburgh.
39. ZIPKAS, D. and RILEY, M. (1975) Proposal concerning mechanism of evolution of the genome of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 1354—1358.
40. ZSUKOV-VEREZSNYIKOV, N. N., HOHLACSEV, A. V., VOLKOV, M. N., MAJSZKIJ, I. N., RIBAKOV, N. I., PODOPLELOV, I. I. and ANYISZKIN, E. D. (1976) O roli szlucsajnosztyi v biologicseszkij evoljucii. *Voproszi Filoszofii*, **30**, 65—71.

A CONTRIBUTION TO THE FURTHER DEVELOPMENT OF THE EVOLUTION THEORY

Maria Újhelyi

Institute of Marxism and Leninism, Semmelweis Medical University, Budapest, Hungary

The evolution of the living world cannot be characterized as the development of adaptation. Adaptation is at all levels an issue of the interrelationships of the living organism with its environment, *i. e.* with those elements of nature, with which the given organism can interact by virtue of its own quality. The interrelationships tend to become more and more complex during evolution, as the level of organisation becomes higher. Complexity is meant here in the functional rather than in the morphological sense.

This interpretation makes possible a closer approximation of molecule-level changes — mutations — to the aspects of organismic development. Tendencies accounting for increasing complexity in living organisms have been emerging from investigations into the history of alterations in genetic structure. It follows that mutations must not be interpreted just as a source of the mechanism which determines the trend of development, *i. e.* of selection, but as expressions of the genetic structure's own inherent capacity for development.

Biológia, **26**, 1978, 25—46

A BIOLÓGIAI SUGÁRSÉRÜLÉS MOLEKULÁRIS PROBLÉMÁI

TARJÁN IMRE

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézete, Budapest

Beérkezett: 1977. december 20.

Kulcsszavak: fág-nukleinsav, ultraibolya sugársérülés, radiomimetikus sérülés, dózishatás függvény, polikristályos bázis, hatáskeresztmetszet, dimerizáció, fotoreverzió, hidratáció

A sugársérülés számos kérdést vet föl a biológia minden szintjén, a molekulaszinten épp úgy, mint a sejtek, szervek, egyedek szintjén, vagy a populáció és végül is a bioszféra szintjén. Jelen tanulmány csupán a primer jelenségeket magukba foglaló molekuláris folyamatokkal foglalkozik, amelyekhez egyébként azok a témák is kapcsolódnak, amelyeken a szerző munkatársainak egy csoportjával, több mint 10 éve dolgozik. A tanulmány előbb áttekinti a kérdéskör jelenlegi helyzetét, majd röviden ismerteti az említett munkacsoport vizsgálatait.

A terület jelenlegi helyzetének jellemzése

1. Az érdeklődés iránya

A sugársérülés molekuláris szintű problémái közül az érdeklődés előterében a genetikus funkcióban primer szerepet játszó *nukleinsav* [*dezoxiribonukleinsav (DNS), ill. ribonukleinsav (RNS)*] károsodása és az ezzel összefüggő kérdéskör áll. Ennek több oka van. Ilyen pl. az, hogy egy sejtben egy génből csak egy vagy néhány példány fordul elő, míg más, ugyancsak fontos alkotórész, pl. egy enzim lényegesen nagyobb számban található a sejtben. Ebből következik, hogy egyfajta enzimmolekula teljes inaktiválása adott besugárzás hatására kis valószínűséggel következik be ahhoz képest, amivel egy génfunkció kiesése jár. Vegyük hozzá ehhez azt is, hogy ép gén esetében egy enzimfajta csaknem teljes elpusztulásakor is érintetlen az az információ, amely alapján új enzimmolekulák szintetizálódhatnak. A mindennapi életben viszonylag sok olyan fizikai és kémiai hatás ér bennünket, amely elsődlegesen inkább a nukleinsavakra és nem a fehérjékre hat. Érthető ezek után az is, hogy a sérülést előidéző fizikai ágensek közül az *ultraibolya (UV) fény* és az *ionizáló sugárzások*, a kémiai ágensek közül pedig főként az *alkilező szerek* és a különböző *policiklikus aromás rendszerek* hatásmechanizmusának vizsgálata tartozik a különösen időszerű kérdések közé. A jelen beszámoló középpontjában is a nukleinsavak sérülése áll.

Az ágensek primer hatásaitól a végső biológiai konzekvenciákig hosszú az út. A különböző ágensek által előidézett folyamatláncnak azonban csak az első láncszemei térnek el egymástól, de még itt is ismeretesek hasonló jelenségek. A láncszakadások pl. ionizáló sugárzások és kémiai ágensek hatására

egyaránt bekövetkezhetnek. A replikáció és a transzkripció szintjén pedig már a meglevő különbségek is elmosódnak a különböző ágensek okozta hatások között. Érthető tehát, hogy bármelyik ágens előidézheti a magasabb rendű biológiai konzekvenciák mindegyikét, pl. mutációt, malignus transzformációt, sejthalált, sejtöregedést stb. Ezek a körülmények indokolják egyébként a kémiai ágensekkel kapcsolatban használatos *radiomimetikumok* elnevezést is.

2. *Kutatási feladatok*

Az alapvető feladatok három csoportra oszthatók:

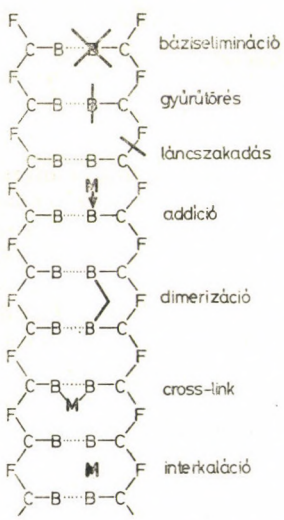
1. Az ágensek által létrehozott molekulaszerkezeti változások megismerése.

2. A reparációs folyamatok feltárása.

3. A különböző molekulasérülések és a biológiai hatások közötti korrelációk kimutatása.

A következőkben néhány megjegyzést fűzünk az említett feladatkörökhöz.

A biológiai hatás szempontjából mai ismereteink szerint lényeges tényező a *DNS térszerkezetének lokális torzulása* [5, 14]. Egy kémiai átalakulás is gyakran ezáltal érezteti hatását. — Az ismertebb sérülések főbb típusait [42] az *1. ábra* szemlélteti. A két DNS-láncban a cukor- és a foszfátcsoportokra, továbbá a bázisokra kezdőbetűik, a láncok közötti hidrogénhidakra pedig a pontsorok utalnak. Az elnevezéseken kívül az egyes sérüléstípusokat egyszerű szimbolika is jelzi. (Nem szerepel viszont az ábrán, hogy a sérülés következtében a hibás bázisnál, ill. annak környezetében fölszakadnak a hidrogénhidak.) — Adott ágens esetében többféle sérülés is előfordulhat, de mindig létezik egy uralkodó folyamat. Pl. 260 nmes UV fénnyel való besugárzáskor a pirimidin dimérek képződése dominál, nitrozometilureával való kezeléskor alkilezéssel kezdődő többlépcsős kémiai folyamat zajlik le. (Saját vizsgálatainkban ezek a sérülések játszanak szerepet, ezért kezdtük a felsorolást is ezekkel.) A γ-sugárzás esetén főként láncszakadás lép föl. — Addición nemcsak spontán lezajló kémiai folyamat értendő, hanem ide tartozik a fotoaddició is. — A bifunkcionális alkilező ágensek hatására kovalens kötés, un. cross-link alakul ki. Cross-link nemcsak a két polinukleotid lánc között jöhet létre, amit az ábra is szemléltet, hanem egy láncon belül két alkotórész között is kialakulhat. — A sugársérüléssel kapcsolatban — miként más esetekben is, — ismeretes a fotodinámiás jelenség, amely most azt jelenti, hogy a DNS-sel kölcsönhatásba lépő (beékelődött) festékmolekula fényt abszorbeálván gerjesztődik, és így jön létre cross-link.



1. ábra. Az ismertebb sérülések főbb típusai.

Fig. 1. Main types of the most common injuries.

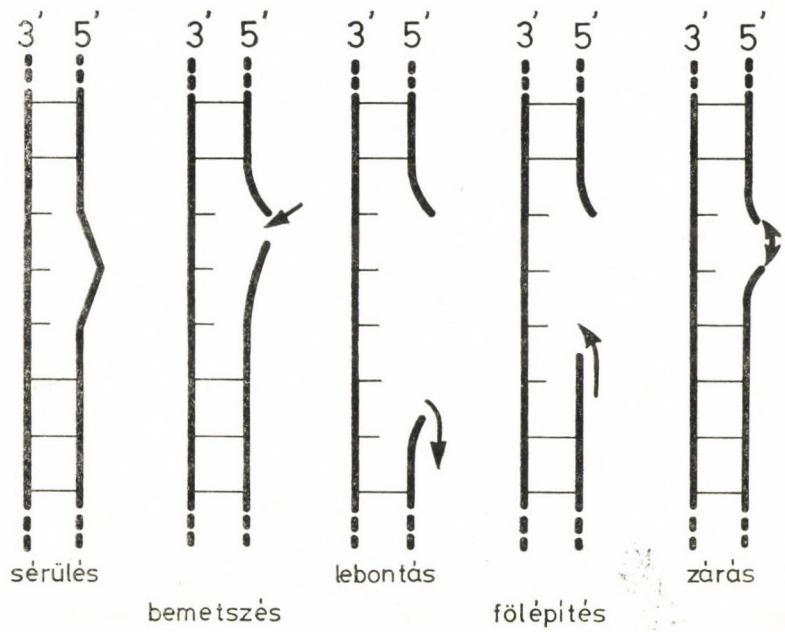
A sérülésekre vonatkozó ismeretek jelenleg még meglehetősen felszínesek. Keveset tudunk adott esetben a különböző sérülések relatív mennyiségéről

és a DNS-ben való eloszlásukról is, pl. arról, hogy halmozottan vagy elszórtan képződnek-e, milyen kölcsönhatásokban vesznek részt, léteznek-e a sérthetőség szempontjából kitüntetett helyek. Mindezekből következik, hogy ma még keveset tudunk mondani a DNS strukturális változásai és a biológiai hatások közti kapcsolatról, amit a kutatási feladatok harmadik csoportjaként jelöltünk meg.

Meglehetősen hiányosak ismereteink a másodikként megjelölt problémakörrel, a *sérülések reparálásával* kapcsolatban is. Jelenleg a fejlődés az adatgyűjtés stádiumában van ezen a területen. Mindenesetre lényeges körülmény az, hogy az eddig felismert reparációs lehetőségek sok szempontból hasonló vonást mutatnak a prokarióta és az eukarióta sejtekben [23].

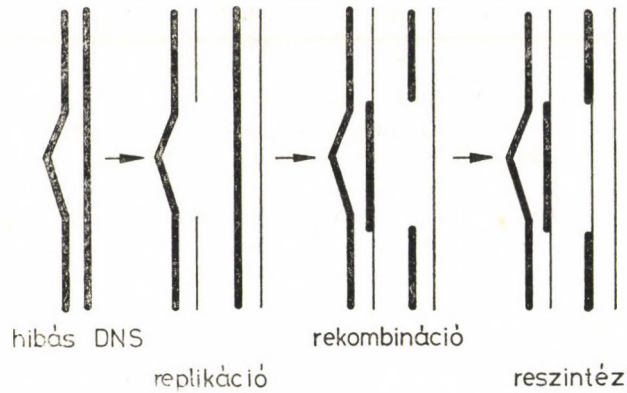
A legegyszerűbb ismert reparáció az *enzimatikus fotoreaktiváció*, amely esetében egy enzim és a látható fény együttes hatásáról van szó. Ez a folyamat kevéssé általános: eddigi ismereteink szerint csak a ciklobután típusú pirimidin diméreknek monomerekké való hasításával kapcsolatos.

Jelentős reparációs folyamat a *kivágásos- vagy excíziós reparáció*, amelynek főb fázisait a *2. ábra* szemlélteti. A leglényegesebb mozzanat a baloldali ábra-



2. ábra. Az exciziós reparáció főbb fázisai.
Fig. 2. Main stages of excision reparation.

részleten látható, amely a hiba kivágására utal. Ezt a mozzanatot ugyancsak sztochasztikus folyamatként további enzimatikus folyamatok, éspedig kimetszések és visszaépülések követik, míg végül egy megfelelő enzim közreműködésével a lánc zárul. Az excíziós reparáció eddig szinte minden vizsgált sejtben megfigyelhető volt, és azt is tudjuk, hogy többféle sérülés kijavítására nyújt lehetőséget. Nyilván szerepet játszik a háttérsugárzás és más környezeti hatások által okozott, vagy a termikus eredetű hibák kijavításában is. Azáltal,



3. ábra. A posztreplikációs rekombinációs reparáció lényeges fázisai.
Fig. 3. Main stages of post-replication recombinative reparation.

hogy az excíziós reparáció mintegy végigkíséri a sejt életét, őrzi a DNS-struktúra korrektségét és ezzel a genetikus információt.

Ugyancsak általános reparációs folyamat a *replikáció utáni rekombinációs reparáció* [21]. A *3. ábrán* az eredeti láncrészleteket a vastagabb, a replikáció során kialakult láncrészleteket a vékonyabb vonaldarabok jelölik. A reparáció sebességét valószínűleg a rekombináció szabja meg, ami feltehetően kisebb valószínűséggel zajlik le, mint a folyamat bármelyik más lépése. E viszonylag kis valószínűségű részfolyamat azt is posztulálja, hogy a rekombinációs reparáció kevésbé jelentős az excíziós reparációnál, jóllehet ez is megfigyelhető különböző típusú sérülések esetében. A konkrét kvantitatív összehasonlításra azonban az eddigi adatok alapján nincs lehetőség. Vegyük észre, hogy a folyamat kapcsán a hibás DNS megmarad, és csupán az történik, hogy kialakul egy ép DNS-molekula is. A folyamat többszöri megismétlődése során tehát a hibás DNS-ek száma változatlan marad, de relatív számuk egyre csökken, vagyis a hiba felhígul.

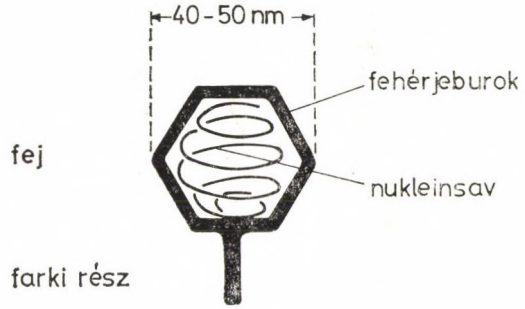
Vizsgálataink tárgya, célja és módszereink

A sugársérülés molekuláris szintű megközelítése is még sokféle lehet. Kutatási elképzeléseink kijelölésénél, a konkrét feladatok meghatározásánál több körülmény, ill. szempont játszott szerepet. Talán érdemes vázolni ezeket, hiszen ma is időszerűek és egyúttal egyfajta szemléletet, gondolkodási módot is tükröznek.

1. Az eredeti kutatási irány

Vizsgálataink tárgyaként a baktériumok vírusait, a *bakteriofágokat*, ill. a *fág – baktérium-komplexeket* választottuk [30]. Ugyanis:

a fágok mai ismereteink szerint a legegyszerűbb biológiai rendszerek, amelyek felépítése és funkciói viszonylag jól ismeretesek, felépítésük és funkcióik közötti kapcsolatok is eléggé áttekinthetők (a *4. ábrán* egy T7 fág vázlatos felépítése látható);



4. ábra. A T7 fág vázlatos felépítése.
Fig. 4. Scheme of the structure of phage T7.

ugyanakkor a fágok sugárhatás szempontjából a sejtek modelljeiként tekinthetők;

a kísérleti feltételek velük kapcsolatban egzakt módon biztosíthatók;

a vizsgált populáció egyedeinek nagy száma tág teret biztosít a statisztikai kiértékelések számára;

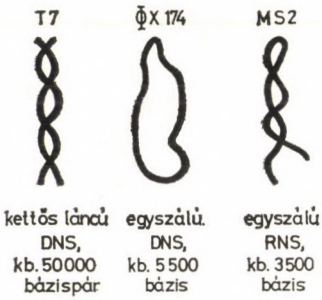
az *in vivo* és *in vitro* körülmények között nyert eredmények jól egybevethetők;

a problémák több oldalról való megközelíthetősége érdekes találkozási lehetőséget nyújt biológus, kémikus, fizikus és matematikus számára egyaránt.

Egy fágfejben *egyetlen* nukleinsav molekula, éspedig vagy DNS, vagy RNS található. Vizsgálataink *célja* az, hogy a fág-DNS-ben, ill. a fág-RNS-ben kiváltott primer aktusokból kiindulva kövessük a sugárhatás teljes folyamatláncát egészen a biológiai konzekvenciákig. Vizsgálatainkban azokat a sérüléseket vettük tekintetbe, amelyek következtében a fág elveszti szaporodóképességét. Épnek tehát azokat a fágokat tekintettük, amelyek egy gazdasejtre jutva annak feloldása révén szaporodni képesek. Egy egyszerű mikrobiológiai módszer felhasználásával, az ún. *tarfoltképzés* vizsgálatával éppen ezeknek a számát határoztuk meg.

Az *5. ábra* az általunk vizsgált fágokat, ill. fág-nukleinsavakat jelzi. A feltüntetett fágok *egy-egy fágcsoport jellegzetes képviselői* [12, 38, 40]. A köztük levő különbség nukleinsavaik felépítésében mutatkozik, aminek következményei természetesen a biológiai funkcióban is jelentkeznek. Elég arra utalni, hogy a DNS-fágok esetében a DNS sérülések első funkcionális konzekvenciái a *transzkripció* (vagy a replikáció) szintjén jelentkeznek, az RNS-fágok esetében viszont az RNS sérülése közvetlenül a transzláció szintjén manifesztálódik. A gazdabaktériumok az egyes fágok esetében a megfelelő coli-baktérium törzsek voltak.

Vizsgálatainkban ágensként 254 nm hullámhosszúságú UV fényt alkalmaztunk, kémiai inaktiváció céljára pedig monofunkcionális alkilező szereket, elsősorban nitrozometilureát (NMU) használtunk, amely főként a guanin-bázisokat támadja meg. Az UV fény preferálását a röntgen- és a radioaktív sugárzásokkal szemben több körülmény indokolja. Ilyen pl. az, hogy az elnyelt energia viszonylag pontosan mérhető, az elnyelés egyetlen aktusban következik be, és ami ugyancsak figyelemre méltó: a 254 nm-es fényt a fehérjeköpeny gyakorlatilag átengedi, ez a fény tehát közvetlenül jut el a nukleinsavakhoz.



5. ábra. Az általunk vizsgált fágok, ill. fág-nukleinsavak.
Fig. 5. The phages or phage nucleic acids studied.

2. Újabb kutatási irány

Nyilvánvaló, hogy biológiai szempontból a természetes környezetben levő nukleinsavak tulajdonságainak megismerése képezi az alapvető problémát. Fizikai és kémiai szempontból is érdekes azonban a nukleotida bázisok és származékaik mindenféle rendszerének megismerése. Ilyenek pl. az oldatban levő natív és denaturált DNS és RNS, vagy a bázisok oldatai, szintetikus polimerjei, kristályos fázisai. Biológiai szempontból e rendszerek jelentősége abban áll, hogy mint modellrendszerek ilyen vagy olyan vonatkozásban segítséget nyújtanak a természetes nukleinsavak tulajdonságainak megismerésében, és a különböző rendszerek összevetése az élet alapjainak megértését is segíti. Pl.: miért éppen a natív struktúra egzisztál, hogyan szolgálja éppen ez a szerkezet a genetikus anyag védelmét a sugárkárosodással szemben [3, 20].

Az említett rendszerekről egyelőre keveset tudunk, de feltétlenül érdekesek pl. a következő eredmények. — A kristályos fázisban UV fény hatására többféle dimer alakulhat ki, és ezek kisebb-nagyobb tű alakú tartományokat képeznek, amelyeket monomerek vesznek körül [6]. A különböző kristályos fázisok valószínűleg eutektikumot alkotnak. — Említésre méltó az is, hogy a fágfejben és az oldatban levő natív nukleinsavak (jóllehet eltérő konformációjúak), fotoproduktumaik minőségét és mennyiségét illetően hasonlóan viselkednek. — A denaturált DNS és a szintetikus polimerek oldatban UV fény hatására érzékenyebbek, mint a natív DNS [15].

Magunk is végeztünk vizsgálatokat *vákuumpárologtatással létrehozott polikristályos bázisokon*, közülük is az UV fényre különösen érzékeny pirimidineken. Ebben az esetben közvetlen célunk az, hogy egzakt és elméletileg is jól tárgyalható körülmények között keressünk választ pl. arra a kérdésre, hogy miként változik meg a bázisok közötti kölcsönhatás UV fény hatására.

3. Módszereink

Témáink, mint általában a molekuláris szintű szerkezetkutatások, a megfelelő biológiai eljárásokon kívül igénylik a fizika és a kémia teljes eszköztárát, módszerkészletét.

Az *1. táblázat*ban összefoglaltuk az általunk alkalmazott és továbbfejlesztett *biológiai, valamint kémiai eljárásokat*, a *2. táblázat*ban pedig a *fizikai*

1. táblázat
Biológiai és kémiai eljárások.

Table 1. The biological and chemical methods employed.

Nagy tisztaságú fágpreparátumok előállítása (5 mg/ml)
Nagy tisztaságú fág-DNS és fág-RNS előállítása (2 mg/ml)
Tarfoltképző aktivitás egzakt meghatározása (módosított eljárás)
Inaktivációs dózishatásgörbék felvétele
Konstans paraméterekkel rendelkező gazdasejt-kultúrák előállítása kemosztátban

(fizikai-kémiai) *eljárások* láthatók. Ez utóbbi táblázat egyébként tájékoztatást ad a biológiai sugársérülés tanulmányozásában általában használt fontosabb módszerekről. Az általunk alkalmazott, ill. hazai együttműködésben rendelkezésünkre álló eljárásokat *dőlt*, a külföldi (főként szovjet és német) együttműködésben alkalmazott módszereinket r i t k á b b szedés jelzi.

2. táblázat
Fizikai (fizikai-kémiai) módszerek.

Table 2. Physical (physical-chemical) procedures.

Optikai spektroszkópia: *ultraibolya*, *vákuumultraibolya*, *infravörös*, fluoreszcencia, cirk. dikroizmus, szórás (Raman (laser), *Rayleigh*)

Mágneses rezonancia spektroszkópia: mag-, para-

Diffrakciós módszerek: röntgen- (k i s s z ö g ű), elektron-, neutron-

M i k r o k a l o r i m e t r i a

Szeparációs módszerek: kromatográfia, *szedimentáció*

E l e k t r o n m i k r o s z k ó p i a

V i s z k o z i m e t r i a

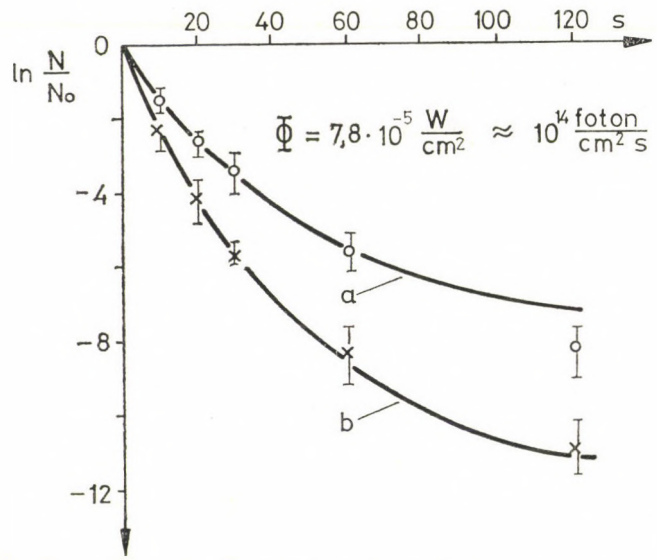
Elméleti módszerek: *sztochasztikus*, *kvantumkémiai*, termodinamikai

Eredményeink

Az ismertetésben teljességre nem törekszem, csak néhány talán általános jellegű megállapítást említek, amelyek egyúttal példák kívánnak lenni a kísérleti és elméleti munkák egymást serkentő kölcsönhatására.

1. Ultraibolya fény hatása T7 fágokra

Kb. 12 évvel ezelőtti eredményt idézünk a *6. ábrán*, amelyen a *T7 fág UV inaktivációs dózishatásgörbéje látható* [28, 29]. Inaktiváción — mint már említettem — a tarfoltképző aktivitás elvesztését értjük. A vízszintes tengelyen a 254 nm hullámhosszúságú UV besugárzás időtartama, a függőlegesen a túl-



6. ábra. A T7 fág UV inaktivációs dózishatásgörbéi.
Fig. 6. UV-inactivation dose-response curves for the phage T7.

élő fágok hányada $[N/N_0]$, pontosabban e hányados logaritmusa szerepel. Az ábrán a kísérleteinkben alkalmazott UV fluxust (Φ) is feltüntettük.

Az inaktivációs görbe menetét természetesen az abszorbeált fotonokon kívül, adott fizikai és kémiai feltételek között is, számos más tényező befolyásolhatja, pl. a spontán inaktiváció, a spontán reaktiváció, a multiplicitás-reaktiváció, az enzimatikus fotoreaktiváció, a gazdasejtek részéről mutatkozó sötétreparáció. Az adott esetben kontroll-vizsgálataink szerint mindezeket figyelmen kívül hagyhatjuk, kivéve a sötétreparációt. Ez is bénítható azonban, ha a gazdasejteket *koffeines* kezelésnek vetjük alá. Tapasztalataink szerint a koffein bénító hatása a koffein-koncentráció növelésével telítéshez közeledik. Az *a* görbét sötétreparáció jelenlétében, a *b* görbét pedig olyan esetben vettük föl, amikor a sötétreparáció is figyelmen kívül hagyható. A *b* görbe tehát még egyszerűbb körülményeket tükröz, mint az *a* görbe.

Előbb a *b* görbével foglalkozom. Csupán a görbe lefutásából már bizonyos következtetések vonhatók le a DNS-ben végbemenő folyamatokra vonatkozólag:

a) Minthogy a görbe kezdeti ($t = 0$) differenciálhányadosa nem zérus, a találatelméletből következik, hogy a vizsgált inaktiváció *egytalálatos esemény*, vagyis egy fág egyetlen sérülése a tarfoltképző képesség elvesztéséhez vezethet. (Többtalálatos eseményeknél a kezdeti differenciálhányados zérus.)

b) A dózis növelésével a görbe meredeksége csökken. Ez a tény arra utal, hogy az inaktiváción kívül reaktiváció is szerepet játszik, ami jelen esetben nem más, mint a *direkt fotoreverzió:* a 254 nm-es UV fény tehát nemcsak sérteni, de a hibát kijavítani is képes!

A *b* görbe egész terjedelmében leírható, ha az előzőkhöz hozzáfűzzük a következő plauzibilis *feltevéseket:*

a) Egy ép fág a tarfoltképzés szempontjából meghatározott számú sérthető helyet tartalmaz. Ezek a helyek csak kétféle állapotban létezhetnek, éspedig vagy épek vagy sérültek.

b) Az egyes helyek — legalábbis elég kis dózisoknál — egymástól függetlenül sérülnek, és a sérültek egymástól függetlenül revertálódnak. E feltételezés egyben azt is jelenti, hogy kis dózisoknál a sérülhető helyek sérülésének és a sérült helyek fotoreverziójának valószínűsége a besugárzás során nem változik.

c) A fotonok abszorpciója, a sérülés, a sérült helyek reparációja Poisson-folyamat szerint játszódik le.

Vizsgálatunk idején a sérülés természetéről keveset tudtunk, ma már elfogadott elképzelés az, hogy a T7 esetében a pirimidin bázisok dimerizációjáról van szó, és a reverzió során a dimerek visszaalakulnak monomerekké.

A fentiek alapján felírhatjuk a következő *összefüggést:*

$$ds_d = -\sigma_d s_d \Phi dt + \sigma_r (s_d^0 - s_d) \Phi dt. \tag{1}$$

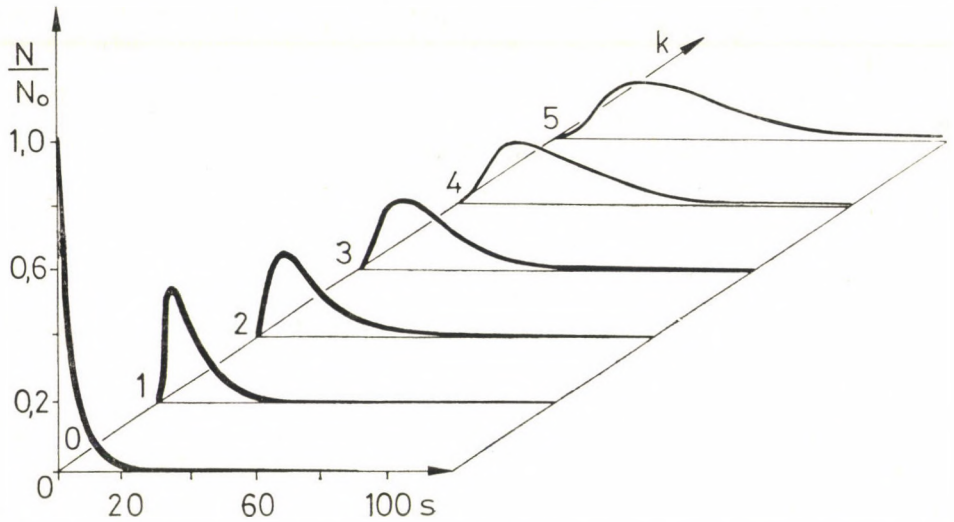
Az (1) megadja azt, hogy a Φ fotonfluxussal végzett UV besugárzás hatására mennyit változik meg az ép sérthető helyek száma egy fágban, amíg a besugárzás időtartama t-ről $(t + dt)$-re változik. Az s_d^0 egy fágban (egy fág DNS-ben) levő és a tarfoltképzés szempontjából szóba jövő sérthető helyek számát jelöli. Ennyi a $t = 0$ időpontban az ép helyek száma. Az s_d pedig azt jelöli, hogy mennyi az ép helyek száma egy fágban a t ideig tartó besugárzás végén. A σ_d egy sérthető hely sérülési (dimerizációs), a σ_r egy sérült hely reverziós hatáskeresztmetszetét jelöli. Közvetlenül belátható, hogy a jobb oldali első tag a sérülés, a második tag pedig a fotoreverzió következtében az ép helyek számában beálló változást fejezi ki.

Az (1) differenciálegyenlet megoldása révén megkapjuk azt az összefüggést, amely elképzelésünk szerint leírja, hogy miként csökken a besugárzási idő függvényében (adott fotonfluxus esetén) egy fágon belül az ép sérthető helyek száma. Az alábbi formula e helyek relatív számát adja meg, vagyis annak velószínűségét fejezi ki, hogy egy sérthető hely a t időpontban ép állapotban található:

$$\frac{s_d}{s_d^0} = \frac{\sigma_r + \sigma_d e^{-(\sigma_r + \sigma_d)\Phi t}}{\sigma_r + \sigma_d}. \tag{2}$$

A (2) fölhasználásával azt is fölírhatjuk, hogy bizonyos besugárzási idő elteltével mennyi a tarfoltképzés szempontjából 0, 1, 2, ..., k, ... találattal rendelkező fágok száma. A kapott összefüggéseket a 7. *ábra* szemlélteti. A görbék lefutása a várakozásnak megfelelő: a zérustalálatos görbe monoton csökken, a többi viszont maximummal rendelkezik. A maximum annál nagyobb dózisnál lép fel, és annál laposabb, minél nagyobb találati számról van szó. Kísérletileg közvetlenül csak a zérus találatos, vagyis az ép fágok száma ellenőrizhető, ezért jelen esetben csak ezt az összefüggést írjuk föl, ami egyébként egész egyszerűen adódik a (2)-ből:

$$\frac{N}{N_0} = \left(\frac{s_d}{s_d^0}\right)^{s_d^0}. \tag{3}$$



7. ábra. A különböző találatszámmal rendelkező fágok számának változása a besugárzási idő függvényében.

Fig. 7. Changes in the ratio of phages with various hits in the function of irradiation time.

Ezek után az a kérdés merül föl, hogy a (3) alkalmas-e a 6.*b* görbe leírására, és ha igen, akkor milyen paraméter-értékeknél illeszkedik a görbéhez. A görbe kezdeti ($t = 0$) differenciálhányadosából a Φ ismeretében meghatározható az $s_d^0\sigma_d$ szorzat, ami nem más, mint egy *egész* ép fág sérülési hatáskeresztmetszete. A második differenciálhányadosból pedig (az előbbi mennyiség ismeretében) meghatározható a σ_r, vagyis egy sérült hely reverziós hatáskeresztmetszete. A nyert adatok:

$$s_d^0\sigma_d \approx 2 \cdot 10^{-15}\text{cm}^2 \quad \text{és} \quad \sigma_r \approx 1{,}5 \div 10^{-16}\text{cm}^2 . \tag{4}$$

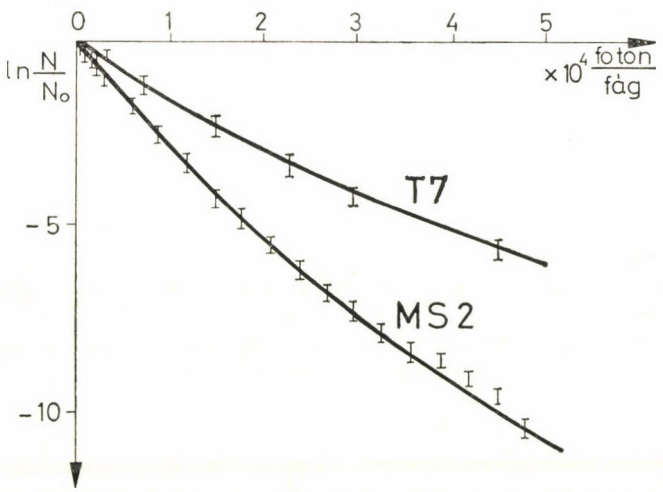
Összehasonlításul megemlítjük, hogy gömb alakúnak tekintett, 40 Å átmérőjű fág keresztmetszete $1{,}3 \cdot 10^{-13}$ cm^2, egy aromás gyűrű területe pedig 10^{-15}cm^2 nagyságrendű. A (3) a kísérleti görbével akkor egyezik jól, ha s_d^0 elég nagy, nagyobb kb. 50-nél. Pontosabb adatot az s_d^0-ra vonatkozólag pusztán az illesztés alapján nem tudunk mondani, ui. a formula az s_d^0 nagy értékeire kevéssé érzékeny. Az illesztés a kísérleti görbéhez $s_d^0 \sim 50$ esetében gyakorlatilag épp oly jó, mint $s_d^0 \to \infty$ esetében. Az ábrán a végtelen nagy s_d^0-hoz tartozó formula alapján rajzoltuk be a görbét, és a jó illeszkedés a kísérleti eredményekhez arra utal, hogy modellünknek komoly valóságtartalma van. Az s_d^0 nagy értéke jó összhangban van mai ismereteinkkel, amennyiben T7 fág esetén a pirimidin-dimerek képződésére a lehetőségek száma ezres nagyságrendű. Továbbra is nyitott kérdés azonban az, hogy a DNS mely helyein levő pirimidinpárok, ill. csoportok dimerizációja játszik szerepet a tarfoltképzés elmaradásában. Önmagában a σ_d-t csak ennek ismeretében tudnánk megadni. A felvetett kérdések és az említett adatok is akkor válnak érdekessé, ha más fágokat, ill. más nukleinsavrendszereket is megismerünk, és így összehasonlításokra nyílik lehetőség. Mindezekre később visszatérünk.

A *6. ábra a* görbéje abban különbözik a *b* görbétől, hogy az UV fotonok által kiváltott folyamatokra szuperponálódik a sötét reparáció. Az *a* és *b* görbék összevetéséből meghatározható az a valószínűség, amivel a gazdasejt a fág-DNS-ben egy sérült helyet reparálni képes. Ez a valószínűség meglepően nagy: kb. 0,35. Tehát kb. minden harmadik sérült hely reaktiválódik.

2. Ultraibolya fény hatása MS2 fágokra

A kísérleti eredmény a *8. ábrán* látható [16, 17, 32]. Összehasonlítás céljából feltüntettük a T7 dózishatásgörbéjét is. Minthogy különböző méretű fágok (ill. fág-nukleinsavak) összehasonlításáról van szó, célszerű a túlélésirátát a besugárzási idő helyett az *egy fág által elnyelt* fotonszám függvényében fölrajzolni. Az abszorpciós állandók (abszorpciós hatáskeresztmetszetek) ismeretében az ilyen ábrázolás elvégezhető, és ezt tettük a *8. ábra* esetében is. (Az MS2-vel kapcsolatban nincs sötétreparáció, ezért a T7 esetében is az ábrán a sötétreparáció nélküli folyamathoz tartozó görbe szerepel.) A görbék a két fág esetében hasonló jellegűek, eltérés csak annyiban mutatkozik közöttük, hogy az MS2-nél a kezdeti, enyhe görbület fokozatosan megszűnik, a görbe kiegyenesedik. Ábrázolásunkban a kiegyenesedés egyszerű exponenciális csökkenésre utal. Ez a körülmény azt mutatja, hogy az MS2 esetében nemcsak a T7-nél tapasztalt „reverzibilis" fotosérülés fordul elő, hanem „irreverzibilis" károsodás is létezik és fokozatosan ez válik dominánssá. A reverzibilis sérüléseket most is pirimidin diméreknek tulajdonítjuk, az irreverzibilisek pedig, tekintetbe véve, hogy az MS2 RNS-molekulájában timin helyett hidratációra hajlamos uracil-bázisok találhatók, hidratált uraciloknak tekinthetők. (A korábbi irodalom csak az utóbbiak létezésére utal.)

Az MS2 dózishatásgörbéjének értelmezése céljából a sérthető helyek háromféle típusát különböztetjük meg [36]. Az elsőbe azokat soroljuk, amelyek



8. ábra. A T7 és az MS2 fágok UV inaktivációs dózishatásgörbéinek összehasonlítása.
Fig. 8. Comparison of the UV dose-response curves for phages T7 and MS2.

csak irreverzibilisen, a másodikba azokat, amelyek csak reverzibilisen és a harmadikba, amelyek mindkét módon sérülhetnek. Az első típusú helyet reprezentálja pl. egy magányos uracil, a másodikat pl. egy citozin-pár, a harmadikat pl. egy uracil—citozin-pár.

Ezek után a dózishatásgörbe leírására valószínűségelméleti meggondolások alapján az MS2 esetében a következő formula adódik:

$$\frac{N}{N_0} = \left(\frac{s_h}{s_h^0}\right)^{s_h^0} \left(\frac{s_d}{s_d^0}\right)^{s_d^0} \left(\frac{s_{hd}}{s_{hd}^0}\right)^{s_{hd}^0}, \tag{5}$$

ahol s_h^0 a csak irreverzibilisen, s_d^0 a csak reverzibilisen és s_{hd}^0 az irreverzibilisen és reverzibilisen egyaránt sérülhető helyek számát jelöli egy fágra vonatkoztatva. Az s_h, s_d és s_{hd} pedig a t ideig tartó besugárzás végén még ép állapotban levő helyek számát jelzi. A h index nemcsak itt, de a továbbiakban is a hidratációs, a d index a dimerizációs sérülésre utal, a hd indexet pedig a kétféle módon sérülhető helyekkel kapcsolatban használjuk.

Közvetlenül belátható, hogy az (5) első tényezőjét az alábbi összefüggés szolgáltatja:

$$\frac{s_h}{s_h^0} = e^{-\sigma_h \Phi t}, \tag{6}$$

ahol σ_h (a jelölési rendszerünknek megfelelően) egy irreverzibilisen sérülhető hely inaktivációs hatáskeresztmetszetét jelenti. Az (5) második tényezője azonos a (2)-vel. Az (5) harmadik tényezőjének kiszámításához pedig a feltevéseinkből adódó alábbi differenciálegyenlet szolgál kiindulásul:

$$ds_{hd} = -\sigma_h s_{hd} \Phi dt - \sigma_d s_{hd} \Phi dt + \sigma_r \left(s_{hd}^0 - s_{hd} - \int^t s_{hd} \sigma_h \Phi dt\right) \Phi dt . \tag{7a}$$

A jobb oldal első tagja a hidratációt, a második a dimerizációt, a harmadik a reverziót veszi számításba. A (7a) megoldása után a következő kifejezést nyerjük:

$$\frac{s_{hd}}{s_{hd}^0} = e^{-\lambda_2 t} + \frac{\Phi(\sigma_h + \sigma_d) + \lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} \left(e^{\lambda_2 t} - e^{\lambda_1 t}\right), \tag{7b}$$

ahol λ_1 és λ_2 a

$$\lambda^2 + (\sigma_h + \sigma_d + \sigma_r) \Phi \lambda + \sigma_h \sigma_r \Phi^2 = 0 \tag{7c}$$

egyenlet gyökei.

Az újabb irodalom szerint az MS2 szerkezete teljes egészében ismeretes, és így megszámlálhatók azok a helyek, amelyek vagy csak hidratáció, vagy csak dimerizáció szempontjából, és azok is, amelyek mindkét vonatkozásban szóba jöhetnek. Föltételezve, hogy *valamennyi* ilyen hely sérülést jelent a tarfoltképzés tekintetében, a következő értékeket kapjuk:

$$s_h^0 \approx 140, \qquad s_d^0 \approx 240, \qquad s_{hd}^0 \approx 820. \tag{8}$$

Ezek birtokában az (5)-nek a kísérleti görbéhez való illesztése révén megbecsülhetők a hatáskeresztmetszetek. Ezek a *3. táblázat* 4. oszlopában találhatók [36].

3. táblázat

Hatáskeresztmetszetek.

[cm^2]

Table 3. Cross-sections.

Jelölés	T7		MS2		Nukleinsav	Polikristály (uracil)
	biol.	kém.	biol.	kém.		
1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
σ_h	—	—	$9 \cdot 10^{-20}$	$16 \cdot 10^{-20}$*	$5 \cdot 10^{-20}$*	—
σ_d	$8 \cdot 10^{-20}$	$12 \cdot 10^{-20}$**	$7 \cdot 10^{-20}$	$6{,}7 \cdot 10^{-20}$*	$12 \cdot 10^{-20}$**	$1{,}5 \cdot 10^{-17}$***
σ_r	$15 \cdot 10^{-17}$	—	$3 \cdot 10^{-17}$	—	—	$1{,}4 \cdot 10^{-17}$***

* Remsen, J. F. et al. (1971), R17 fág, $\lambda = 280$ nm
** Bräutigam, A. R. Sauerbier, W., (1973, 1974); Rosen, P. A. (1975)
*** Raksányi, K. et al. (1977)

Az 5. oszlopban feltüntettük azokat az adatokat is, amelyekhez másoknak az R17 RNS molekuláján végzett vizsgálatai alapján jutottunk. Ez utóbbi adatok a keletkezett dimerek számának kémiai módszerrel való meghatározására épülnek és egyetlen dimer képződésére vonatkoznak. Az a körülmény, hogy nagyságrendi egyezés áll fenn a saját és az idézett adatok között, összhangban van azzal a feltevésünkkel, hogy az MS2 esetében *valamennyi* hely, ahol dimer képződhet, sérthető helynek tekinthető a tarfoltképzés szempontjából. Kérdés, milyen következtetéshez jutunk, ha ezt a gondolatot átvisszük a T7 fágra is.

A T7 bázisszekvenciáját nem ismerjük teljesen, de föltételezzük, hogy a dimerizációs lehetőségek száma a teljes bázisszámhoz viszonyítva a T7 esetében is ugyanakkora, mint az MS2 esetében. Ilyen körülmények között a T7-nél az s_d^0-ra $2{,}4 \cdot 10^4$ érték adódik, aminek ismeretében a σ_d is meghatározható. Ezt az értéket tüntettük föl a *3. táblázat* 2. oszlopában. A 3. oszlopban mások méréséből kémiai úton nyert hatáskeresztmetszet látható. A két érték nemcsak egymáshoz áll közel, hanem azonos nagyságrendű az MS2-nél kapott értékkel. A közeli egyezés nem okoz meglepetést, hiszen nagy eltérés nem is várható egy dimer képződésének hatáskeresztmetszetében, ha a dimer egy DNS-ben vagy egy RNS-ben jön létre. A *3. táblázat* 6. oszlopában szereplő adatok ezt a megállapítást még megerősítik. A nagyságrendi egyezés nyilvánvaló, pedig itt nukleinsav-oldatokon nyert adatok szerepelnek. Figyeljünk föl arra is, hogy a nagyságrendi egyezés akkor következik be, ha a T7 és az MS2 fágoknál minden dimerképződési lehetőséget tekintetbe veszünk, és ezek aránya a bázisok teljes számához ugyanakkora a DNS-, mint az RNS-fág esetében. Ez azt sejteti, hogy minden dimerizáció, bárhol következik be, hatással van a tarfoltképzés elmaradására és nagyjából mindegy, hogy a sérülések első funkcionális konzekvenciái a transzkripció (replikáció) vagy a transzláció szintjén jelentkeznek.

Figyelemre méltó eredmény az is, hogy a két fág esetében a fotoreverzió hatáskeresztmetszete is nagyságrendben megegyezik. A T7-nél csak néhányszor nagyobb értékkel találkozunk, mint az MS2-nél, ami pl. magyarázható azzal, hogy egyszeres lánc esetében a dimer stabilisabb, mint kettős láncnál.

Egyébként a fotoreverzió hatáskeresztmetszete 2—3 nagyságrenddel nagyobb, mint a dimerizációé, ami valószínűleg azt jelenti, hogy az eredeti struktúra stabilisabb a sérültnél.

A hidratációval kapcsolatban csak annyit említek meg, hogy az ehhez tartozó hatáskeresztmetszet az MS2-nél a dimerizációs hatáskeresztmetszettel azonos nagyságrendű.

Ismételten hangsúlyozom, hogy következtetéseink nagyságrendi egyezésekre épülnek, tehát csak közelítő érvényűek. Olyan „finomabb" kérdésre sem kaphatunk választ, mint pl. az, hogy a T7 esetében a tarfoltképző aktivitás elvesztésében mindkét vagy csak az egyik láncban keletkező dimerek játszanak-e szerepet (számításunkban mindkét láncot tekintetbe vettük). Következtetéseink előretekintések kívánnak lenni, amelyek további kísérleti ellenőrzésre serkentenek.

Modelljeink realitása mellett szólnak egyébként a következő eredmények is:

a) W. Eckart és W. Eschke T1 fágokra kapott dózishatásgörbéi ugyancsak leírhatók közel akkora hatáskeresztmetszetekkel, mint amilyeneket a T7-re kaptunk. Ez az egyezés azért megnyugtató, mert a T1 és a T7 fágok kémiai struktúrája sok szempontból hasonló [31].

b) Az MS2 esetében modellünk alapján az általunk alkalmazott kis dózisoknál a reverzibilis és irreverzibilis sérülések száma közel egyenlő éspedig átlagosan 1—2 sérülés fágonként. A dózis növelésével az irreverzibilis sérülések száma gyorsan nő, a reverzibiliseké viszont konstans érték felé közeledik. Cerutti és mtsai [4] által R17 fágokon alkalmazott igen nagy dózisok esetében számításaink szerint kb. 85 irreverzibilis és 2—3 reverzibilis sérülés várható fágonként. Ezek az adatok jól egyeznek az említett szerzők kísérleti eredményeivel [18, 19].

Modelljeink természetesen elhanyagolásokat és hiányosságokat is tartalmaznak. Nem vettük pl. tekintetbe azt a tapasztalatot, hogy a T7 helikális struktúrájában elhelyezkedő pirimidin szekvenciákban egy sérülés kialakulása kedvez további sérülés keletkezésének. Ez azt jelenti, hogy a dózis növelésével a T7 esetében az újabb sérülések kialakulásának valószínűsége nő. Ehhez kapcsolódva indokolt azt is feltételezni, hogy a sérülések felszaporodásával egyre inkább „megnehezül" a fotoreverzió, vagyis a dózis növelésével csökken a reverzió valószínűsége. Mindkét effektus révén az elméleti dózishatásgörbe kissé a jelenlegi alá süllyedne. Számításaink szerint T7 esetében az eddig alkalmazott kis dózisoknál egy fágon belül átlagosan legfeljebb 10—12 sérült hely fordul elő, ami nem éri el a sérthető helyek 2%-át sem. Úgy véljük tehát, hogy az említett effektusok csak lényegesen nagyobb dózisoknál jelentkezhetnek jól észrevehető módon. — Valószínűnek tartjuk azt is, hogy a sötétreparáció valószínűsége a sérülések számának növelésével rohamosabban csökken, mint ahogyan ezt a modellben eddig tekintetbe vettük. — Nyitott kérdés marad továbbra is, hogy sérülést, ill. reverziót csak a sérthető tartományokban abszorbeált fotonok okozhatnak-e vagy hatásosak lehetnek-e nagyobb tartományokban elnyelt fotonok is, föltéve, hogy energiájuk valamilyen módon (pl. exciton formájában) a sérthető helyre vándorol [7].

Nyilván elhanyagolást tartalmaz az a feltevés is, hogy a sérthető helyek sérülési valószínűsége egyenlő. Ez a kérdés érinti azt az alapvető problémát, hogy *milyen kölcsönhatás van a nukleinsav és a fehérjeburok között.* Ekvivalensek-e tehát a burok közelében levő sérthető helyek a buroktól távolabb levők-

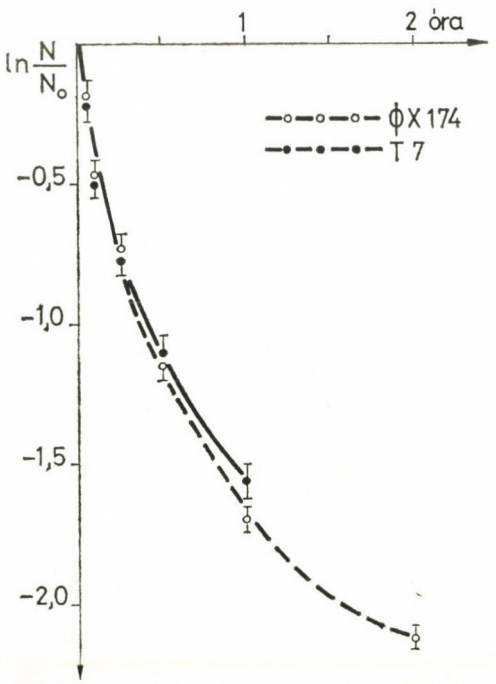
kel? Erről már is tudunk mondani valamit. T7-en végzett mikrokalorimetriás és abszorpciós vizsgálataink egybehangzóan azt mutatják, hogy míg az oldatban levő natív DNS esetében az 50—100 °C tartományban csak *egy* fázisátalakulás lép fel 87—87,5 °C-nál, addig a fágfejben levő DNS-hez *két* jól megfigyelhető fázisátalakulás tartozik, az egyik 85 °C-nál, a másik 89 °C-nál jelentkezik. UV fénnyel (254 nm) besugárzott fágok esetében az alacsonyabb hőmérséklet 85 °C-ról 83,5 °C-ra változik, míg a 89 °C-os hőmérséklet változatlan marad. Az UV fény tehát főleg a gyöngébb kötéseknél hat és fokozza a fehérjeburok által létesített föllazulást [22].

3. Nitrozometilurea hatása T7 és ΦX174 fágokra

A *9. ábra* a DNS tartalmú T7 és ΦX174 fágok inaktivációs dózishatásgörbéit mutatja abban az esetben, amikor az inaktivációt nitrozometilureát (NMU) tartalmazó M9 oldatban való inkubálás révén idéztük elő [34]. Az inaktiváció most is, miként az UV besugárzás esetén azt jelenti, hogy a sérült fág nem képes tarfoltképzésre. (A T7 fág esetében sötétreparáció is előfordul ezt azonban az idézett kísérleteinkben koffein segítségével kizártuk.)

Az inaktiválást sztochasztikus folyamatként tekintve sikerült a dózishatásgörbéket kvantítative értelmezni, éspedig a következő *feltevések* alapján [41]:

a) Egy fág-DNS-en belül *reakciókinetikai* szempontból meghatározott számú (*s*) sérthető hely található. Az elindult kémiai sérülés — amint erre má-



9. ábra. NMU-val való kezelés hatása T7 és ΦX174 esetében.
Fig. 9. Effect of NMU-treatment on phages T7 and ΦX174.

sok *in vitro* vizsgálatai utalnak — önmagától tovább mélyül: a sérülés alkilezéssel kezdődik, az alkilezést depurinezés, ezt pedig egyszeres láncszakadás követi stb [39]. Ennek megfelelően első-, másod-, végülis *r*-ed fokú sérülést különböztetünk meg.

b) Egy fág *biológiai* sérülése szempontjából csak a kémiailag sérült helyek jönnek szóba. A sérthető helyekről feltételezzük, hogy bár reakciókinetikailag azonosak, biológiai szempontból különbözhetnek egymástól, ami a láncon belüli elhelyezkedésükkel függ össze. A sérthető helyek tehát biológiailag *r*-féle csoportba oszthatók. Jelölje s_1 azoknak a helyeknek a számát, amelyek sérülése már az elsőfokú kémiai károsodás esetén biológiai inaktivációt hoz létre, s_2 azoknak a száma, amelyek sérülése csak másodfokú kémiai károsodás esetén vezet inaktivációhoz és így tovább. Végül s_r azoknak a helyeknek a száma, amelyeknél csak *r*-ed fokú sérülés jár inaktivációval. Közvetlenül belátható, hogy

$$s = s_1 + s_2 + \ldots + s_r .$$

c) Egy fág inaktivációjához nemcsak szükséges, de elegendő is egyetlen sérthető hely biológiai sérülése, vagyis egytalálatos eseményről van szó.

Számolásunkban az NMU spontán bomlását is tekintetbe vettük.

A feltevések alapján kapott összefüggésnek (aminek fölírását mellőzöm) a kísérleti eredményekkel való összevetéséből az alábbi *következtetések* vonhatók le:

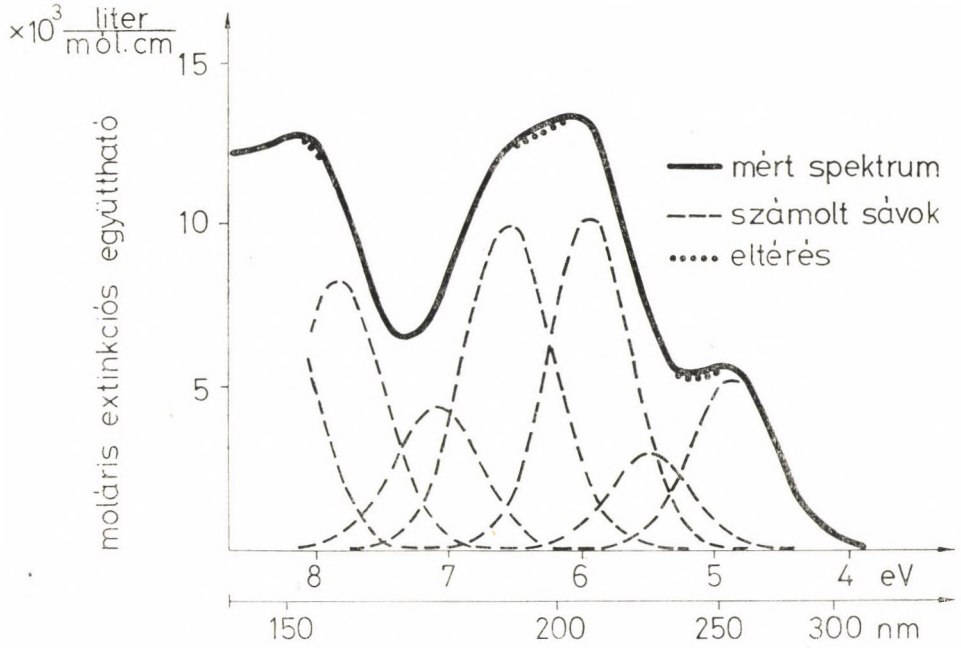
a) Igazoltnak látszik, hogy a sérthető helyek biológiailag valóban nem ekvivalensek, inaktivációnál többféle sérthető hellyel kell számolnunk. Léteznek tehát olyanok, amelyeknél már az alkilezés inaktivációhoz vezet, de vannak olyanok is, amelyeknél az alkilezés kevés, de a depurineződés már elegendő az aktivitás elvesztéséhez és modellünk szerint biztosan előfordulnak még „ellenállóbb" helyek is, amelyeknél legalább egyszeres láncszakadásnak kell bekövetkeznie, hogy létrejöjjön a biológiai sérülés.

b) Az elméleti és kísérleti eredmények összevetése néhány kvantitatív adat becslésére is lehetőséget nyújt. Úgy látszik, hogy pl. az alkilezés sebességi állandója a legnagyobb, és a sérthető helyeknek 10—30%-a olyan, amelynek az alkilezése is már inaktivációhoz vezet, a többi pedig főként olyan, hogy kétszeres láncszakadásnak kell bekövetkeznie a fág inaktivációjához.

c) Tekintetbe véve a gazdasejtreaktiváció jelenlétében felvett dózishatásgörbéket is, úgy látszik, hogy a reaktiváció valószínűsége (legalábbis igen kis dózisoknál) jelen esetben is kb. ugyanakkora, mint az UV fénnyel okozott sérülések esetében [35]. Ez a körülmény igazolni látszik azt a más oldalról kapott eredményt, amely szerint a gazdasejtben *egy* reparációs mechanizmus működik és ez javítja ki a hibákat függetlenül attól, hogy azokat UV fény okozta, vagy NMU idézte elő.

4. Ultraibolya fény hatása mikrokristályos bázisrétegekre

Végezetül a párologtatással előállított mikrokristályos bázisrétegeken nyert eredményeinkről szeretnék röviden szólni. Eddigi tapasztalataink főként a citozin és az uracil bázisokkal és ezek aza- valamint metilezett származékaival kapcsolatosak. Megismertük abszorpciós spektrumaikat az ultraibolya (UV)

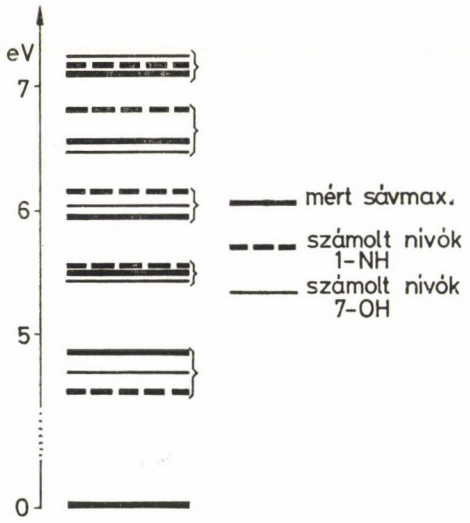


10. ábra. 5-aza-citozin abszorpciós színképének felbontása.
Fig. 10. Absorption spectrum of 5-aza-citosine.

és a vákuumultraibolya (VUV) tartományban (135 nm-től), és ezeket sikerült felbontani egyszerű sávokra [13, 24, 26]. Példaként az 5-aza-citozin abszorpciós színképét és annak felbontását mutatom be *(10. ábra)*.

A spektrumok jellemzőit kvantumkémiai módszerekkel értelmeztük is. Meghatároztuk az alap- és gerjesztett állapotok energiáit, hullámfüggvényeit, a dipólátmenetek oszcillátor-erősségeit, az átmeneti momentumok irányát [24, 25, 26]. Példaként az 5-aza-uracilt említem, és energianívó-rendszerét a *11. ábrán* mutatom be. — A számolásokat nemcsak a közönséges (vagyis oldatban is előforduló) 1-NH tautomerre vonatkozólag, hanem mind az ötféle lehetséges tautomerrel kapcsolatban elvégeztük. Csupán egyetlen kristályfizikai megállapítást említek. Az ábrán a kísérleti adatokon és az 1-NH tautomerre vonatkozó számolási eredményeken kívül csak a 7-OH tautomer nívói láthatók. A többi tautomer nívóit nem tüntettem fel, ezek ugyanis a kísérleti nívóktól nagymértékben különböznek. Ez pedig azt jelenti, hogy az utóbbiak előfordulása a párologtatott mikrokristályos rétegben nem lehet számottevő.

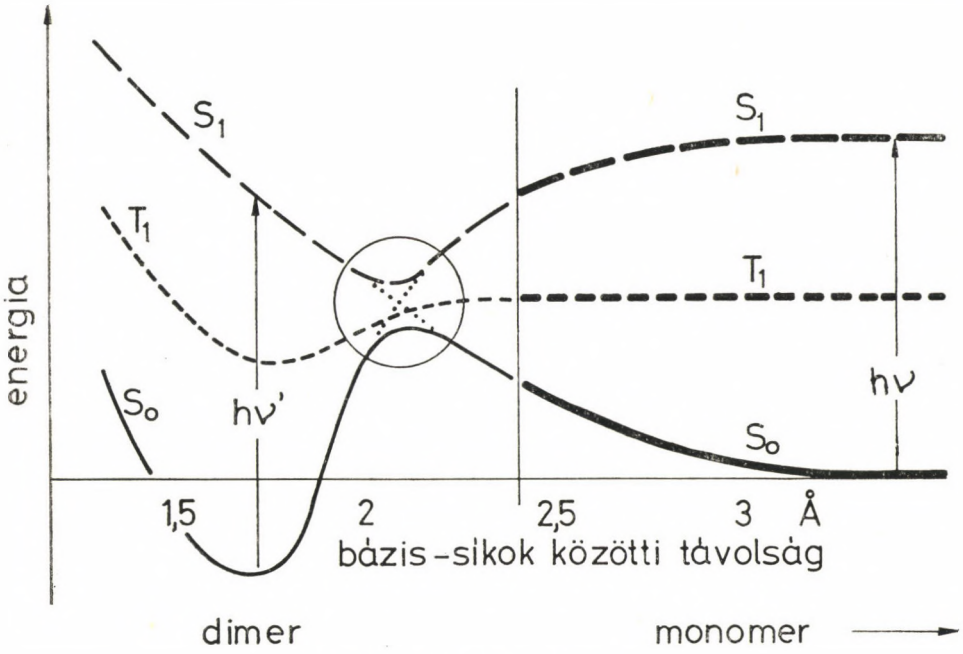
Vizsgálataink kiterjedtek a polikristályos uracil-rétegben UV-fény (254 nm) hatására végbemenő folyamatok, vagyis a dimerizáció tanulmányozására is [8, 9, 10]. Tapasztalataink szerint az uracil vékonyrétegek abszorpciós spektruma a besugárzás hatására jelentősen változik: a 260 nm körüli abszorpciós sáv fokozatosan csökken, míg 180 nm tájékán, ill. annál rövidebb hullámhosszaknál új abszorpciós maximumok jelentkeznek. A jelzett változást elsősorban a fotodimérek keletkezésével hozzuk kapcsolatba. Meghatároztuk a dimerizáció dózisfüggését, és abból a fotodimerizációs hatáskeresztmetszetet.



11. ábra. 5-aza-citozin energianívórendszere.
Fig. 11. Energy level system of 5-aza-citosine.

Elfogadva, hogy fágok inaktivációja esetében is ciklobután (cisz head to head) típusú dimerek képződnek, hasonlítsuk össze a különböző struktúráknál kapott hatáskeresztmetszeteket. Az adatok a *3. táblázat*ban találhatók. Mikrokristályos uracil rétegek esetében a dimerizációs hatáskeresztmetszet két nagyságrenddel nagyobb, mint amit a vizsgált fágok esetében kaptunk, és amit az előzőkben már említettem. Ez az eredmény meglepő, ha csak azt tekintjük, hogy a bázis-síkok közötti távolság a kristályban ugyanakkora, mint az RNS-ben. Vegyük azonban számba azt is, hogy fágokban nemcsak hidrogénhidak nehezítik, hanem a cukor—foszfát gerinc is akadályozza a dimerképződést, másrészt pedig, — és talán ez a lényegesebb tényező — a bázisok egymáshoz képest elfoglalt térbeli helyzete is kedvezőbb a dimerizációra az uracil kristályban, mint a natív nukleotid láncban. — Érdekes eredmény az is, hogy a fotoreverzió, vagyis a dimer—monomer átalakulás hatáskeresztmetszete a kristályos állapotban is ugyanakkora nagyságrendbe esik, mint a két fág esetében. Ez pedig arra utal, hogy a vizsgált esetekben egy dimernek monomerré való visszaalakulásakor a különböző környezeti hatások nagyjából ugyanolyan konzekvenciához vezetnek.

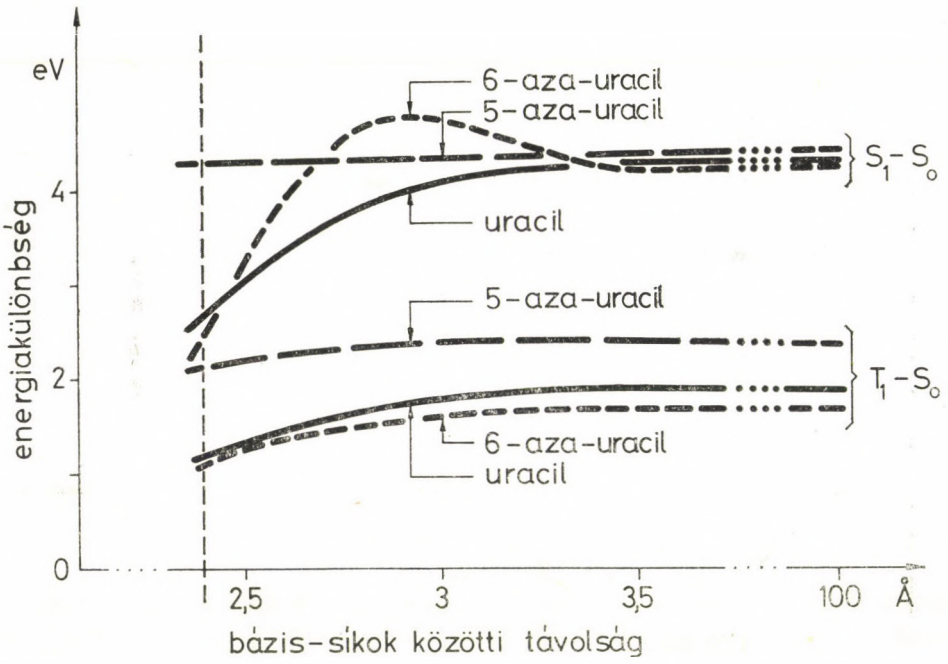
A dimerizációra vonatkozólag további információkkal is szolgálnak kvantumkémiai számításaink [10, 25]. Dimerizációkor az egymás fölötti bázis-síkok közötti távolság 3—4 Å-ről kb. felére csökken (és az eredetileg paralel síkok egymáshoz kb. 30° alatt hajlóvá válnak). Kiszámoltuk több bázis és azok származékai esetében, hogy miként függ a bázis-síkok közötti távolságtól (és a síkok által bezárt szögtől) az alapállapotok és az első gerjesztett állapotok energiája. A *12. ábra* az uracil energiadiagramját mutatja. Az S_0 a szinglett alapállapotot, az S_1 a szinglett gerjesztett állapotot jelöli, amely a T_1-gyel jelölt triplett gerjesztett állapotba mehet át. Az eddig alkalmazott π-elektron perturbációs módszer csak a 2 Å-nél nagyobb távolságok esetében ad megbízható energia-értékeket, — ezt jelzik a vastagabb folyamatos és szaggatott



12. ábra. Uracil energiadiagramja.
Fig. 12. Energy diagram for uracil.

vonalak, — de ezekből következtetni lehet a dimer állapot szempontjából érdekes, kisebb távolságoknál fennálló energiaviszonyokra is. Ez utóbbiakat vékonyabb vonalak jelölik. Az ábra magyarázatot ad arra, hogy alapállapotban a dimerizációt az energiahegy megakadályozza, kedvező viszont az ábra szerint a helyzet a dimerképződésre, ha a rendszer a *hν* foton révén gerjesztett állapotba kerül. Ilyen állapotból ugyanis viszonylag „könnyen" juthat a rendszer a dimer állapotnak megfelelő baloldali energiavölgybe, ehhez csak az szükséges, hogy a gerjesztett és az allapállapothoz tartozó görbék elég közel kerüljenek egymáshoz. A görbék konvergenciája a rövidebb távolságok felé haladva a közelkerülést nagyon valószínűvé teszi. Ebből a szempontból a legérdekesebb a körön belüli tartomány. Kár, hogy ezt még pontosan nem ismerjük. (Az ábrán *hν* a monomer—dimer, a *hν'* a dimer—monomer átalakulásban szerepet játszó fotonenergiákat jelzi.)

A *13. ábrán* az 5- és a 6-aza-uracil esetében kapott eredményeket is láthatjuk, de csak az alap- és a gerjesztett állapotok közötti energiakülönbségeket (S_1—S_0 és T_1—S_0) tüntettük fel. A szinglett gerjesztett állapotból a triplett gerjesztett állapotba való átmenet bázisokon belüli spin-pálya-kölcsönhatások révén, vagy megfelelő idegen atomokkal, ill. molekulákkal való kölcsönhatás következtében jöhet létre (szenzibilizált dimerizáció). Rendezett bázisstruktúrában, amilyen kristályos fázisban, vagy polinukleotid láncokban (sőt tömény oldatokban is) található, ezek a folyamatok jelentéktelenek, és a szinglett—szinglett átmenetek játszanak szerepet a dimerizációban, míg oldatokban viszont kedvező feltételeket teremthetünk a szinglett—triplett dimeri-



13. ábra. Különbségi energiadiagramok uracil és aza-származékai esetében.
Fig. 13. Comparative energy diagrams of uracil and its aza-derivatives.

záció kialakulására is. A rendezett struktúrákban végbemenő dimerizáció szempontjából tehát a felső görbecsalád a mértékadó, amikor a dimerizációs aktivitás a tapasztalattal egyezésben uracil esetében a legnagyobb, híg oldatok esetében viszont inkább az alsó görbéket kell szem előtt tartanunk, amelyek szerint a dimerizációs aktivitás, ugyancsak egyezésben a tapasztalattal, 6-aza-uracilnál a legkedvezőbb.

Befejezésül visszatérek a bevezetőben említett gondolathoz, amely a biológiai sugársérülés molekuláris szintű tanulmányozásának alapvető jelentőségét hangsúlyozta. Eredményeink említésével nem a kérdés fontosságát akartam alátámasztani, úgy vélem, hogy ez nem szorul a mi támogatásunkra, csupán „helykoordinátáinkat" kívántam jelezni e nagy területen.

IRODALOM

1. Bräutigam, A. R. and Sauerbier, W. (1973) Transcription unit mapping in bacteriophage T7. I. *In vivo* transcription by E. coli RNA.-polymerase. *J. Virology*, **12**, 882.
2. Bräutigam, A. R. and Sauerbier, W. (1974) Transcription unit mapping in bacteriophage T7. II. Proportionality of number of gene copies, mRNA and gene product. *J. Virology*, **13**, 1110.
3. Bugg, C. E. and Thomas, J. M. (1971) Stereochemistry of nucleic acids and their constituents. X. Solid-state base-stacking pattern in nucleic acid constituents and polynucleotides. *Biopolymers*, **10**, 175.
4. Cerutti, P. A., Miller, N., Pleiss, M. G., Remsen, J. F. and Ramsay, W. J. (1969) Photohydration of uridin in the RNA of coli-phage R17. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **64**, 731.
5. Cerutti, P. A. (1974) Excision repair of DNA base damage. *Life Sciences*, **15**, 1567.

6. COHEN, M. D., RON, I., SCHMIDT, G. M. J. and THOMAS, J. M. (1969) Photochemical decoration of dislocations inside crystals of acenaphthylene. *Nature*, **224**, 167.
7. DEE, A. and BAUR, M. E. (1974) Charge and excitation migration in DNA chains. *J. Chem. Phys.*, **60**, 541.
8. FIDY, J., FÖLDVÁRI, I. and RAKSÁNYI, K.: The UV photodamage of polycrystalline thin layers of uracil and methylated uracils. *Acta Physiol. Hung.*, in press.
9. FIDY, J., FÖLDVÁRI, I. and RAKSÁNYI, K.: The UV radiation chemistry of thymin and uracil thin layers. *Studia biophys.*, in press.
10. FIDY, J., KARCZAG, A. and RAKSÁNYI, K. (1976) Electronic structure of uracil and its UV photoproducts. *Acta Biochim. Biophys. Hung.*, **11**, 185.
11. FIDY, J., FÖLDVÁRI, I. and RAKSÁNYI, K.: Spectroscopic and kinetic study of the UV photochemistry of uracil thin crystal layers. *Biophysical Chemistry*, in press.
12. FIERS, W., CONTRERAS, R., DUERINCK, F., HAEGEMAN, G., ISERENTANT, O., MERREGAERT, J., MIN JOU, W., MOLEMANS, F., REAYMAEKERS, A., Van den BERGHE, A., VOLCKAERT, G. and YSEBAERT, M. (1976) Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature*, **260**, 500.
13. FÖLVÁRI I. (1976) *Újabb eredmények a széles tiltott sávú anyagok vákuumultraibolya spektroszkópiai vizsgálata alapján.* Kandidátusi értekezés. Budapest.
14. HAGEN, U. (1973) Strahlenwirkung auf Struktur und funktion der Desoxyribonukleinsäure. *Biophysik*, **9**, 279.
15. HOSSZU, J. L. and RAHN, R. O. (1967) Thymidine dimer formation in DNA between 25 °C and 100 °C. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **29**, 327.
16. KARCZAG, A. and RONTÓ, GY. (1971) The comparative analysis of UV effect on bacteriophages containing DNA and RNA. *Proc. I. Eur. Biophys. Congr.*, Baden near Vienna, **2**, 263.
17. KARCZAG, A., RONTÓ, GY. and TARJÁN, I. (1972) Study of the UV effect on MS2 phages. *Acta Biochim. Biophys. Hung.*, **7**, 173.
18. KARCZAG, A., RONTÓ, GY. and TARJÁN, I. (1973) Further data on the radiation injury of MS2 phages. *Acta Biochim. Biophys. Hung.*, **8**, 281.
19. KARZAG A. (1976) *A természetes m-RNS ultraibolya sugársérülésének vizsgálata MS2 fágokon.* Kandidátusi értekezés. Budapest.
20. LAMOLA, A. A. (1973) Photochemistry and structure in nucleic acids. *Pure and Applied Chemistry*, **34**, 281.
21. LEHMANN, A. R. (1974) Postreplication repair of DNA in mammalian cells. *Life Sciences*, **15**, 2005. (1974)
22. MONASELIDZE, D. R., CHANCHALASHVILI, Z. I., MGELADZE, G. N., MADJAGALADZE, G. V., FEKETE, A. and RONTÓ, GY.: (1978) Thermodynamical properties of phages T7. *Studia biophys.*, **70**, 213.
23. RADMAN, M. (1977) Mechanisms of DNA repair. 13*th* Ann. Meeting of ESRB, Liege.
24. RAKSÁNYI, K., FIDY, J., FÖLDVÁRI, I. and TARJÁN, I. (1976) Spectroscopic study of cytosine and its derivatives. *Acta Biochim. Biophys. Hung.*, **11**, 187.
25. RAKSÁNYI, K., CSÁSZÁR, P., FÖLDVÁRI, I. and FIDY, J.: Photodimerization of uracil and 6-azauracil. *Studia biophys.*, in press.
26. RAKSÁNYI, K., FIDY, J., FÖLDVÁRI, I. and KITTLER, L. (1978) The electronic structure of cytosine, 5-azacytosine and 6-azacytosine. Theory and experiment. *Biopolymers*, **17**, 887.
27. REMSEN, J. F., MATTERN, M., MILLER, N. and CERUTTI, P. A. (1971) Photohydration of uridine in the ribonucleic acid of coli-phage R17. Lethality of uridine photohydrates and nonlethality of cyclobutane-type photodimers. *Biochemistry*, **10**, 524.
28. RONTÓ, GY., SARKADI, K. and TARJÁN, I. (1967) Zur Analyse Der UV-dosiswirkungkurven der T7 Phagen. *Strahlenther.*, **134**, 151.
29. RONTÓ, GY. and TARJÁN, I. (1967) Zur reaktivierung der UV-strahlenschäden der coliphagen T7. *Strahlenther.*, **132**, 143.
30. RONTÓ, GY. and TARJÁN, I. (1967) A bakteriofágok mint a biofizikai vizsgálatok objektumai. *Fizikai Szemle*, **17**, 1.
31. RONTÓ GY. (1969) Ultraibolya sugárzás hatásmechanizmusa T7 fág-coli rendszeren. Kandidátusi értekezés. Budapest.
32. RONTÓ, GY., KARCZAG, A. and TARJÁN, I. (1972) Ein kinetisches Modell zur Strahlenschädigung von viraler und bakterieller DNS. *Studia biophys.*, **33**, 121.
33. RONTÓ, GY. and TARJÁN, I. (1972) Relationship between structure and function in the radiation injuries of T7 phages. *Acta Biochim. Biophys. Hung.*, **7**, 251.
34. RONTÓ, GY., SMOTRYAEVA, M., KRUGLYAKOVA, K., EMANUEL, N. and TARJÁN, I. (1975) Inactivation of bacteriophages T7 and ΦX174 by radiomimetics. *Acta Biochim. Biophys. Hung.*, **10**, 115.

35. RONTÓ, GY. (1977) Quantitative analysis of the effectiveness of dark repair in the system *E. coli*-phage T7. *Studia biophys.*, **61,** 111.
36. RONTÓ, GY., TARJÁN, I. and KARCZAG, A. (1977) A radiation kinetic model for the interpretation of UV inactivation of phages MS2. 13*th* Ann. Meeting of ESRB, Liege.
37. ROSEN, P. A. (1975) Ultraviolet carcinogenesis. *Int. Journ. of Quantum Chemistry*, **9,** 473.
38. SANGER, F., AIR, G. M., BARELL, B. G., BROW, N. L., COULSON, A. R., FIDDES, J. C., HUTCHINSON III, C. A., SLOCOMBE, P. M. and SMITH, M. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage ΦX174 DNA. *Nature*, **265,** 687.
39. SMOTRYAEVA, M. A., ZHIZHINA, G. P., KRUGLYAKOVA, K. E. and EMANUEL, N. M. (1976) Kinetics of structural conversion of DNA in reaction with NMU. *Studia biophys.*, **57,** 59.
40. STUDIER, F. W. (1972) Bacteriophage T7. *Science*, **176,** 367.
41. SUGÁR, I., RONTÓ, GY. and TARJÁN, I.: Inactivation of phages by radiomimetics — a stochastic process. *Acta Physiol. Hung.*, in press.
42. VARGHESE, A. J. (1975) Photochemical addition of amino acids and related compounds to nucleic acid constituents. *In:* K. C. SMITH (ed.): *Ageing, carcinogenesis and radiation biology*. New York, Plenum Press.

MOLECULAR PROBLEMS OF BIOLOGICAL RADIATION INJURIES

I. Tarján

Institute of Biophysics, Semmelweis Medical University, Budapest, Hungary

The first part of the paper gives a short survey on the present situation of an important field of biophysics i. e. of the study on the molecular level of biological radiation damage and chemical mutagenes (radiomimetics) caused injuries. The prominent problem is the investigation of the structural changes in the genetic material of cells, the *nucleic acid molecules* and that of repair processes. The improvement of the exactness of studies and a quantitative description is required in both respects.

Further on the author summarizes the studies carried out with his coworkers in the last years, where they studied the molecular processes of radiation damage in cellular model systems, mainly in *bacteriophages* and *polycrystalline nucleotide bases*. In their studies biological, experimental and theoretical physical and physico-chemical methods supplement each other.

The paper present some concrete results on the inactivation of phages T7 and MS2 caused by *UV light* (254 nm) and that of phages T7 and ΦX174 caused by treatment with *nitrosomethylurea (NMU)*. It describes their theoretical model constructed for the interpretation of experimental results as well. For the characterization of UV injuries and photoreversion the *cross-sections* related to one injurable and injured site were used, determined from the comparison of theory and experiences. They stated that both dimerization and reversion cross-sections are of the same order of magnitude in phages MS2 and T7: the first one 10^{-20} cm² and the second one 10^{-17} cm². Thus the fact that the phage MS2 contains RNA, the T7 double-stranded DNA does not cause a great difference in either injurable properties or photoreversion-— In the phages MS2 hydration and dimerization cross-sections have the same order of magnitude. It should be noted, that all these values in the case of the mentioned phages agree is their order of magnitude with the data obtained by chemical methods and with the value. found in nucleic acid solutions.

The analysis of NMU-caused injuries indicates that the injurable sites considered identical reaction-kinetically are not necessarily equivalent biologically. At 10—30% of the injurable sites already alkylation leads to inactivation, but at the others only depurination, or strand-break causes inactivation. An interesting result is too, that dark repair occurs with about the same probability in the case of NMU or UV light produced injuries. This fact gives a new proof for the opinion that the same repair mechanism is functioning in the host cells either UV light or NMU-caused defects are present.

Their studies were extended to *polycrystalline uracil layers* as well. In these UV light causes only dimerization and reversion which can also be characterized by cross-sections. In uracil thin layers they found a dimerization cross-section higher by three orders of magnitude than in phages, which could be interpreted by the difference of the geometrical structure of the crystal and that of the nucleic acid. The order of magnitude of the photoreversion cross-section — as it is expectable — is in this case too the same as at phages. They stated that among crystalline uracil and its aza-derivatives uracil is the most suitable for photodimerization. This experimental fact was explained by their quantum-chemical calculations.

Biológia, **26**, 1978, 47—77

HEMODINAMIKAI TÉNYEZŐK SZEREPE AZ ARTÉRIÁS VÉRKERINGÉS SZABÁLYOZÁSI FOLYAMATAIBAN

MONOS EMIL

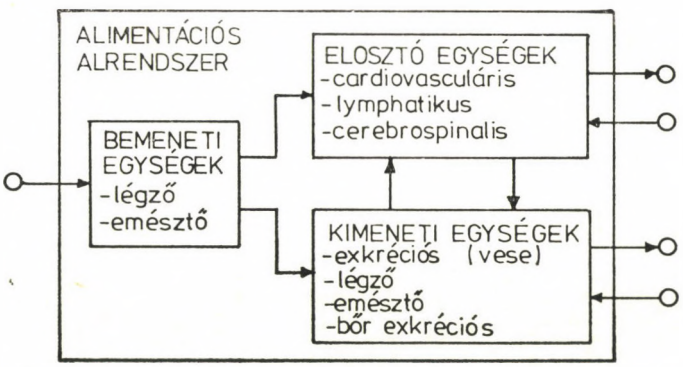
Semmelweis Orvostudományi Egyetem Kísérleti Kutató Intézete, Budapest

Beérkezett: 1978. március 14.

Kulcsszavak: arterioszklerózis, érfalrugalmasság, hemodinamika, vazopresszin, vérkeringés-szabályozás

Bevezetés

A vérkeringési rendszer központi szerepet játszik a szervezet energetikai és információs folyamataiban. Fő feladata a külső környezetből felvett és a szervezetben képződött anyagok, valamint a hő folyamatos célszerű elosztása *(1. ábra)*, igazodva a szervezet széles határok között változó igényeihez. A szervezetben keletkezett mobilanyagok egy része kémiai hírvivő molekula, hormon. E molekulák transzportja révén a keringési rendszer, mint információs-kommunikációs rendszer is fontos szerepet tölt be. Az elosztó funkció összetettségéről vaszkuláris szinten hozzávetőleges képet alkothatunk, ha figyelembe vesszük az érrendszer néhány geometriai jellemzőjét. Felnőtt ember esetében a 4 cm^2-nyi keresztmetszetű aorta sorozatos, általában dichotomiás elágazások révén összesen kb. negyvenezer-millió db, 30 —35 μ^2 keresztmetszetű, 750 μ hosszú szemipermeábilis falú kapillárisra bomlik fel, s e csövecskék



1. ábra. Az élő organizmus energetikáját biztosító alimentációs alrendszer tömbvázlata. Magában foglalja mindazokat a szerveket, szervrendszereket, amelyek a külvilágból bejutó és a szervezetben keletkező anyagok felvételét, előkészítését, elosztását és eliminációját végzik.

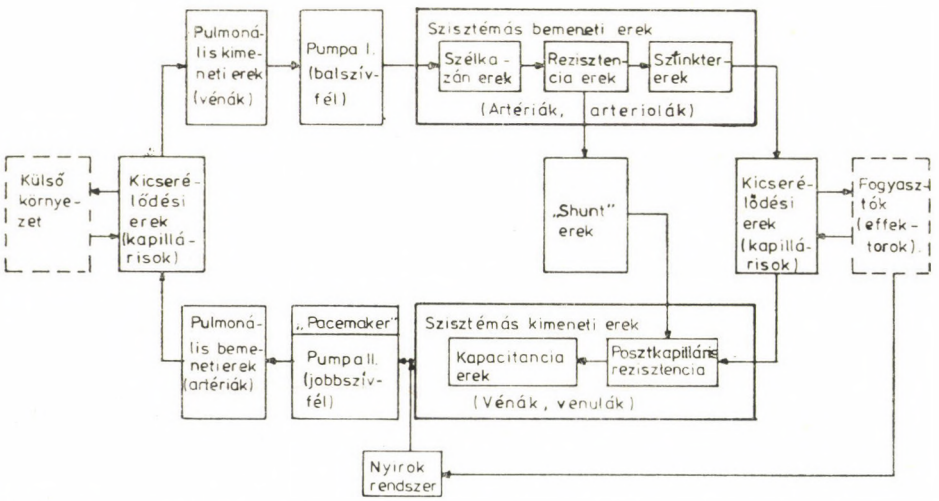
Fig. 1. Scheme of the alimentary subsystem accounting for energetics of the living organism. This subsystem comprises all organs and organ systems responsible for uptake, metabolization, distribution and elimination of exogenous and endogenous materials.

A hazai élettani szakirodalomban kevésbé használatos fogalmak definícióit *Függelékben* foglaltuk össze ábécé sorrend szerint.

szintjén potenciálisan mintegy 1000 m^2 felület szolgálja az érrendszer lúmene és az intersticiális tér közötti anyagkicserélődést [10]. Egy egyén 80 éves életperiódusa során atmoszférás oxigénből több mint tízezer m^3 lép át e felületen, folyadékból pedig ötezerötszáz m^3 körüli mennyiség.

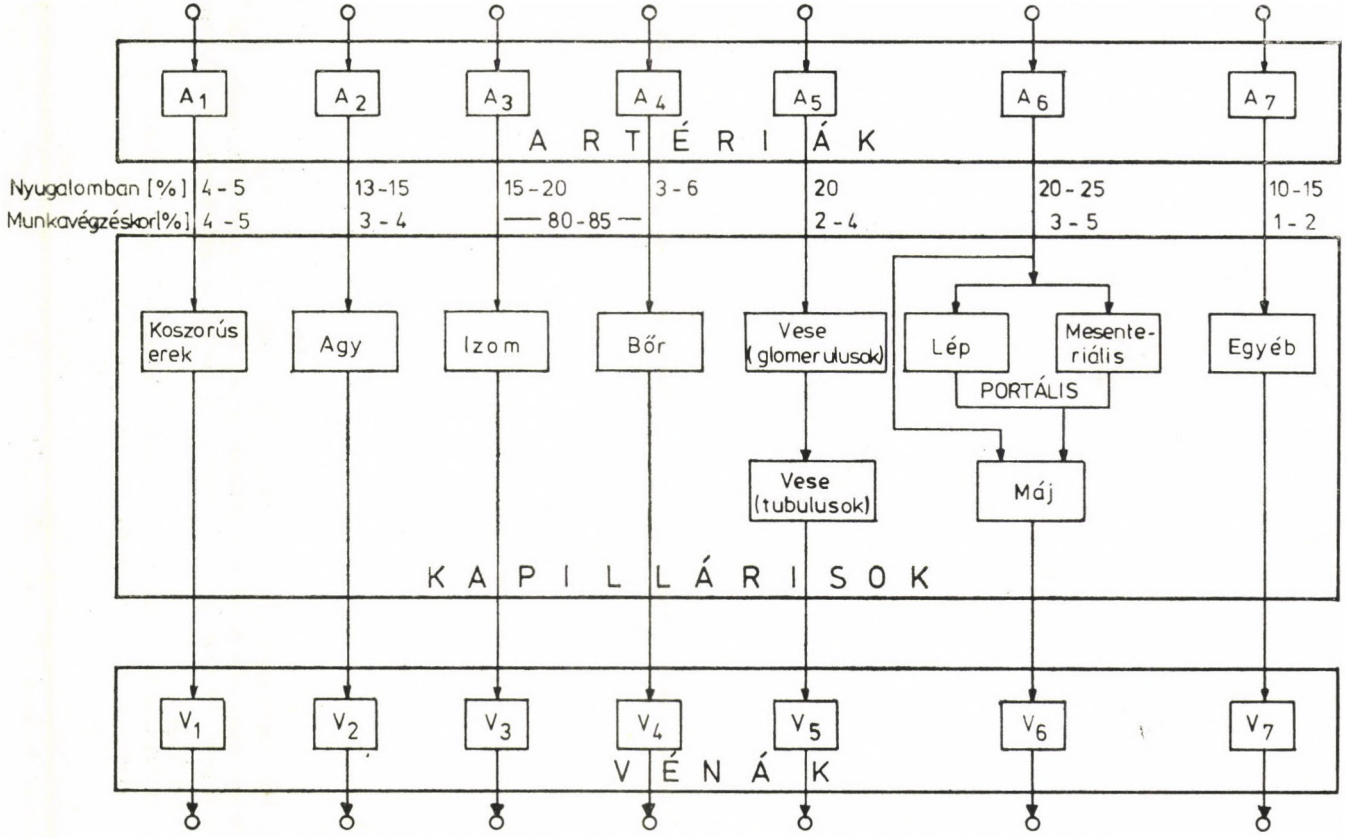
A vérkeringési rendszer tulajdonképpen mechanikai jellegű folyamatok (nyomás, áramlás, hullámcsillapítás, filtráció) révén teljesíti differenciált elosztó funkcióját. Működésének biomechanikai aspektusaival a vérkeringés-élettan hemodinamikának nevezett ága foglalkozik. A vérkeringés pályáját képező bonyolult felépítésű rugalmas üregrendszer, az érhálózat és a szív, végső soron teljesen zárt kört képez a szervezetben. A közbeiktatott szív a véráramlást fenntartó periodikus működésű pumpa: az ún. nagyvérkört hajtó bal fele inkább nyomásgenerátornak, az alacsony nyomású kisvérkört mozgató jobb fele pedig volumengenerátornak tekinthető [15]. A nagyvérkört alkotó érpálya a mechanikai funkciók szempontjából világosan tagolt, s a következő sorba kapcsolt szakaszokra osztható *(2. ábra)*: „szélkazán" erek, prekapilláris rezisztenciaerek, sönt-erek, szfinkter-erek, anyagcsere-erek, posztkapilláris rezisztencia-erek, kapacitancia-erek. A párhuzamosan kapcsolt legfőbb érterületeket jelzi a *3. ábra*, melyen a számok azt mutatják, hogy az egyes pályákon a szívperctérfogat hány %-a áramlik át nyugalomban és intenzív munka esetén (szívperctérfogat: kb. 5, ill. 25 l/min). Egy teljes emberi élet során e rendszer összesen legalább kétszázezer m^3 vért továbbít. A nagyvérkör soros kapcsolású szakaszainak globális vérnyomás- és vértérfogat-viszonyai a *4. ábrán* láthatók [41].

A vérkeringési rendszer mechanikai folyamataira vonatkozó információnk nagyobb része — elsősorban diagnosztikai és méréstechnikai okoknál fogva — a nagyvérkör artériás szakaszaiból származik, s főleg állandósult állapotokat jellemző vérnyomásadatokból áll. Ugyanakkor e stratégiai fontosságú szakasz hemodinamikáját és annak szerepét a vérkeringésszabályozás egészére nézve

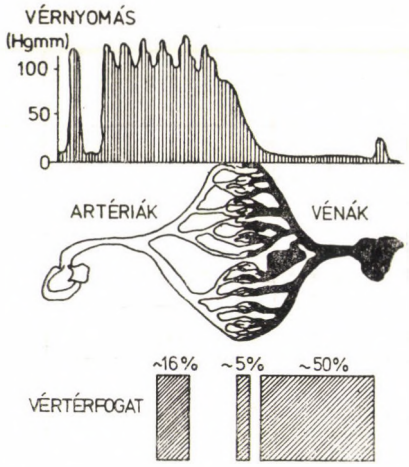


2. ábra. A vérkeringési rendszer soros kapcsolású szakaszainak tömbvázlata funkcionális tagolás szerint.

Fig. 2. Scheme of the functionally specialized series-coupled sections of the cardiovascular system.



3. ábra. A vérkeringési rendszer párhuzamosan kapcsolt érterületeinek tömbvázlata.
Fig. 3. Scheme of parallel-coupled sections of the vascular system.



4. ábra. Vérnyomás és vértérfogat a nagyvérkör sorba kapcsolt szakaszai mentén. A balkamra nagy nyomásamplitúdója a „szélkazán" erekben jelentősen módosul: az aorta ascendensben mintegy harmadára csökken, az aortában és az artériákban a periféria felé haladva kisfokú pulzusnyomás-növekedés tapasztalható. A kapillárisok előtti rezisztencia erek mentén a pulzushullám kiszűrődik. Az utóbbi szakaszon meredeken csökken a középnyomás is, a vénákban közel zérussá válik, így az áramlást fenntartó nyomásfő a nagyvérkörben normálisan 100 Hgmm körül van. A vértérfogat eloszlás, ill. a vénás beáramlás „short-term" szabályozása döntően vénás oldali beavatkozással történik, mivel a vérkészlet nagyobb része itt található, s a vénák befogadóképessége széles határok között változhat.

Fig. 4. Blood pressure and blood volume in the series-coupled sections of the systemic circulation. The high pressure amplitude of the left ventricle becomes considerably modified in the vessels having „Windkessel" function: it drops to about one third of the original level in the ascending aorta, and a slight increase in pulse pressure occurs in the abdominal aorta and the large arteries. The pulse wave is filtered out along the precapillary vessels. In the latter segment the mean pressure, too, drops abruptly, falling almost to zero in the veins; thus the pressure head accounting for maintenance of the blood flow is normally about 100 mmHg in the systemic circulation. The short-term control of blood volume distribution and venous returne is primarily directed to the venous system, because this comprises the greater part of the blood, and it has a wide-ranging capacitance.

nem ismerjük kellő mélységben. Ennek egyik fő oka az, hogy a vérnyomás- és áramláshullámok alakhű regisztrálása vértelen úton ma még nem oldható meg, s a direkt technika is csak az utóbbi 1—2 évtizedben vált megbízhatóvá. Az érfal viszkoelasztikus tulajdonságainak, rugalmas méretváltozásainak vizsgálata vonatkozásában még nagyobbak a metodikai korlátok [23]. A rendelkezésünkre álló adatok azonban azt máris jelzik, hogy az artériás oldal biomechanikája az artériás középnyomás fenntartásán és a passzív „szélkazán" működésen túl is fontos és differenciált szerepet játszhat a vérkeringés szabályozásában [19, 23, 40]. Pl.:

a) Az artériafal disztenzibilitásának változásai következtében módosul a benne elhelyezkedő baroreceptorok érzékenysége, mely hatás önmagában is az artériás középnyomás megváltozásához vezethet [1].

b) A balkamra által ejektált térfogathullámok amplitudójának nagyságától és meredekségétől, valamint a szöveti viszkoelasztikus tulajdonságoktól függ, hogy mekkora lesz a nyomáspulzus az artériás rendszerben, s mennyi hő disszipálódik a szív és az artériák falában. E tényezők befolyásolják a szív-

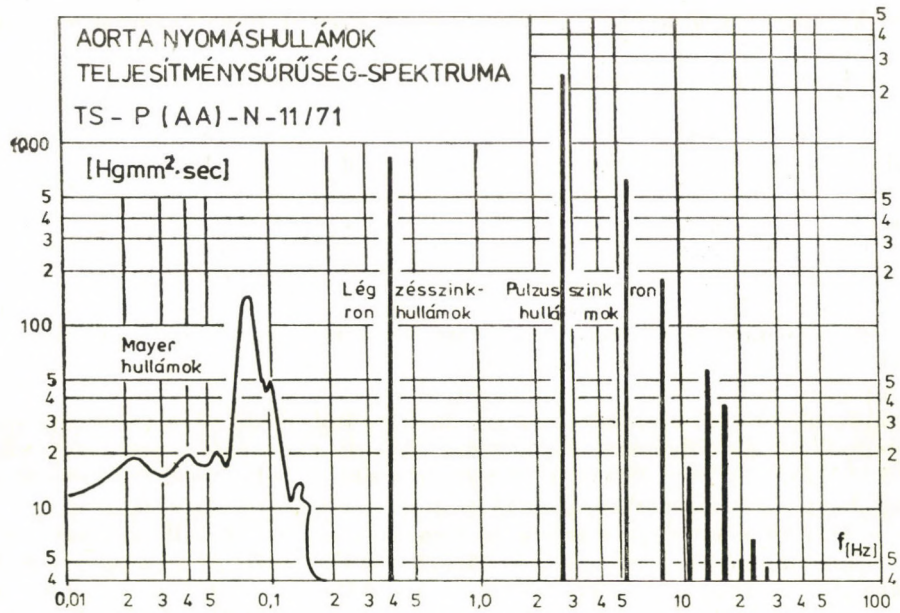
működés élettani hatásfokát, pulzációs energiaráfordítását, nagyobb távon pedig szöveti átalakulást idézhetnek elő az artériafalban [5, 38].

c) A „short-term" (gyors, kb. tizedmásodperc-perc periódusidejű) vérnyomáshullámok spektruma *(5. ábra)* igen összetett struktúrájú, jelezvén, hogy az artériák biomechanikai folyamatai sok információt hordozhatnak a szabályozási mechanizmusokra vonatkozóan is [35, 36, 45].

A vérnyomásszabályozás részfolyamataira vonatkozó ismereteink gyarapításának egyik jelentős útját tehát a hullámszerkezet kvantitatív feltárása képezheti, melyhez ma már fejlett méréstechnikai és jelanalitikai eljárások állnak rendelkezésünkre [2, 7, 8, 43, 44, 50, 51]. A másik fontos kutatási irány e vonatkozásban a vérnyomáshullámok alakját döntően megszabó érfalmechanika jellemzőinek megismerésére irányul [23, 39, 40]. S természetesen alapvető probléma az is, hogy egyrészt az artériás középnyomást optimális szinten tartó mechanizmusok, másrészt a vérkeringési hullámokat és az érfalrugalmasságot befolyásoló hatások miként függnek össze egymással, azaz feltételezhető-e olyan szabályozás a szervezetben, mely a szív és nagyartériák hidraulikus illeszkedését optimalizálja, összhangban a középnyomás szabályozásával.

Az előbbi megfontolások alapján a következő kérdések irányában végeztünk kísérletes vizsgálatokat az elmúlt néhány év során:

1. Miként alakulnak a „short-term" vérnyomáshullámok spektrális tulajdonságai (véletlenszerű hullámkomponens, teljesítménysűrűség-spektrum, Fourier-modulusok) az artériás középnyomás véreztetéssel történő lépcsőzetes változtatása során altatott kutyákban [34, 46]?



5. ábra. A „short-term" artériás vérnyomáshullámok [*P*(AA)] teljesítménysűrűség-spektruma (TS) altatott, mesterségesen lélegeztetett kutya aortájában.

Fig. 5. Power density spectrum (TS) of short-term arterial pressure waves [*P*(AA)] in the aorta of an anaesthetized dog with artificial respiration.

— Van-e korreláció a harmadrendű (Traube—Hering—Mayer) és a pulzusszinkron vérnyomáshullámok között [47, 48, 49]?

2. Hogyan függ az intraluminális nyomástól a fiziológiás mértékű simaizom aktiválásra (noradrenalin) bekövetkező geometriai és elasztikus válasz különböző típusú izolált artériák esetében [22, 24, 25, 28, 30]?

3. Milyen hatások befolyásolják az erek előbbi nyomásfüggő válasz-karakterisztikáit?

— Vazopresszin érhatásai [6, 20, 25, 26, 27, 31].

— Átmeneti ischaemia hatása az ér-reaktivitásra [32, 33].

— Species-függő jellegzetességek [13, 22, 23, 25].

4. Krónikus, szöveti átalakulással járó folyamatok milyen hatást gyakorolnak az érfal biomechanikai tulajdonságaira?

— Fibroszklerotikus és normális szöveti képű humán kraniális artériák biomechanikája [12, 17, 18].

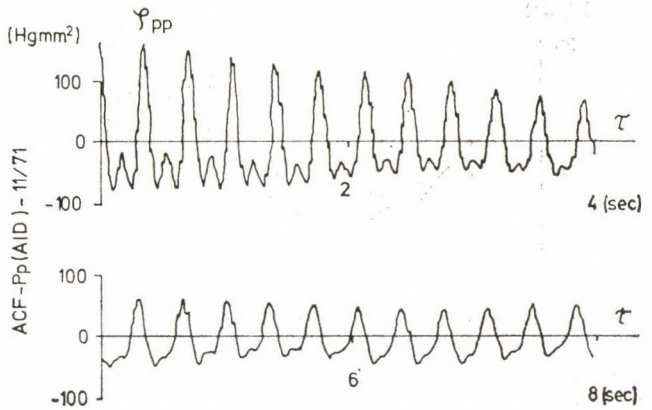
— Artéria helyére transzplantált véna mechanikai tulajdonságainak változása [9, 29].

1. Az artériás vérnyomáshullámok struktúrája különböző nyomásszintek mellett

A „short-term" vérnyomásregulációval [11] kapcsolatba hozható artériás nyomásingadozások széles frekvencia-spektrumot fognak át *(5. ábra)*. Részben oki, részben szerkezeti alapon három fő, egymásra szuperponálódó hullámcsoportra oszthatók [16]: *elsőrendű*, a szívveréssel szinkron pulzushullámok; *másodrendű*, légzés-szinkron; és *harmadrendű*, főleg vazomotor eredetű ún. Traube—Hering—Mayer-hullámok. Korszerű jelszűrési és regisztrálási technikákkal e hullámcsoportok egymástól elválaszthatók és külön-külön kezelhetők [44, 48]. Normális domináns frekvenciájuk 1—2, 0,3—0,8, ill. 0,05—0,2 Hz-re tehető. A hullámok amplitudói is igen változó értékeket vehetnek fel, teljesítménysűrűségük 60 dB tartományban változik [45, 46].

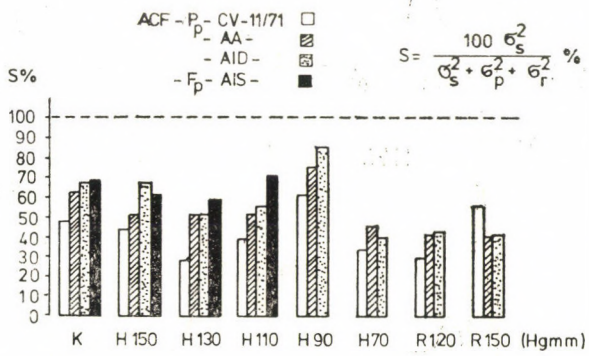
A különböző frekvenciájú vérnyomásingadozások azonban csak elvétve tekinthetők szabályos, determinisztikus folyamatnak. Autokorrelációs analízissel megállapítottuk, hogy a frekvencián és amplitúdón kívül jellemző rájuk a véletlenszerű (sztochasztikus) komponensek nagysága is [34, 35, 36, 45, 46]. Még a legszabályosabb élettani folyamatok közé tartozó elsőrendű hullámoknak is meglepően nagy a sztochasztikus jeltartalmuk, melyeket általában a belső, vagy a külső környezetből származó ismeretlen „zavaró" hatás idéz elő. A véletlenkomponens autokorrelációs analízissel elválasztható a determinisztikus összetevőtől, mivel egy, a spektrumra jellemző τ eltolási idő után „kiátlagolódik" a periodikus alapfolyamatból *(6. ábra)*. Relatív nagyságát a szervezet működési állapotának megváltozása jelentős mértékben befolyásolhatja, de attól is függ, hogy a hullámstruktúrát az érrendszer mely szakaszán vizsgáljuk.

A 7. *ábra* azt demonstrálja, mekkora az elsőrendű hullámok sztochasztikus komponenseinek relatív nagysága hat különböző, 20 Hgmm-es szintkülönbséggel beállított artériás középnyomás-értéken. A vérnyomás mérése katéterek segítségével a kutya érrendszerének három pontján (aorta ascendensben, a. iliacában és v. cava superiorban a jobbpitvar közelében) történt elektromanométerrel. Az egyik a. iliacában véráramsebességet is mértünk ultrahangos áramlásmérővel. Megállapítható, hogy a normális artériás középnyomás kör-



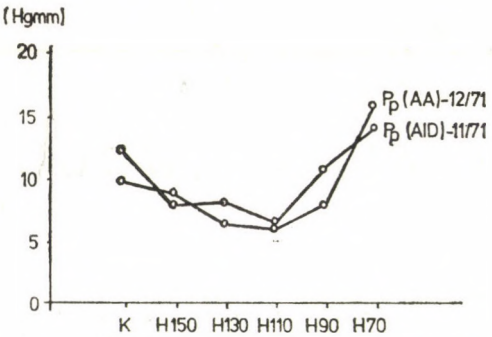
6. ábra. Kutya arteria iliaca dextrában regisztrált vérnyomáshullámok pulzusszinkron összetevőjének autokorreláció-függvénye. Φ_{pp}: a függvényérték (= a folyamat varianciája) τ eltolási időnél.

Fig. 6. Auto-correlation function of the pulse-synchronous component of pressure waves recorded in canine right iliac artery. Φ_{pp}: variance at τ time shift.



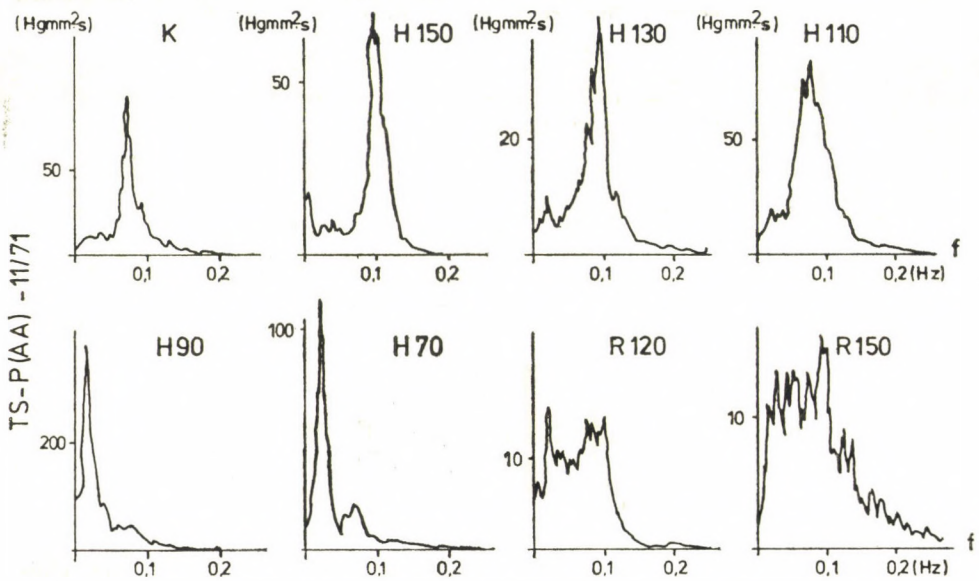
7. ábra. Az érrendszer különböző szakaszain regisztrált pulzusszinkron vérnyomás (P_p) és véráramlás hullámok (F_p) relatív sztochasztikus jeltartalma különböző, véreztetéssel (H) és reinfúzióval (R) beállított középnyomásszinteken, altatott kutyákban. A kiindulási kontrollnyomás (K) 155 Hgmm volt. *CV:* centrális vénás, *AA:* aorta ascendens, *AID:* a. iliaca dextra, *AIS:* a. iliaca sinistra. A véletlenszerű összetevő relatív varianciáját *(S)* a megadott képlet szerint számítottuk az autokorreláció-függvényekből. σ_s^2: a sztochaszt kus, σ_p^2: a pulzusszinkron szabályos periodikus, σ_r^2: a légzésszinkron szabályos periodikus hullámösszetevő varianciája.

Fig. 7. Relative stochastic signal content of pulse pressure (P_p) and flow waves (F_p) recorded in different segments of the vascular system, at various mean pressure levels adjusted by haemorrhage (H) and reinfusion (R) of the shed blood in dogs under anaesthesia. The initial (control) pressure (K) was 155 mmHg. *CV:* central venous pressure, *AA:* aorta ascendens, *AID:* right iliac artery, *AIS*: left iliac artery. The relative variance of the random component (S) was calculated from the autocorrelation functions by the formula given on the figure. σ_s^2: variance of the stochastic components, σ_p^2: variance of the pulse-synchronous components, σ_r^2: variance of the respiration-synchronous periodic components.



8. ábra. Az aorta ascendensben (*AA*) és az a. iliacában (*AID*) regisztrált pulzusszinkron vérnyomáshullámok (P_p) Fourier-alapharmonikusának amplitudója az artériás középnyomás függvényében. Kontroll (*K*) vérnyomás a 11/71 sz. kutyában 155, a 12/71-ben pedig 160 Hgmm.

Fig. 8. Amplitudes of the 1st Fourier harmonic for the pulse-synchronous blood pressure waves recorded in ascending aorta (*AA*) and iliac artery (*AID*). The Fourier values are versus arterial mean pressure. The control (*K*) pressure level was 155 and 160 mmHg in dogs No.: 11/71 and No. 12/71, respectively.



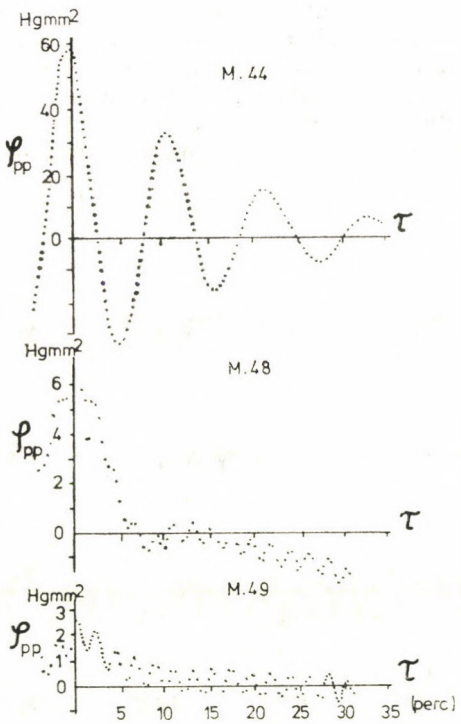
9. ábra. Az aorta ascendensben regisztrált harmadrendű vérnyomáshullámok [*P* (AA)] teljesítménysűrűség-spektruma az artériás középnyomás függvényében. *K*, *H* és *R* magyarázata a 7. ábra szövegében található.

Fig. 9. Power density spectrum of third order pressure waves recorded in the ascending aorta as a function of arterial mean pressure. For explanation of the symbols *K*, *H* and *R* see legend to Fig. 7.

nyezetében, (kb. a baroreceptor szabályozás terjedelmében) a pulzushullámok véletlenszerű jeltartalma U-alakú jelleggörbe szerint függ a középnyomás értékétől mindegyik változó esetében. Alacsonyabb nyomásoknál és a levett vér reinfúziója után (feltehetően az irreverzibilis sokk-fázisban) e jelekre nézve szabályosságot nem tapasztaltunk. Az is megfigyelhető, hogy a sztochasztikus

jeltartalom az a. iliaca pulzushullámaiban nagyobb, mint a szívközeli érszakaszokban. Fentiek alapján feltételezzük, hogy nagyságuk jellemző a vérnyomásszabályozási mechanizmusok effektivitására. A pulzushullámok „szabályos" összetevőire nézve is találtunk néhány esetben az előbbiekhez hasonló U-alakú összefüggést a középnyomással. Ezt demonstrálja a *8. ábra* az elsőrendű nyomáshullámok Fourier-alapharmonikusának amplitúdói vonatkozásában. Megfigyelésünk azt sugallja, hogy az artériák hullámellenállása [19] bizonyos esetekben a normális középnyomás értéke körül a legalacsonyabb.

A harmadrendű vérnyomáshullámok sztochasztikus jeltartalma lényegesen nagyobb, mint az elsőrendűeké, ezt tükrözi az is, hogy spektrumuk folytonos *(5. ábra)*. Normális középnyomásértékeknél teljesítménysűrűségük viszonylag kicsi, s egy, átlagosan 0,085 ($\pm$0,012) Hz-es domináns frekvencia jellemző rájuk. Az artériás középnyomás normális szint alá csökkentése hatására ugrásszerűen megnő az amplitúdójuk, s lecsökken a frekvenciájuk *(9. ábra)*. A súlyos sokk-fázisban a spektrum csipkézetté, egyenletessé, azaz teljesen zajszerűvé válik. Sztochasztikus jeltartalmukat a szervezet számos egyéb állapotváltozása befolyásolhatja, pl. az endokrin miliő, vagy a perifériás idegaktivitás megváltoztatása — ezt mutatják a *10. ábra* autokorreláció-függvényei.

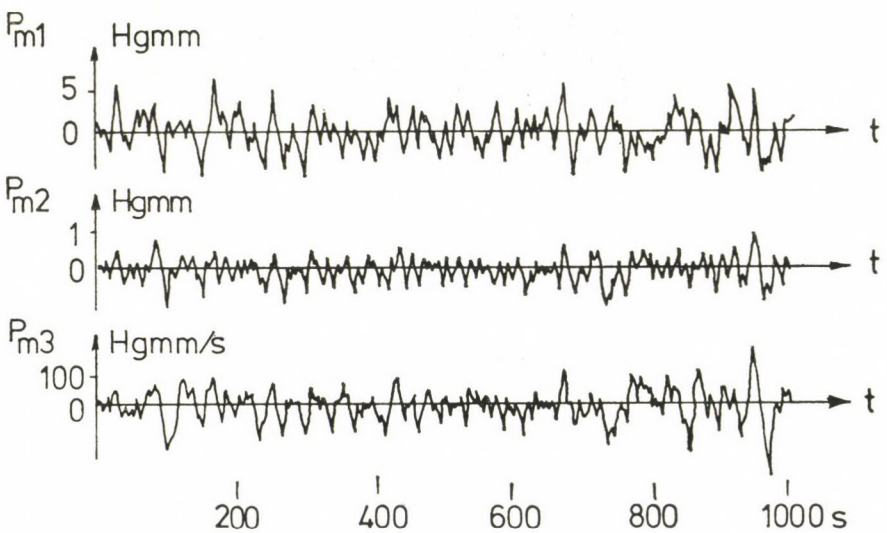


10. ábra. Kutya a. femoralisban regisztrált harmadrendű vérnyomáshullámok autokorrelációfüggvényei kontroll (M. 44) körülmények között, valamint a vagus és ischiadicus idegek átmetszése (M.48) és hipofizektómia (M. 49) után 1—1,5 órával. Φ_{pp}: függvényérték, τ: eltolási idő.

Fig. 10. Autocorrelation functions of third order pressure waves recorded in canine femoral artery under normal conditions (M.44) and 1—1.5 hrs after transsection of the vagus and ischiadic nerves (M. 48) and after hypophysectomy (M. 49). Φ_{pp}: function value, τ: time shift.

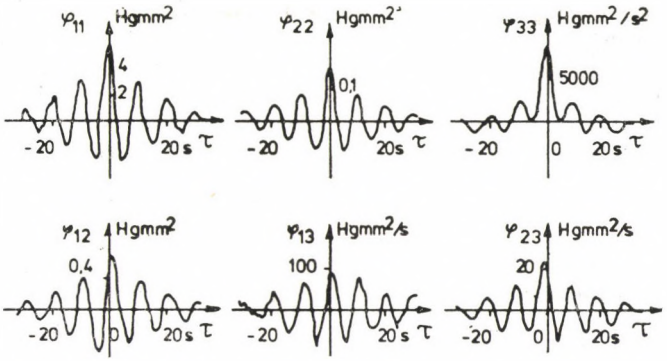
Korreláció a vérnyomásspektrum egyes komponensei között. Mivel feltételezhető, hogy a vérnyomáshullámok szabályozási információkat hordoznak, szükségesnek tartottuk megvizsgálni, van-e kapcsolat az első- és a harmadrendű hullámok között [47, 48, 49]. E célból lineáris jelszűrési technikával, analóg- és célszámítógépek segítségével, a pulzushullámokból leválasztottunk két jellemző komponenst, mégpedig az amplitúdó abszolút-értékét és az emelkedő szár legnagyobb meredekségét (derivált maximum). E pulzuskomponensek harmadrendű változásai és a Traube—Hering—Mayer-hullámok *(11. ábra)* között keresztkorreláció-analízissel kerestünk összefüggést. Összesen 96 korrelációfüggvény alapján megállapítottuk, hogy szoros kapcsolat van a pulzushullámkomponensek harmadrendű fluktuációi, valamint maguk a harmadrendű hullámok között *(12. ábra)*. Feltehető, hogy az utóbbi hullámcsoport hat az előbbiekre, mivel ezek mintegy 1,5—2 sec-os késéssel jelennek meg az azonos helyen regisztrált hullámok struktúrájában. Az autokorreláció-függvények tanúsága szerint a 3 különböző hullámkomponens statisztikai szerkezete nagyon hasonló *(12. ábra)*. A kölcsönhatás kvantitatív viszonyait lineáris modellezés útján számolt átviteli tényezőkkel is jellemeztük. Ezek átlagos értéke a pulzusamplitúdóra nézve 0,1, a derivált maximumra nézve pedig 20 (azaz 1 Hgmm-es harmadrendű hullámamplitúdó változással átlagosan 0,1 Hgmm pulzusamplitúdó-, ill. 20 Hgmm/sec derivált maximum eltérés jár együtt). Természetesen a pulzusamplitudó és a derivált maximum harmadrendű változásai között is szoros korrelációt találtunk, mérhető időkülönbség azonban a két jel megjelenése között nincs *(12. ábra)*, az átviteli tényező átlagos értéke 150.

A keringési hullámok szerkezetének elemzése alapján tehát a következő fő megállapításokat tehetjük: *a)* egyes pulzushullám-komponensek U-alakú



11. ábra. Artériás vérnyomáshullámokból leválasztott jelösszetevők. P_{m1}: harmadrendű hullámok, P_{m2}: pulzusszinkron hullámok harmadrendű komponensének abszolút értéke, P_{m3}: pulzusszinkron hullámok derivált maximumának harmadrendű komponense.

Fig. 11. Isolated components of arterial blood pressure waves. P_{m1}: third order waves, P_{m2}: absolute value of the third order component in pulse synchronous waves, P_{m3}: third order component in the derivative maximum of pulse-synchronous waves.



12. ábra. A 11. ábrán bemutatott nyomáshullám-összetevők autokorreláció- (felső rész) és keresztkorreláció-függvényei (alsó rész).

Fig. 12. Autocorrelation (top) and cross-correlation (bottom) functions of the pressure wave components shown in Fig. 11.

jelleggörbe szerint függnek az artériás középnyomástól a normális középnyomás környezetében; *b)* a harmadrendű hullámok domináns frekvenciája és amplitúdója szignifikánsan változik a szervezet működési állapotaitól függően; *c)* szoros, dinamikus korreláció van a harmadrendű hullámok és az elsőrendű hullámok összetevői között; fetehető, hogy a harmadrendű hullámok okoznak struktúra-módosulást a pulzusszinkron hullámokban.

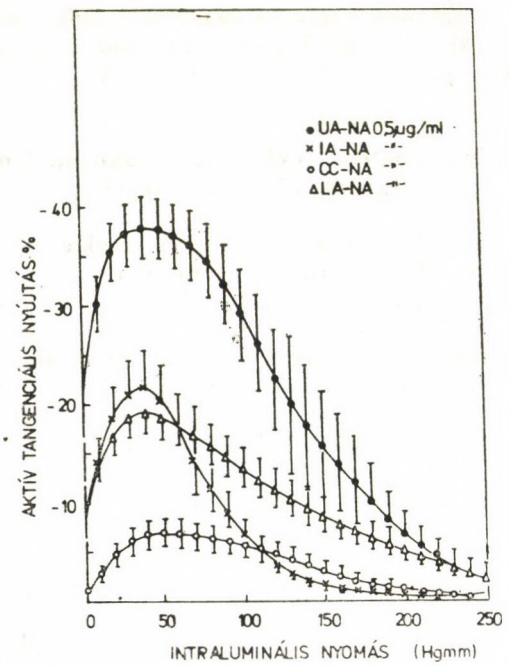
2. Az artériák aktív geometriai és elasztikus reakcióinak nyomásfüggő és regionális jellegzetességei

A vérkeringéshullámok szerkezeti módosulásainak megértéséhez, s az élettani szabályozó hatások effektivitásának felméréséhez elengedhetetlen annak tanulmányozása, hogy miként függ a különböző artériák passzív és aktív biomechanikai viselkedése a belső nyomástól, azaz a pillanatnyi terheléstől. E problémakör vizsgálatának rendkívül nagyok a metodikai és biológiai korlátai *in vivo* (pl. az érátmérő- és falvastagság változások alakhű, folyamatos, non-invaziv regisztrálása a vérnyomással szinkron; a vérnyomásváltoztatás neurohumorális következménye stb.). A kutatások nagyobb része ezért *in vitro* technikákkal folyik [23].

Vizsgálataink egyik részében új *in vitro* metodikát [3] alkalmazva, folyamatosan regisztráltuk az altatott kutyákból kimetszett különböző típusú artériák (iliaca, carotis communis, lienalis, uterina) átmérőjét és axiális húzóerejét, miközben az intraluminális nyomást lassan, 100 Hgmm/min sebességgel változtattuk 0 250 Hgmm között (nagydeformációs kvázistatikus mechanikai teszt). A méréseket először relaxált simaizom mellett, majd fiziológiás jellegű aktiválás (0,5 μg/ml noradrenalin) után végeztük el. Az így nyert jelleggörbékből 10 Hgmm-es inkrementumokra számítógéppel határoztuk meg a passzív és aktív deformációmértékeket (geometriai adatok), mechanikai feszültségeket és rugalmassági jellemzőket [22, 24, 25, 28, 30].

A geometriai válaszok elemzése során megállapítottuk, hogy mind a négy vizsgált artériatípus esetében a noradrenalin érátmérőt csökkentő hatása

jelentős mértékű, s nagysága a súlyos hipotenziós szintnek megfelelő nyomásértékeknél maximális *(13. ábra)*. A kontrakció nagysága és a válaszgörbe alakja azonban értípusonként jelentős különbségeket mutat. Pl. az uterus artéria oly mértékben összehúzódott, hogy a lumen több esetben záródott 30—40 Hgmm körüli intraluminális nyomás mellett, a carotis communis maximális kontrakciója ellenben 10% alatt maradt, azonos koncentrációjú noradrenalin alkalmazása esetén. A simaizomösszehúzódás által előidézett mechanikai feszültségváltozások (aktív feszültségek) hasonlóképpen értípusonként differenciált képet mutattak. Valószínű tehát, hogy a különböző artériák biomechanikai eltérései is szerepet játszhatnak az érrendszer autoregulációjának régiók szerint jellemző beállításban. A nagyartériák fő fiziológiai funkciója azonban feltehetőleg nem elsősorban az átmérőváltozásokhoz, hanem elasztikus tulajdonságaikhoz kötött („szélkazánfunkció"). Kérdés, hogy simaizomzatuk aktivitása milyen mértékben befolyásolja jellemző, nemlineáris elasztikus viselkedésüket különböző fokú terhelések mellett. A *14. ábrá*ról leolvasható, hogy mind az a. iliaca, mind a carotis communis elasztikus modulusa jelentős mértékben csökkent (azaz a fajlagos rugalmasság nőtt) a simaizomösszehúzódás következtében, kivéve a 30 Hgmm alatti nyomásszinteket. Az elasztikus válasz maximuma, szemben a geometriai aktív válasz maximumával a normálisnak és

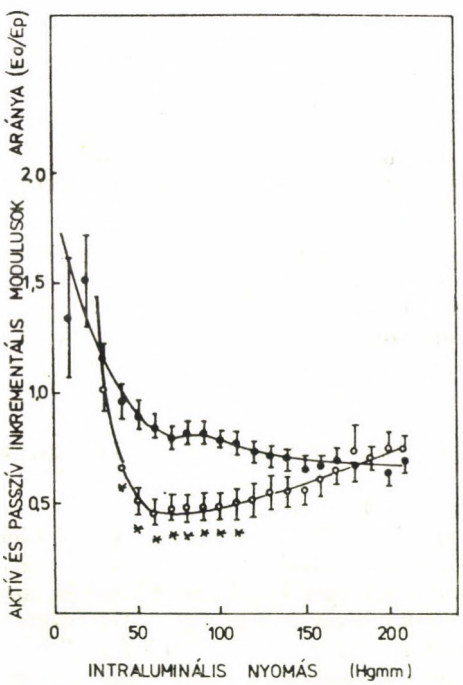


13. ábra. Altatott kutyákból kimetszett arteria uterina (UA), a. iliaca (IA), a. carotis communis (CC) és a. lienális (LA) külső átmérőjének relatív változása (aktív tangenciális nyújtás) noradrenalin (NA) hatására 0—250 Hgmm-es nyomástartományban.

Fig. 13. Relative changes in the outer diameter (active tangential strain) under noradrenaline (NA) at pressures ranging from 0 to 250 mmHg. Uterine (UA), iliac (IA), common carotid (CC) and splenic (LA) arteries excised from dogs under anaesthesia.

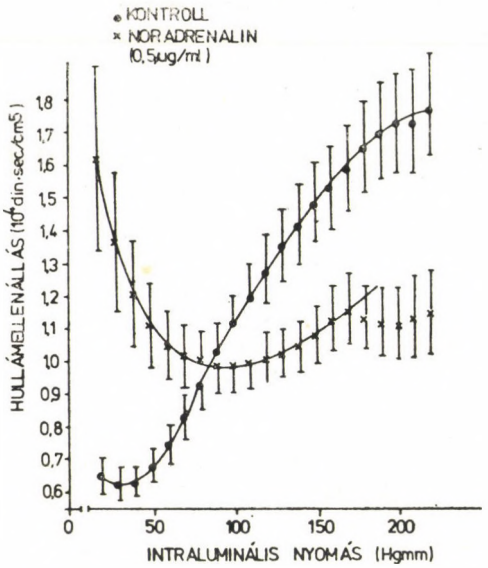
hipertenziósnak megfelelő belső nyomásértékeknél alakult ki. A kétféle aktív válasz (geometriai és elasztikus) e sajátos nyomásfüggő karakterisztikájának tulajdonítható, hogy simaizomkontrakció hatására a nagyartériák hullámellenállása U-alakúra módosul, 100 Hgmm-es intraluminális nyomás körül elhelyezkedő minimum értékkel [4]. A hullámellenállás (karakterisztikus impedancia) azt fejezi ki, hogy egységnyi amplitúdójú szinuszhullám-alakú volumen változások hatására mekkora nyomásimpulzusok lépnének fel a rugalmas érben egy meghatározott frekvencián (a váltóáramú ellenállás analógja). A középméretű szervartériáknál is jellemzően alakul a hullámellenállás simaizomaktiválás hatására *(15. ábra)*.

További kérdés, hogy az egyes artériatípusok elasztikus válaszában talált különbségek a simaizomzattal kapcsolatosak, vagy pedig a passzív érfaltulajdonságokhoz kötöttek. Vizsgálataink eredménye szerint [30] a két artériatípus aktivált simaizomzatának elasztikus modulusa éppen abban a nyomásterjedelemben azonos, ahol elasztikus válaszukban a legnagyobb eltérést tapasztaltuk *(16. ábra)*. Végül is ahhoz a feltételezéshez jutottunk, hogy az aktív rugalmasság növekedés mértékét normális és magas intraluminális nyomásértékeknél az szabja meg, hogy itt milyen meredek a passzív rugalmassági



14. ábra. Kutya carotis communis (●) és iliaca (○) artériák aktív (E_a) és passzív (E_p) elasztikus modulusainak aránya a belső nyomás függvényében. A simaizomzat aktiválása 0,5 μg/ml noradrenalinnal történt mindkét artéria esetében *in vitro*. A csillagok a két jelleggörbe közötti szignifikáns eltérést jelzik ($p < 0{,}01$).

Fig. 14. Ratio of active (E_a) and passive (E_p) elastic moduli in canine common carotid (●) and iliac (○) arteries, versus intraluminal pressure. Smooth muscles were activated *in vitro* with 0.5 μg/ml noradrenaline in both vessels. The asterisks indicate the significant differences ($p < 0.01$) between the two curve profiles.



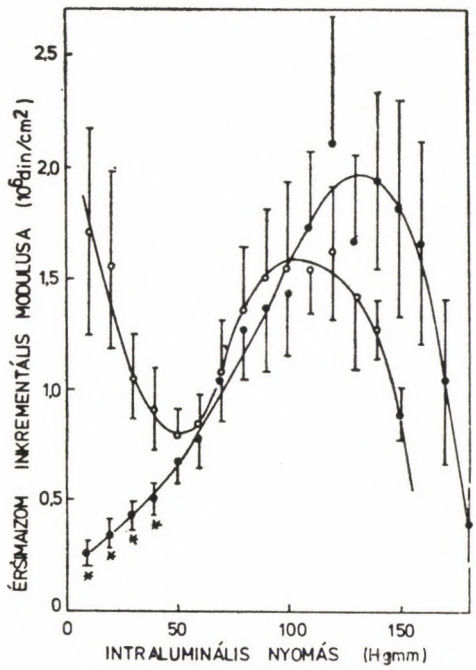
15. ábra. Izolált lépartériák rugalmassági és geometriai jellemzői alapján számított hullámellenállás a belső nyomás függvényében (23), relaxált (kontroll) és noradrenalinnal aktivált simaizomzat mellett.

Fig. 15. Characteristic impedance calculated from the elastic and geometric characteristics of isolated splenic arteries as a function of intraluminal pressure (23) in relaxed (control) and noradrenaline-stimulated conditions of vascular smooth muscles.

karakterisztika. Ugyanis izomkontrakció hatására az ér a nemlineáris passzív karakterisztika egy másik „munkapontjába" kerül, ha az intraluminális nyomás változatlan marad. Így tehát, ha a kétféle artéria passzív rugalmassági karakterisztikájának meredeksége különböző, azonos aktív átmérőcsökkenés esetén is eltérő nagyságú lesz a rugalmassági modulus változása.

3. Az artériák nyomásfüggő aktív válaszkarakterisztikáit befolyásoló tényezők

Vazopresszin hatása. Jól ismert, hogy a különböző hormonok kölcsönösen befolyásolják egymás specifikus hatásait. Ilyen típusú kölcsönhatások rendkívül jelentősek lehetnek a vaszkuláris kontroll vonatkozásában is. Az érsimaizomzat tónusát irányító lehetséges fiziológiai tényezők sorában máig is kérdéses a vazopresszin közvetlen szerepe, bár régóta tisztázott antidiuretikus funkciója (ADH), melynek szoros kapcsolata a „long-term" vérkeringésszabályozással egyértelmű [11]. Irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy a vazopresszin potencírozza a noradrenalin érhatásait [37], azonban a biomechanikai tényezőket is figyelembe vevő kvantitatív elemzés nagyartériákon ilyen irányban nem történt. Megvizsgáltuk ezért kutya izolált iliaca és carotis communis artériáin, hogy a vazopresszin hogyan befolyásolja a noradrenalinnal kiváltott nyomásfüggő érválaszt az endogén koncentrációhatárokon belüli mennyiségben. Azt tapasztaltuk, hogy a szintetikus arginin-vazopresszin 150 μE/ml koncentrációban nem váltott ki kontrakciót egyik artérián sem, a noradrenalin

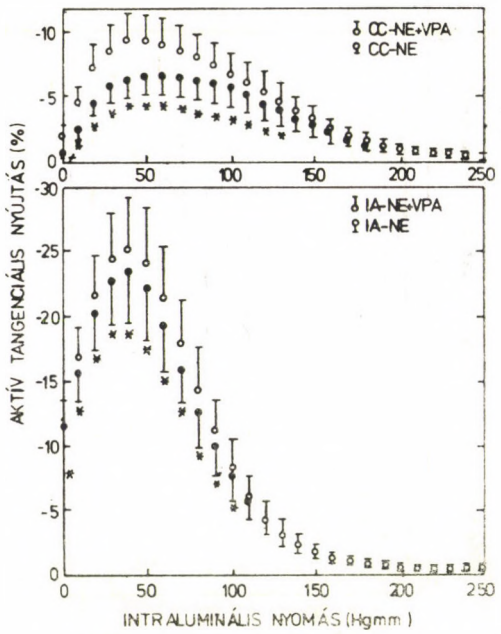


16. ábra. Kutyából izolált carotis (●) és iliaca (○) artériák aktivált simaizomzatának rugalmassági modulusa a belső nyomás függvényében. (Feltételeztük, hogy a simaizomzat homogén eloszlású és a passzív rugalmas elemekkel párhuzamosan kapcsolt az érfalban.)

Fig. 16. Elastic modulus of activated smooth muscles in isolated canine carotid (●) and iliac (○) arteries as a function of intraluminal pressure. (Homogenous distribution of smooth muscles coupled in parallel with the passive elastic elements was postulated.)

hatását (0,5 μg/ml) azonban szignifikánsan potencírozta *(17. ábra)*. Az átmérőredukciót fokozó hatásának maximuma, a noradrenalinéhoz hasonlóan, alacsony intraluminális nyomás mellett alakult ki. Ennek megfelelő *in vivo* nyomásviszonyok esetén (pl. véreztetés) a vérplazma vazopresszin koncentrációja többszörösen meghaladhatja az általunk alkalmazott értékeket [42]. Mivel a vazopresszin és a noradrenalin hatásának maximuma megegyező mechanikai feltételek mellett jelentkezett mindegyik artérián, feltételezhető, hogy mindkét hormon azonos, vagy azonosan orientált simaizomegységekre hat az érfalban.

Kérdés, hogy *in vivo*, a pulzáló nyomásterhelés dinamikus viszonyai mellett hat-e a nagyartériák simaizomzatára a vazopresszin. Altatott kutyák *in situ* izolált carotis és femorális artériáin tanulmányoztuk a lokálisan adagolt vazopresszin geometriai és elasztikus hatásait konstans artériás középnyomás mellett hipofizektómia előtt és után [22, 26, 27]. Megállapítottuk, hogy az a. femoralis esetében a külső átmérő átlag 6—7%-os csökkenése következett be, a dinamikus elasztikus modulus pedig 21—26%-kal lett alacsonyabb 100—150 μE/ml arginin-vazopresszin alkalmazása után *(18. ábra)*. E változások hipofizektómia után gyorsabban alakultak ki, mint előtte. A carotis esetében nem tapasztaltunk konzisztens hatásokat. Fenti eredmények alapján úgy véljük, hogy a vazopresszin *in vivo* is kifejthet szignifikáns, regionálisan diffe-



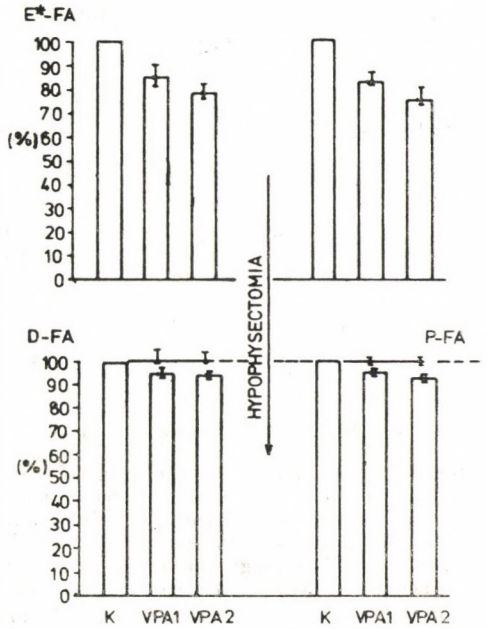
17. ábra. Noradrenalinnal (NA: 0,5 μg/ml), valamint NA-nal + vazopresszinnel (VPA: 150 μE/ml) aktivált arteria carotis communis (CC) és a. iliaca (IA) külső átmérőjének relatív változása (aktív tangenciális nyújtás) a belső nyomás függvényében. A statisztikailag szignifikáns ($p < 0{,}05$) potencírozó hatást csillaggal jelöltük.

Fig. 17. Relative changes in the outer diameter (active tangential strain) of common carotid (CC) and iliac (IA) arteries activated with noradrenaline (NA: 0.5 μg/ml) and NA + vasopressin (VPA: 150 μU/ml), as a function of intraluminal pressure. The asterisk marks the statistically significant ($p < 0.05$) level of potentiating action.

renciált hatást a nagyartériákra, s különösen figyelemre méltónak tartjuk a „szélkazán-funkció" hatékonysága szempontjából jelentős fajlagos rugalmasság nagyfokú növelését a femoralis artériákon.

Éber, szabadon mozgó kutyákon igazoltuk [6], hogy a kutatók általában azért nem tudtak kiváltani vérnyomásemelkedést vazopresszinnel, mert a baroreceptor reflexek és a magas endogén hormonszint ellensúlyozták a hatását. Megállapítottuk, hogy a baroreceptorok és a vazopresszin-szekréció előzetes kikapcsolása 100-szorosára növelheti a vaszkuláris rendszer küszöbérzékenységét a vazopresszin iránt éber kutyákban. Fiziológiás mennyiségű vazopresszin-infúzióval átlagosan 33 Hgmm-es artériás középnyomásemelkedést lehetett kiváltani ezeknél az állatoknál, szemben a kontrollok esetében tapasztalt 5 Hgmm körüli nyomásemelkedéssel *(19. ábra)*. E vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy a vazopresszin a rezisztenciaerek (kisartériák, arteriolák) szintjén is figyelemre méltó szerepet játszhat a vaszkuláris rendszer tónusának irányításában.

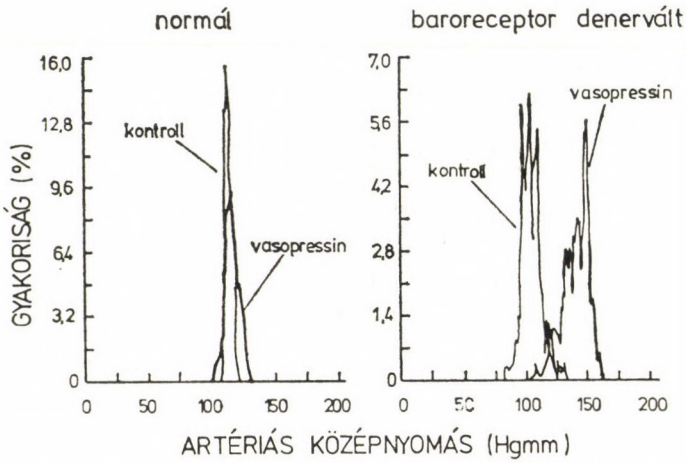
Átmeneti hipoxia hatása. Fiziológiás és kóros szituációk gyakran eredményeznek átmeneti oxigénhiányt a különböző artériák falában, jelentős részben a vérellátás átmeneti csökkentése révén. Ilyen effektusok jelentősek lehetnek mind patológiás folyamatok elindítása, mind az erek adaptív regulációja vonat-



18. ábra. Fent: Az artéria femoralis dinamikus elasztikus modulusa alapharmonikusának (*E*—FA*) százalékos változásai lokális vazopresszin (VPA: 100—150 μE/ml) alkalmazás hatására hipofizektómia előtt és után, altatott kutyában. Kontroll értékek (*K*): 48,9 $\pm$ 15,0, ill. 43,5 $\pm$ 13,0 (10^5 din/cm^2). VPA1: 2—3, VPA2: 10—12 perccel a VPA adás után. *Lent:* A külső átmérő (D—FA) és az artériás középnyomás (P—FA) változásai. D—FA kontroll: 0,438 $\pm$ 0,020, ill. 0,434 $\pm$ 0,021 cm; P—FA kontroll: 131 $\pm$ 6, ill. 130 $\pm$ 6 Hgmm.

Fig. 18. Top: Percentual changes in the 1st harmonic (E*—FA) of the dynamic elastic modulus of the femoral artery under locally applied vasopressin (VPA: 100—150 μU/ml) in anaesthetized dog before and after hypophysectomy. Control values (*K*): 48.9 $\pm$ 15.0 and 43.5 $\pm$ 13.0 10^5 din/cm^2, respectively. VPA1 and VPA2: 2—3 and 10—12 min after administration of VPA. Bottom: changes in outer diameter (D—FA) and arterial mean pressure (P—FA). D—FA control values before and after hypophysectomy: 0.438 $\pm$ 0.020 and 0.434 $\pm$ 0.021 cm, respectively. P—FA control values: 131 $\pm$ 6 and 130 $\pm$ 6 mmHg.

kozásában. Ezért megvizsgáltuk, hogy egyórás lokális átmeneti ischaemia megváltoztatja-e a kutya carotis artériák kontrakciós karakterisztikáját [32, 33]. Az egyik oldali artéria 8—10 cm-es szakaszát *in situ* izoláltuk környezetétől, egyórás időtartamra teljesen kizártuk belőle a vért, és meleg paraffin olajjal vettük körül, majd egyórás reperfúziós periódus következett. Meglepetésre azt tapasztaltuk, hogy gondosan kontrollált *in vitro* körülmények között az előzőleg ischaemizált artériák több mint kétszer akkora relatív átmérőredukcióval válaszoltak 0,5 μg/ml noradrenalinra, mint az ellenkező oldali kontrollok *(20. ábra)*. Mivel a két csoport átlagos mechanikai jellemzőiben (normál feszültségek, inkrementális elasztikus modulus, disztenzibilitás, deformáció-energiasűrűség) relaxált simaizomzat mellett nem találtunk különbségeket, az érreaktivitás fokozódását ischaemia után a simaizomzat tulajdonságainak megváltozásával hozzuk kapcsolatba. Figyelmet érdemel, hogy az artériák aktív geometriai válaszkészségének fokozódása alacsony belső nyomásoknál volt maximális, a normál válaszkarakterisztikának megfelelően. *In vivo* ilyen nyomásviszonyok mellett az endogén presszor anyagok és a vazokonstriktor idegaktivitás foko-



19. ábra. Egy-egy órás artériás középnyomás regisztrátum kb. 1800—1800 mintájának gyakorisági eloszlása (normális és baroreceptordenervált éber, szabadon mozgó kutyából). Vazopresszin: 1,6 mE/kg/min infúzió egy órán keresztül. Néhány hét alatt a baroreceptor denervált állatokban az artériás középnyomás átlagértéke visszatért a normál kontrollokénak megfelelő szintre, a nagy nyomásingadozások valószínűsége azonban jelentősen megnőtt (azaz az eloszlásgörbe kiszélesedett), s ugyanakkor megnövekedett a vaszopresszin-válasz nagysága.

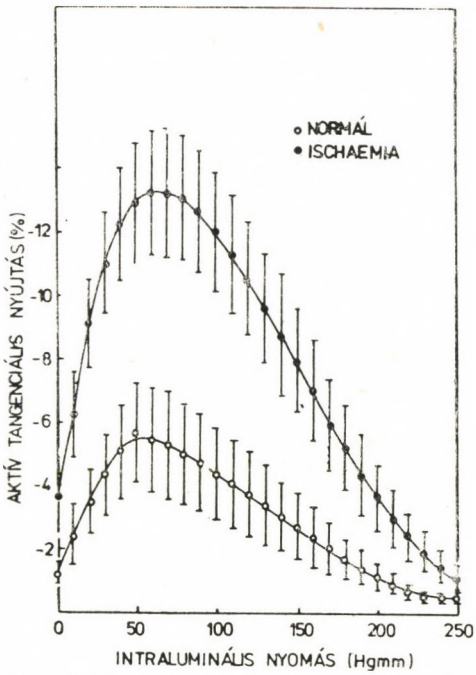
Fig. 19. Frequency distribution of approx. 1800 samples taken from one-hour arterial mean pressure record in a normal and a baroreceptor-denervated dog. Waking state, free movement. Vasopressin: 1.6 mU/kg/min by infusion over one hour.

zódása is várható, így a hatások kumulálódhatnak, ami vagy az autoregulációs folyamatok erősítéséhez, vagy ellenkezőleg, a szöveti perfúzió csökkentése révén a sokk-állapot súlyosbodásához vezethet.

Species-függő sajátosságok. Ahhoz, hogy a kutya artériákon tapasztalt jellegzetes aktív válaszkarakterisztikák fiziológiai jelentőségét objektíven megítélhessük, számos problémát kell még tisztázni. Ezek közül egyik az, hogy milyen megszorítással vihetők át az eredmények más speciesre. Megvizsgáltuk ezért, hasonló-e az azonos módon kezelt kutya, sertés és humán carotisok nyomásfüggő aktív geometriai válasza *in vitro* [13, 25]. Látható a *21. ábrán*, hogy a jelleggörbék lefutása több szempontból hasonló, így a maximális kontrakció mindegyik esetben hipotenziósnak megfelelő alacsony nyomástartományba esik, s értékük csak kevéssé tér el egymástól. Az intraluminális nyomás növelésével azonban a humán és sertés carotisok aktív válasza meredekebben csökkent, mint a kutya artériáké: előbbieknél a kontrakció maximuma egymással megegyező, de a kutyákénál alacsonyabb nyomáson fejlődött ki. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a kutya artériák aktív biomechanikai jellegzetességeinek elvi lényege emberre is átvihető, azonban a sertés artériák mechanikája feltehetően még nagyobb hasonlóságot mutat a humán artériákéval.

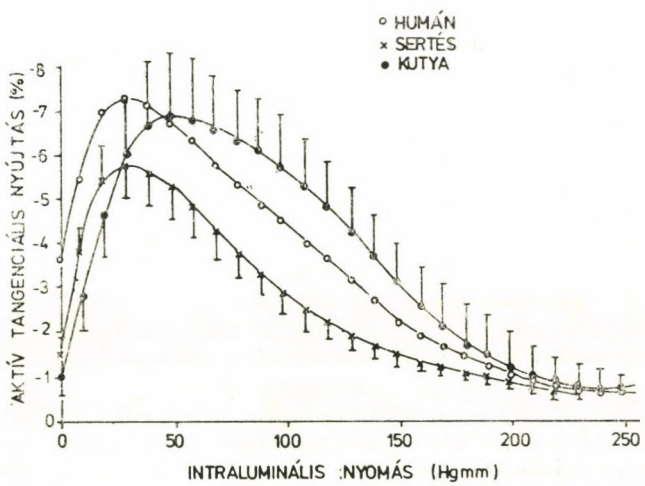
4. Szöveti átalakulás hatása az érfal biomechanikai tulajdonságaira

Fibrotikus és normális kraniális artériák. Arterioszklerózisban és más degeneratív érbetegségekben az artériák falának struktúrája drasztikusan átalakul: pusztul a simaizomzat, felszaporodnak a passzív kötőszöveti elemek stb. [14]. A normális öregedési folyamat során is jelentős mértékű lehet az artériafal



20. ábra. Normál kontroll és előzőleg ischaemizált carotisok külső átmérőjének relatív változása noradrenalin hatására (0,5 μg/ml) a belső nyomás függvényében *in vitro*, kvázistatikus körülmények között.

Fig. 20. Relative outer diameter changes versus pressure in normal and postischemic carotid arteries after noradrenaline (0.5 μg/ml) treatment under quasi-static conditions *in vitro*.

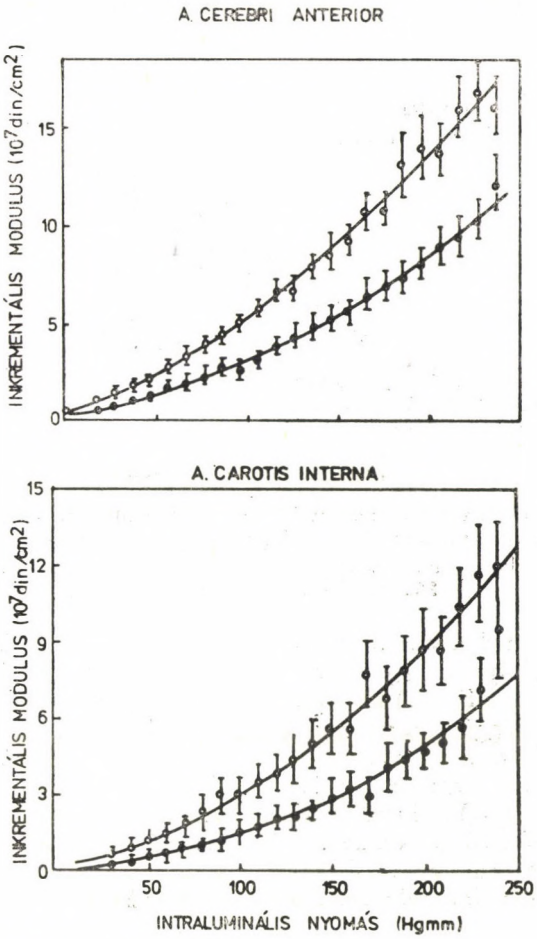


21. ábra. Humán, sertés és kutya carotisok külső átmérőjének relatív változása 0,5 μg/ml noradrenalin hatására a belső nyomás függvényében *in vitro*.

Fig. 21. Relative outer diameter changes versus intraluminal pressure in human, pig and dog carotid arteries after treatment with noradrenaline (0,5 μg/ml) *in vitro*.

fibrotikus átalakulása. E változások különösen súlyosan érinthetik az agyi vérkeringést. A fibrotikus folyamatok patomechanizmusának és hemodinamikai konzekvenciáinak megértéséhez alapvetően fontos az erek biomechanikai tulajdonságaiban bekövetkező változások megismerése. Összehasonlítottuk ezért a fibrotikus és normális szöveti képű humán kraniális artériák (cerebri anterior, carotis interna) passzív inkrementális rugalmassági tulajdonságait *in vitro* [12 17, 18]. Meglepő módon a megvastagodott falú erek fajlagos rugalmassága szignifikánsan nagyobbnak bizonyult (az elasztikus modulus 40–60%-kal alacsonyabb), mint a normáloké széles (50—150 Hgmm) nyomástartományban *(22. ábra)*. Ugyanakkor éppen a sugár/falvastagság arány jelentős mértékű csökkenése következtében, az erek disztenzibilitása a normális és fibrotikus csoportban közel azonos volt. Az artériák disztenzibilitásának élettani jelentősége nagy, ui. e jellemzőtől függ pl. a helyi áramlási viszonyok stabilitása, s az artéria hullámcsillapító funkciója. Feltételezzük, hogy a kóros fibrotikus folyamattal párhuzamosan, a pusztuló simaizomzat biomechanikai szerepét kompenzáló szöveti szabályozó hatások is működésbe lépnek az érfalban a lokális hemodinamika lehető optimális szinten tartása érdekében.

„Arterializált" véna biomechanikája. Mind klinikai, mind elméleti szempontból aktuális kérdés, hogy a normálisan alacsony vérnyomásviszonyok mellett működő véna miként alkalmazkodik az artériás körülményekhez. A vénákat ui. — megfelelő minőségű műanyag protézisek híján — egyre gyakrabban alkalmazzák transzplantátumként beteg, vagy sérült artériák rekonstrukciós műtétei során abban a reményben, hogy kielégítően arterializálódnak. Emellett rendkívül nagy a fiziológiai érdekessége annak a kérdésnek, hogy milyen mechanizmussal történik az egészséges érfal „long-term" biomechanikai adaptációja a megváltozott hemodinamikai viszonyokhoz. Előbbi megfontolások alapján homológ vena femoralist ültettünk az arteria femoralisba 9 kutyában, s 3–7 hónappal a műtét után megvizsgáltuk a transzplantátum középső szakaszának inkrementális mechanikai tulajdonságait *in vitro,* majd az eredményeket összehasonlítottuk normális vénákon nyert adatokkal [9, 29]. Azt találtuk, hogy átlagosan 70–80%-kal alacsonyabb volt a transzplantált vénák sugár: falvastagság aránya, normál feszültségei, rugalmas energiasűrűsége és elasztikus modulusa *(23. ábra)*, mint a normál kontrolloké a vizsgált 0–250 Hgmm-es intraluminális nyomástartományban. A hemodinamikai szempontból jelentős disztenzibilitás és hullámellenállás viszont a két csoportban gyakorlatilag megegyezett. Noradrenalinnal (5 μg/ml) csak a transzplantált vénákat lehetett kisfokban aktiválni (max. 5–7% belső átmérő redukció, 0—10 Hgmm-es nyomásnál) s kizárólag 80 Hgmm alatti nyomásszinteken. Mivel a normális vénafal elasztikus modulusa többszörösen nagyobb, mint az artériáké a fiziológáis artériás középnyomásnak megfelelő terhelési viszonyok mellett [23], a transzplantált vénák modulusában tapasztalt nagyfokú csökkenésből arterializációs tendenciára lehetne következtetni. Ezt a tendenciát azonban a disztenzibilitásra nézve kompenzálja az érfal-vastagság növekedése, így az artériás keringésnek tartósan kitett véna hemodinamikai szempontból ugyanolyan merev csőként viselkedik az artériás nyomástartományban, mint a kontroll véna. Valószínű, hogy e sajátosságán a simaizomzat kontrakciója sem változtat lényegesen, mivel 80 Hgmm felett nem volt aktiválható noradrenalinnal. Érdekes, hogy a transzplantált vénák passzív mechanikai tulajdonságaiból csaknem azonos jellegű változásokra lehet következtetni, mint a fibrotikus humán kraniális artériák esetében. Számos kérdés vár azonban még tisztázásra, mint pl. az,



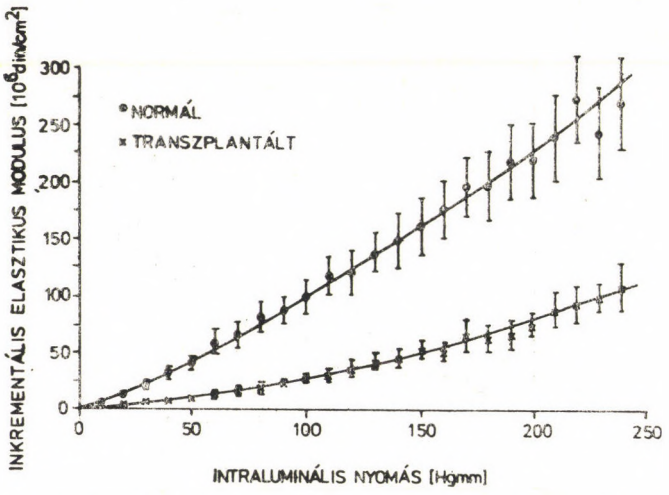
22. ábra. Normális (○) és fibroszklerotikus (●) szöveti képpel rendelkező humán kraniális artériák rugalmassági modulusa a belső nyomás függvényében (1—2 nap *post mortem* kimetszett erek).

Fig. 22. Elastic modulus versus intraluminal pressure in normal (○) and fibrosclerotic (●) human cranial arteries (1—2 days *post mortem*).

hogy a transzplantált vénák falának biomechanikai-strukturális változásai kóros folyamatnak minősíthetők-e, vagy pedig genetikusan determinált kompenzációs jellegű szöveti reakciónak tekinthetők, mely végül is a vénafal struktúrelemeinek mechanikai feszültségeit a normális véna működéstartományának megfelelő értékre csökkenti le.

Összefoglaló megbeszélés

Eredményeink, összhangban az irodalmi adatokkal, amellett szólnak, hogy az artériák falának mechanikai tulajdonságait számos hatás befolyásolhatja, s a létrejött változások hemodinamikai konzekvenciái jelentősek lehetnek a vérkeringésszabályozás szempontjából. Szabályozási aspektusból külö-



23. ábra. Normális, valamint artériaként működtetett transzplantált vénák kvázistatikus elasztikus modulusa 0—250 Hgmm-es belső nyomástartományban.

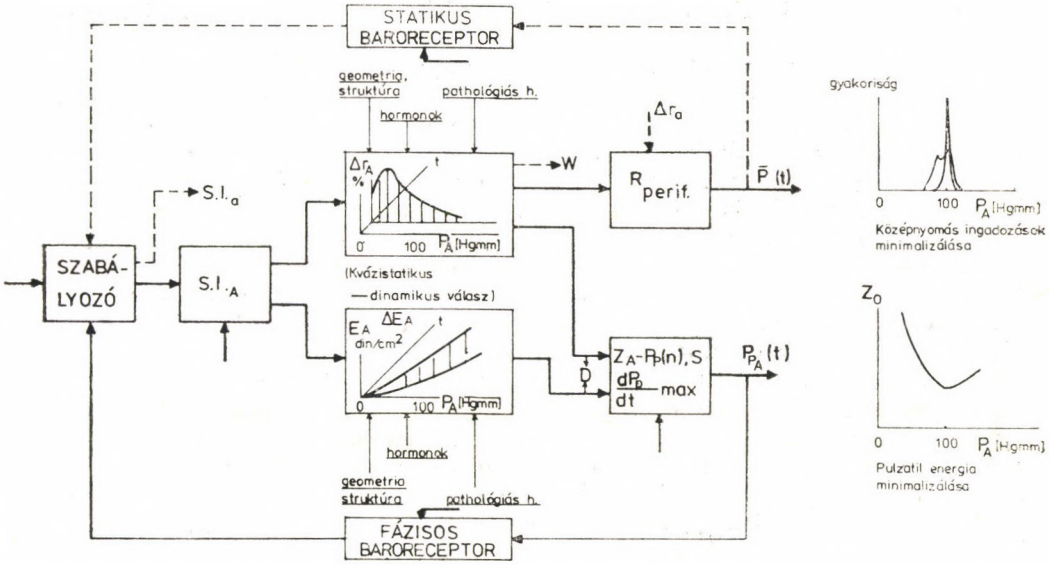
Fig. 23. Quasi-static elastic modulus of normal veins and vein-derived arterial grafts at O to 250 mmHg intraluminal pressures.

nös figyelmet érdemel a simaizom szerepe. Az előző fejezetek során láttuk, s a *24. ábrán* összefoglaljuk, hogy az artériák simaizomzatának fiziológiás mértékű aktiválása *(24. ábra:* S. I.$_A$) kvázistatikus viszonyok mellett, *in vitro* jelentős mértékű, nyomásfüggő geometriai- (Δr_A) és elasztikus-választ (ΔE_A) eredményez. Ennek következtében megváltozik az artériák falában tárolt visszanyerhető rugalmas energia mennyisége (W), az artériák disztenzibilitása (D), s hullámellenállása (Z_A) és kismértékben az „egyenáramú" ellenállás is (R_{perif}). A geometriai és elasztikus válaszkarakterisztikákat számos tényező modulálhatja, így pl. az érgeometriából és a falstruktúrából eredő regionális mechanikai sajátosságok, hormonális kölcsönhatások, akut és krónikus patológiás folyamatok.

Az eredmények amellett szólnak, hogy nagyartériák esetében a fajlagos rugalmasság (E_A) s az ezzel szorosan összefüggő disztenzibilitás simaizmok által történő irányítása a normális középnyomás környezetében különösen hatékony, ahol néhány százalékos átmérőváltozás többször tízszázalékos rugalmasságváltozáshoz vezet. Az artéria-mechanika ilyen értelmű beállításának biológiai célszerűsége nyilvánvaló, ha figyelembe vesszük, hogy a vérnyomáspulzusok csillapítása, amely a nagyartériák fő fiziológiai funkciója, elsősorban nem a diaméterükhöz, hanem rugalmassági tulajdonságaikhoz, hullámellenállásukhoz kötött.

In vitro és *in vivo* nyert kísérleti adataink azt mutatják, hogy az artériák hullámcsillapító funkcióját meghatározó mechanikai tulajdonságok differenciált módon lehetnek szabályozva a nagyartériákban. Ugyancsak emellett szólnak irodalmi adatok is* [4, 5]. E szabályozások orvosi-élettani jelentősége több

* A mind több orvos-biológus számára ismeretlen falusi kovácsműhelyek passzív „szélkazán"-ja így egyre zavaróbb analógia az artériák aktív elasztikus funkciójának szemléltetésére, ezért helyesebb lenne a „szélkazán-erek" kifejezés helyett az egzaktabb „impedancia-erek" vagy „hullámellenállás-erek" elnevezést alkalmazni.



24. ábra. A nagyartériák (A) és kisartériák (*a*) simaizomzatának (S.I.) szerepe a „short-term" (rövidtávú) vérkeringésszabályozásban. *r:* sugár, *E:* elasztikus modulus, *t:* idő, *h:* hatások, *D:* disztenzibilitás, *Z:* hullámellenállás, *P:* vérnyomás, P_p: artériás nyomáspulzus, $P_p(n)$: nyomáspulzus Fourier-harmonikusa, *S:* sztochasztikus hullámkomponens.

Fig. 24. The role of smooth muscle elements (S.I). of large (A) and small (*a*) arteries in the overall short-term circulatory control. *E:* elastic modulus, *t:* time, *h:* effects, *D:* distensibility *Z:* characteristic impedance. *P:* blood pressure, P_p: arterial pulse pressure, $p_p(n)$: Fourier-harmonics for pulse pressure, *S:* stochastic wave component.

oldalról mérlegelhető. A hullámcsillapítás optimális beállítása az artériákban visszahat a szív pulzáló energiájára, ennek minimalizálása a normálisnak megfelelő középnyomásszinten a szívmunka élettani hatásfokának növelése szempontjából lehet nagyon jelentős. Ugyanakkor a szív által kilövellt térfogatimpulzusok a hullámellenállással arányos mértékben terhelik az artériák falát és esetleg a mikrocirkulációt is. Az esetben, ha a terhelés kritikusan nagy méreteket ölt, degeneratív folyamatokat indukálhat az érfalban [38].

Kérdés, hogy vannak-e olyan receptorok a keringési rendszerben, amelyek az artériák hullámcsillapító funkciójával arányos változásokat érzékelik, s így közreműködhetnek ennek szabályozásában. Feltételezésünk szerint a fázisos baroreceptorok az aorta-ívben és sinus caroticusban betölthetnek ilyen szerepet, mivel ezek tulajdonképpen a pulzáló nyomásváltozás sebességére érzékenyek („rate-sensitive" receptorok), ez a sebesség (a pulzushullám meredeksége) pedig jelentős részben az artériák hullámellenállásától függ. Elképzelhető tehát, hogy a fázisos baroreceptorok a hullámellenállás optimális szabályozásán keresztül jelentős részben a pulzációs energia minimalizálásának szolgálatában állnak. Az ún. statikus baroreceptorok főleg a kisebb frekvenciájú középnyomásingadozások minimalizálása érdekében működnek [6, 11]. Felvethető annak a lehetősége is, hogy a szimpatikus efferens idegrendszer differenciáltan szabályozza egyrészt a perifériás ellenállást a kisartériák, arteriolák simaizomzatán keresztül (*24. ábra:* $S.I._a$, r_a), másrészt a hullámellenállást a nagyartériák simaizomzatának

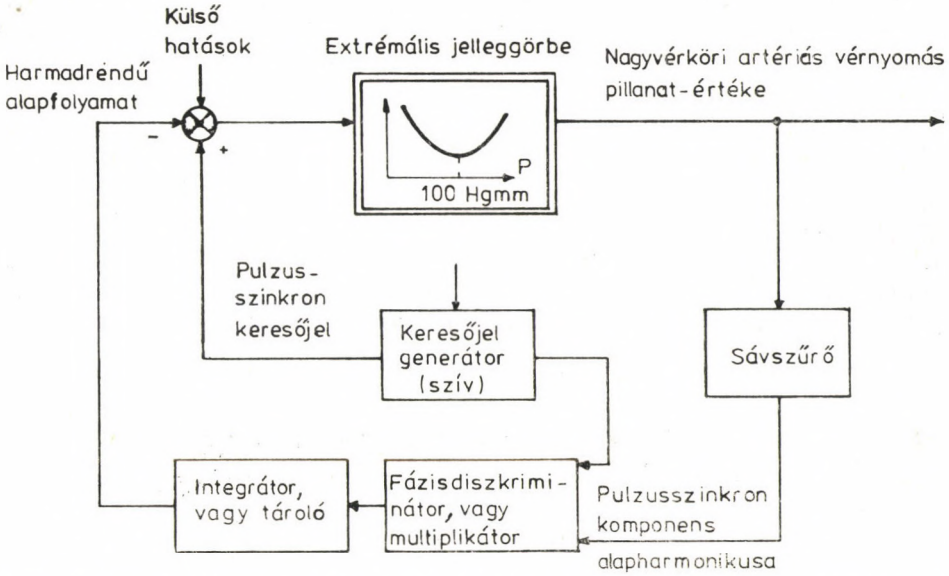
kontrollja révén ($S.I._A$). E feltételezések kísérletes igazolása a jövő kutatásainak feladata.

További, igen fontos kérdés az, hogy a nagyartériák rugalmas tulajdonságainak „short-term" optimális irányítása milyen mechanizmussal történik, s miként van összehangolva az artériás középnyomás szabályozásával. Ilyen összetett szabályozási funkciók teljesítésére alkalmas lehet egy olyan mechanizmus, amely az ún. kényszerlengéses szélsőértékkereső modellel [7, 48] szemléltethető *(25. ábra)*. Ez a típusú szabályozás két, egymással kölcsönhatásban levő egyidejű folyamatra épül. Kereső folyamatként értelmezhető a pulzusszinkron hemodinamika, amely az aktuális munkapontnak az U-alakú (extrémális) jelleggörbén való elhelyezkedésétől függően olyan irányító hatást vált ki, mely az alapfolyamat (feltételezésünk szerint a harmadrendű keringéshullámok) módosításával a munkapontot a jelleggörbe minimumára viszi vissza a külső „zavaró" hatásokkal szemben. Egyik feltétele e működésnek az, hogy az alapfolyamat lényegesen lassúbb legyen, mint a kereső folyamat, s a kettő egymással korreláljon. Láttuk az 1. fejezetben, hogy ez a feltétel a vérkeringési rendszerre nézve teljesülhet. Ugyancsak fontos kritérium, hogy az optimális működés valamilyen módon definiálva legyen a rendszerben, pl. valamely változó egy extrémális jelleggörbe minimumára álljon be. Erre ugyancsak van lehetőség a keringési rendszerben (1—2. fejezet), ugyanis több hemodinamikai jellemzőre nézve ki lehetett mutatni, hogy U-alakú jelleggörbe szerint függnek az artériás középnyomástól, a normál fiziológiás nyomásszinten jelentkező szélsőértékkel (pulzusszinkron vérnyomáshullámok alapharmonikusának amplitudója, sztochasztikus jelösszetevő relatív mennyisége, aktivált simaizomzatú nagyartériák elasztikus válasza, hullámellenállása). A kényszerlengéses optimumkereső szabályozáshoz alapjelképzés nem kell, e modellel így a hagyományos „pressorstat" hipotézis egyik régi problémája, nevezetesen az alapjel és generátorának identifikálása is áthidalható. Természetesen e modell-hipotézis még további sokoldalú alátámasztást igényel, s különösen fontos lenne olyan kísérletes vizsgálatok végzése, melyek lehetővé tennék a *25. ábrán* feltüntetett blokkok funkcionálisan és strukturálisan egyaránt adekvát, pontos leképezését, valamint a kvázistatikus kísérleti körülmények mellett nyert biomechanikai eredmények további, sokoldalú ellenőrzését *in vivo* dinamikus viszonyok esetében. Remélhető, hogy ennek metodikai feltételei a közeljövőben kialakulnak. Bármely irányba vezetnek is azonban az artériás hemodinamika terén folyó kutatások, már most világosan körvonalazódik az a tény, hogy az artériás vérkeringés statikus és dinamikus komponenseinek összehangolt, optimális beállításában a neurohumorális mechanizmusok mellett az ér passzív és aktív mechanikai tulajdonságai ugyancsak alapvető szerepet játszanak.

Összefoglalás

A közlemény áttekintő jelleggel tárgyalja a hemodinamika, valamint a vérkeringésszabályozás néhány új eredményét s aktuális problémáját a szerző és munkatársai közelmúltban megjelent eredeti, kísérletes adatokra támaszkodó közleményei alapján.

Az altatott kutyákban regisztrált short-term *vérnyomáshullámok szerkezeti tulajdonságait* korszerű jelszűrési és jelanalitikai technikákkal tanulmányozták célszámítógépek segítségével. Megállapították, hogy *a)* az egyes pul-



25. ábra. Kényszerlengéses optimumkereső vérkeringésszabályozási modell tömbvázlata. ⊗: különbségképző szerv, *P:* vérnyomás.

Fig. 25. Scheme of a forced oscillation control model optimizing blood pressure. ⊗: error detector, *P:* blood pressure.

zushullám-komponensek U-alakú jelleggörbe szerint függnek az artériás középnyomástól a normális középnyomás környezetében; *b)* a vazomotorikus (harmadrendű) hullámok domináns frekvenciája és amplitúdója szignifikánsan változik a szervezet működési állapotától függően; *c)* szoros dinamikus korreláció van a harmadrendű hullámok és az elsőrendű hullámok egyes összetevői között.

A keringési hullámok struktúra-változásainak megértése, s az élettani szabályozó effektusok hatékonyságának felmérése céljából vizsgálták a nagy- és középméretű *artériák passzív és aktív biomechanikai tulajdonságait* különböző terhelési viszonyok között *in vitro* (és esetenként *in vivo*). Az erek (carotis, iliaca, uterina, lienalis) aktív geometriai válaszainak elemzése során azt találták, hogy a kontrakció értípusonként változó módon függ az intraluminális nyomástól, a maximális válasz azonban mindig a normálisnak megfelelő 90—100 Hgmm alatti értéknél alakul ki. Az aktív elasztikus válasz maximuma viszont a normális és afeletti nyomásszinten jelent meg. A sajátos geometriai és elasztikus válaszok eredményeként az aktivált simaizomzatú erek hullámellenállása U-alakú jelleggörbe szerint függ az intraluminális nyomástól. Diszkutálják a fenti sajátosságok autoregulációs és patológiai konzekvenciáit.

Tanulmányozták az erek nyomásfüggő aktív válaszkarakterisztikáit befolyásoló tényezőket. Megállapították, hogy szubpresszor dózisú *vazopresszin*, továbbá *átmeneti ischaemia* megnöveli az *in vitro* geometriai válasz amplitúdóját, különösen alacsony nyomástartományban. Véleményük szerint a vazopresszin fiziológiás szerepet játszhat az artériák rugalmassága és a perifériás keringési ellenállás szabályozásában. *Emberi, kutya és sertés* carotisok kontrakciós jelleggörbéi közel azonosnak bizonyultak, ezért úgy vélik, hogy a kutya,

s méginkább a sertés artériák aktív biomechanikájának elvi lényege emberre is átvihető. *Fibrotikusan* átalakult érfal rugalmassági modulusa azonos belső nyomás mellett kisebb, mint a normális szöveti képű ereké, disztenzibilitásuk azonban nem különbözik. Lehetséges, hogy a fibrózis kialakulásával párhuzamosan működésbe lépnek a normális rheológiai viszonyok fenntartására irányuló szöveti kompenzáló mechanizmusok is.

Az eredmények alapján felvetik, hogy a kaliber mellett az artériák rugalmassági tulajdonságai is lehetnek „short-term" és „long-term" mechanizmusok szabályozott jellemzői. Javasolják a „szélkazán-erek" helyett az *„impedancia-erek"* elnevezés bevezetését. Hipotézisük szerint az artériás középnyomás, valamint az erek hullámcsillapító funkciójának összehangolt optimális szabályozása történhet *kényszerlengéses szélsőértékkereső mechanizmus* szerint.

Függelék

Deformáció-energiasűrűség (rugalmas energiasűrűség, v. potenciál, W): rugalmas test egységnyi térfogatelemében tárolt visszanyerhető potenciális energia. Belső nyomás alatt álló, rögzített hosszú hengeres cső esetében pl. a következő közelítő összefüggés alapján számítható:

$$W = \sum_{i=1}^{n} \frac{\Delta R_i \cdot P_i}{b_i - a_i},$$

ahol P_i az intraluminális nyomás, a_i és b_i a belső és a külső sugár az i-edik nyomásszinten és ΔR_i a közepes érsugár megváltozása az $(i-1)$-edik és az i-edik nyomásszint között.

Disztenzibilitás (D): a rugalmas cső relatív belső térfogatváltozása egységnyi nyomásváltozás hatására.

$$D = \frac{\Delta V}{\Delta P \cdot V},$$

állandó csőhossz esetén:

$$D = \frac{\Delta a}{\Delta P} \cdot \frac{2}{a} = \frac{2}{E} \cdot \frac{a}{b - a},$$

ahol V: a cső belső térfogata; ΔP: transzmurális nyomásváltozás; a: belső sugár: b: külső sugár; E: tangenciális rugalmassági modulus.

Elasztikus modulus: a mechanikai feszültség és a megnyúlás közötti arányossági együttható, melynek nagysága tulajdonképpen az anyag rugalmas merevségével arányos. Orthotrop, inkompresszibilis falú, nemlineáris rugalmas cső tangenciális-radiális *modulusát (E)* axiális izometria mellett a következő összefüggésből lehet kiszámítani:

$$E = \frac{\Delta P}{\Delta a} \cdot \frac{2a \cdot b^2}{b^2 - a^2},$$

ahol ΔP az intraluminális nyomás változása, Δa pedig a hozzá tartozó belső sugár változása, a: a belső sugár, b: a külső sugár.

Az ún. *dinamikus elasztikus modulussal* (E_{din}) periodikus nyomásterhelés esetére lehet jellemezni a rugalmas cső merevségét, ha olyan kis deformációk lépnek fel, amelyek tartományában az anyag lineáris rugalmasságúnak tekinthető (pl. pulzáló nyomás- és átmérőváltozás a nagyartériákban):

$$E_{din} = \frac{P_n}{\mu_n} \cdot \frac{2a^2 \cdot b}{b^2 - a^2},$$

ahol P_n: a nyomáshullámok n-ik Fourier-harmonikusának amplitudója, μ_n: a radiális irányú külső érfalelmozdulás n-ik harmonikusának amplitudója.

Fourier-analízis (-transzformáció): valamely tetszőleges $f(t) = f(t + nt)$ periodikus függvény közelítése különböző amplitúdójú és fázisszögű szinuszos hullámok összegeként.

$$f(t) = a_0 + \sum_{n=1}^{\infty} \left(a_n \cdot \cos \frac{2\pi n}{T} \cdot t + b_n \cdot \sin \frac{2\pi n}{T} \cdot t \right).$$

Az n-edik harmonikus modulusa (amplitudója) $= (a_n^2 + b_n^2)^{\frac{1}{2}}$.

Hullámellenállás (karakterisztikus impedancia): az oszcilláló-nyomás és-áramlás Fourier-modulusainak hányadosa olyan rugalmas csőszakaszban, amelyet visszavert hullámok nem érnek el. Bizonyos feltételek mellett a hullámellenállás (Z) származtatható a cső rugalmassági modulusából (E) és geometriai adataiból

$$Z = \frac{\varrho}{a^2\pi}\left[\frac{E \cdot (b^2 - a^2)}{4\varrho \cdot b^2}\right]^{\frac{1}{2}},$$

ahol ϱ: az áramló folyadék sűrűsége, a: belső sugár, b: külső sugár.

Kapacitancia-erek: a vérkeringési rendszernek az a szakasza (venulák, vénák), melynek tágíthatósága, azaz az ún. compliance-a nagy az artériákéhoz képest. A compliance (C) definíciója:

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P}.$$

Itt ΔV a csőrendszer belső térfogatának, ΔP pedig transzmurális nyomásának változása.

Korrelációfüggvény: véletlenszerű lefolyású (sztochasztikus) jelek két egymástól különböző időpontban vett értékeinek statisztikus kapcsolatát kifejező időfüggvény. Az *autokorrelációfüggvény* egy $x(t)$ véletlenszerű összetevőt tartalmazó jel két különböző időpontban felvett értékeinek kapcsolatát írja le szorzatuk várható értékével. Definíciója ergodikus folyamat esetére idő középérték elven:

$$\Phi_{xx}(\tau) = \overline{x(t) \cdot x(t+\tau)} = \lim_{T\to\infty} \frac{1}{2T}\int_{-T}^{T} x(t) \cdot x(t+\tau)dt \sim \frac{1}{T}\int_{0}^{T} x(t) \cdot x(t+\tau)\mathrm{d}t = \frac{1}{T}\int_{0}^{T} x(t) \cdot x(t-\tau)\mathrm{d}t.$$

A *keresztkorrelációfüggvény* két, $x(t)$ és $y(t)$ véletlenszerű összetevőt tartalmazó jel két különböző időpontban felvett értékeinek kapcsolatát írja le szorzatuk várható értékével:

$$\Phi_{xy}(\tau) \sim \frac{1}{T}\int_{0}^{T} x(t) \cdot y(t+\tau)\mathrm{d}t = \frac{1}{T}\int_{0}^{T} x(t-\tau) \cdot y(t)\mathrm{d}t\,.$$

Kvázistatikus mechanikai teszt: viszkoelasztikus anyagok rugalmassági jellemzőinek vizsgálata olyan lassan változó mechanikai terheléssel, amely mellett az inerciális erők elhanyagolhatóan kicsik. Kellően kis sebesség esetén a viszkózus erők is elhanyagolhatóak, azaz az anyag viselkedése az egyensúlyi válasszal jó közelítéssel megegyezik.

Mechanikai feszültség: az a felületi (közelható) mechanikai erő (tehát vektormennyiség), amely egy test valamely külső, vagy belső egységnyi felületére hat. Egy tetszőleges irányítású kis felületelemre ható feszültségvektor egyértelműen felbontható a koordináta felületekre merőlegesen és érintőlegesen ható ún. normál, ill. nyiró komponensekre (utóbbiak a nagyartériák falában elhanyagolhatóan kicsik fiziológiás jellegű intraluminális nyomásterhelés mellett). Valamely rögzített hosszú rugalmas cső falában egyensúlyi helyzetben kialakuló átlagos normálfeszültségek a következőképpen számíthatók ki:

$$\bar{\sigma}_\theta = \frac{P \cdot a}{b - a},$$

$$\bar{\sigma}_r = \frac{-P \cdot a}{b + a},$$

$$\bar{\sigma}_x = \frac{P \cdot a^2}{b^2 - a^2} + \frac{T_x}{\pi \cdot (b^2 - a^2)},$$

ahol σ_θ tangenciális, σ_r radiális, σ_x axiális feszültségek és P: intraluminális nyomás, a: belső sugár, b: külső sugár, T_x: axiális húzóerő.

„Short-term" („rapid") vérnyomás kontroll: GUYTON [11] terminológiája a gyors (nagyságrendileg 0,1—100 perc hatásidejű) idegi és hormonális mechanizmusokhoz kötött vérnyomásszabályozásra, szemben a lassúbb („long-term"), vértérfogat- és struktúraváltozásokkal kapcsolatos kontrollal.

Teljesítménysűrűség-spektrum: statisztikus függvény, a sztochasztikus folyamatok korrelációfüggvényeinek Fourier-transzformáltja. Azt fejezi ki, hogy mekkora a folyamat különböző frekvenciájú jelkomponenseinek teljesítmény-sűrűsége. (Az auto-t. s. sp. valós, a kereszt-t. s. sp. pedig — rendszerint — komplex függvény).

Köszönetnyilvánítás

A Szerző köszönetét fejezi ki Szücs Béla villamosmérnöknek és Hudetz Antal fizikusnak a hasznos diszkussziókért és az értékes tanácsokért.

IRODALOM

1. Bagshaw, R. J. and Peterson, L. H. (1972) Sympathetic control of the mechanical properties of the canine carotid sinus. *Am. J. Physiol.*, **222,** 1462—1468.
2. Bergel, D. H. (ed.) (1972) *Cardiovascular Fluid Dynamics.* Academic Press, London Vol. 1,2.
3. Cox, R. H. (1974) Three-dimensional mechanics of arterial segments *in vitro:* methods. *J. Appl. Physiol.*, **36,** 381—384.
4. Cox, R. H. (1976) Effects of norepinephrine on mechanics of arteries *in vitro. Am. J. Physiol.*, **231,** 420—425.
5. Cox, R. H., Fronek, A. and Peterson, L. H. (1975) Effects of carotid hypotension on aortic hemodynamics in the unanesthetized dog. *Am. J. Physiol.*, **229,** 1376—1380.
6. Cowley, A. W., Monos, E. and Guyton, A. C. (1974) Interaction of vasopressin and the baroreceptor reflex system in the regulation of arterial pressure in the dog. *Circulat. Res.*, **34,** 505—514.
7. Csáki, F. (1972) *Modern Control Theories.* Publ. Hous of Hung. Acad. Sci., Budapest.
8. Csáki, F., Szücs, B. and Monos, E. (1975) Engineering and medical applications of statistical data reduction techniques. *In:* Rose, J. (ed.): *Advances in Cybernetics and Systems.* Gordon and Breach Sci. Publ., New York, Vol. III. 867—884.
9. Csengődy, J. and Monos, E. (1978) Does the grafted femoral vein „arterialize"? *In: XI. Internat. Congr. Angiology*, Prague.
10. Folkow, B. and Neil, E. (1971) *Circulation.* Oxford University Press, New York.
11. Guyton, A. C. (1976) *Textbook of Medical Physiology* (5th edition). W. B. Saunders Co., Philadelphia.
12. Hudetz, A. G., Márk, Gy., Monos, E., Szutrély, J. and Kovách, A. G. B. (1977) Biomechanical properties of human cerebral arteries. *In: Proc. Internat. U. Physiol. Sci.*, Vol. XIII. p. 337.
13. Hudetz, A. G., Márk, Gy., Monos, E., Szutrély, J. and Kovách, A. G. B. (1978) Biomechanical properties of hog carotid arteries. *In: XI. Internat. Congr. Angiology*, Prague.
14. Jellinek, H. (ed.) (1974) *Arterial Lesions and Arteriosclerosis*, Akadémiai Kiadó, Budapest.
15. Kline, J. (ed.) (1976) *Biological Foundations of Biomedical Engineering.* Little, Brown and Co., Boston.
16. Koepchen, H. P. (1962) *Die Blutdruckrhythmik.* Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt.
17. Márk, Gy., Hudetz, A. G., Kerényi, T., Monos, E. és Kovách, A. (1978) Normál és fibrosclerotikus artériák biomechanikai tulajdonságai. *Kísérl. Orv. Tud.*, **30,** 540—547.
18. Márk, Gy., Hudetz, A. G., Kerényi, T., Monos, E. and Kovách, A. G. B. (1977) Is the sclerotic vessel wall more rigid really than the normal one? *Prog. biochem. Pharmacol.*, **13,** 292—297.
19. Mc Donald, D. A. (1974) *Blood Flow in Arteries.* Edward Arnold Publ., London.
20. Monos, E. (1974) Blood supply and function of adrenal cortex during hemorrhagic and posthypophysectomy hypotension in dogs. *In:* Glenn, T. M. (ed.): *Steroids and Shock*, University Park Press, Baltimore, U. S. A., 203—209.
21. Monos, E. (1974) Szabályozási rendszerek dinamikája, vérkeringésfiziológiai alkalmazások. *In: A számítógépek és orvosbiológiai alkalmazásuk.* Jegyzet. Semmelweis OTE, 105—140.
22. Monos, E. (1975) Az artéria-fal quasi-statikus és dinamikus tulajdonságainak vizsgálata számítógépi módszerekkel. *In:* Muszka, D. (szerk.): *Számítástechnikai és kibernetikai módszerek alkalmazása az orvostudományban és a biológiában.* NJSzT, Szeged, 287—300.
23. Monos, E. (1977) A nagyartériák biomechanikai tulajdonságai. *In:* Csaba, Gy. (szerk.): *A biológia aktuális problémái* 9. Medicina, Budapest, 73—131.
24. Monos, E., Cox, R. H. and Peterson, L. H. (1973) Effects of vasopressin and norepinephrine on large deformation mechanics of canine arteries *in vitro. Physiologist*, **16,** 399.
25. Monos, E., Cox, R. H. és Peterson, L. H. (1977) Az artéria-fal biomechanikai tulajdonságai és a contractio kapcsolata „fiziológiás" mennyiségű noradrenalinnal és vasopressinnel történő aktiválás esetén. *Kísérl. Orv. Tud.*, **29,** 28—39.
26. Monos, E., Cox, R. H. és Peterson, L. H. (1977) Fiziológiás dózisú arginin-vasopressin direkt hatása az artéria-falra *in vivo. Kísérl. Orv. Tud.*, **29,** 366—374.
27. Monos, E., Cox, R. H. and Peterson, L. H. (1978) Direct effect of physiological doses

of arginin-vasopressin on the arterial wall *in vivo*. *Am. J. Physiol.*, **234**, H 167—172.
28. MONOS, E., COX, R. H. and PETERSON, L. H. (1978) Relationship between biomechanical and vascular reactions during activation by physiological doses of norepinephrine and factors vasopressin *in vitro*. *Acta physiol. Acad. Sci. hung.*, **52**, 11—23.
29. MONOS, E. és CSENGŐDY, J. (1978) Transzplantált és normális vena femoralis nagydeformációs mechanikai tulajdonságai. *MÉT*, Debrecen.
30. MONOS, E., HUDETZ, A. és COX, R. H. (1978) Simaizom aktiválás hatása az arteria iliaca és carotis communis inkrementális rugalmassági tulajdonságaira. *Kísérl. Orv. Tud.*, **30**, 66—73.
31. MONOS, E., KOLTAY, E. and KOVÁCH, A. G. B. (1967) Adrenal blood flow and corticosteroid secretion III: Effect of vasopressin on blood circulation and corticosteroid secretion in the dog, before and after acute hypophysectomy. *Acta physiol. Acad. Sci. hung.*, **31**, 149—157.
32. MONOS, E. and KOVÁCH, A. G. B. (1977) Biomechanical aspects of active arterial wall responses. *In: Proc. Internat. U. Physiol. Sci.*, Vol. XIII. p. 522.
33. MONOS, E. és KOVÁCH, A. (1978) Átmeneti ischaemia hatása kutya a. carotis communis aktív és passzív nagydeformációs mechanikájára. *Kísérl. Orv. Tud.*, **30**, 281—288.
34. MONOS, E. és SZÜCS, B. (1971) Korreláció-analízis alkalmazása a szív-érrendszer vizsgálatában. *Kísérl. Orv. Tud.*, **23**, 119—127.
35. MONOS, E. and SZÜCS, B. (1978) Effect of changes in mean arterial pressure on the structure of short-term blood pressure waves. *Automedica.*, **2**, 149—160.
36. MONOS, E. és SZÜCS, B. (1978) Vérnyomáshullámok szerkezetének változásai kutyában az artériás középnyomás függvényében véreztetés esetén. *Kísérl. Orv. Tud.*, **30**, 136—148.
37. NAKANO, J. (1974) Cardiovascular responses to neurohypophysial hormones. *In: Handbook of Physiology. Endocrinology*. Am. Physiol. Soc., Washington, D. C., Sect. 7, Vol. IV. part 1. 395—442.
38. PATEL, D. J., VAISHNAV, R. N., GOW, B. S. and KOT, P. A. (1974) Hemodynamics. *Ann. Rev. Physiol.*, **36**, 125—154.
39. PETERSON, L. H. (1966) Physical factors which influence vascular caliber and blood flow. *Circulat. Res.*, **18, 19.**, *Suppl. I.*, 1—13.
40. ROACH, M. R. (1977) Biophysical analyses of blood vessel walls and blood flow. *Ann. Rev. Physiol.*, **39**, 51—71.
41. RUSHMER, R. F. (1972) *Structure and Function of the Cardiovascular System*. Saunders, Philadelphia.
42. SHARE, L. (1974) Blood pressure, blood volume, and the release of vasopressin. *In: Handbook of Physiology. Endocrinology*. Am. Physiol. Soc., Washington, D. C., Sect. 7, Vol. IV. part 1. 243—255.
43. SZÁNTÓ, D., MONOS, E. és SZÜCS, B. (1976) Vérnyomásmérők frekvencia-átvitelének egyszerű meghatározása. *In:* MUSZKA, D. (szerk.): *Számítástechnikai és kibernetikai módszerek alkalmazása az orvostudományban és a biológiában*. NJSzT, Szeged, 81—91.
44. SZÜCS, B. és MONOS, E. (1971) Számítógépek és fiziológiai berendezések együttes alkalmazása vérkeringés dinamikai vizsgálatokban. *In:* MUSZKA, D. (szerk.): *Számítástechnikai és kibernetikai módszerek alkalmazása az orvostudományban és a biológiában*. NJSzT, Szeged, 115—123.
45. SZÜCS, B. and MONOS, E. (1973) Nature of pulsatile cardiovascular waves. *In:* IBERALL, A. S. and GUYTON, A. C. (eds.): *Regulation and Control in Physiological Systems*. I. S. A., Pittsburgh, Pa. 341—344.
46. SZÜCS, B. and MONOS, E. (1973) Statistical nature of blood pressure and flow waves. *In: Measurement and Process Identification by Correlation and Spectral Techniques*. IMC, Bradford, 217—222.
47. SZÜCS, B. és MONOS, E. (1975) A vérkeringési rendszer irányítási folyamatainak modellezése. *In:* MUSZKA, D. (szerk.): *Számítástechnikai és kibernetikai módszerek alkalmazása az orvostudományban és a biológiában*. NJSzT, Szeged, 191—210.
48. SZÜCS, B. and MONOS, E. (1977) Modeling of circulatory control system. *In:* ROSE, J. and BILCIU, C. (eds.): *Modern Trends in Cybernetics and Systems*. Springer-Verlag, Berlin, Vol. 3., 953—962.
49. SZÜCS, B., MONOS, E. and CSÁKI, F. (1975) New aspects of blood pressure control. *In: Proceedings of IFAC 6th Triannial World Congress*, Boston, Mass. U. S. A. 1—10.
50. SZÜCS, B., MONOS, E. and SZUTRÉLY, J. (1973) Comparison of identification methods in the cardiovascular system. *In:* EYKHOFF, P. (ed.): *Identification and System Parameter Estimation*. North-Holland Publ., Co., Amsterdam, 235—238.
51. ZWIENER, U. (1976) *Pathophysiologie neurovegetativer Regelungen und Rhythmen*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

THE ROLE OF HAEOMODYNAMIC FACTORS IN THE REGULATION OF ARTERIAL CIRCULATION

E. Monos

Experimental Research Institute, Semmelweis Medical University, Budapest, Hungary

New data derived from experimental studies of the aouthor and his coworkers on haemodynamic aspects of the regulation of blood circulation, and some actual problems related to the topic are discussed in this paper.

The structural characteristics of blood pressure waves recorded in dogs under anaesthesia were studied by up-to-date data processing techniques (Fourier analysis, auto- and cross-correlation functions, power-density spectrum). It was found that *a)* some individual pulse wave components (1st Fourier harmonic, stochastic signal content) depend on arterial mean pressure in a manner characterized by an U-shaped curve profile in the pressure range of baroreceptor control, *b)* the dominant frequency and amplitude of the vasomotoric (third order) waves are subjected to significant changes depending on the functional state of the organism, and *c)* a close dynamic correlation exists between third order waves and certain components (third order fluctuations of derivative maximum and of absolute value) of the first order waves.

The active and passive biomechanical properties of large and medium size arteries were examined *in vitro* (occasionally also *in vivo)* under different conditions of loading, to obtain more information about structural alternations of circulatory waves and about the efficiency of physiological regulation. Analysis of the active geometric response (diameter reduction) of the examined vessels (carotid, iliac, uterine and splenic arteries) to 0.5 μg/ml noradrenaline has shown that intraluminal pressure had a varying influence on contractions, depending on the type of the vessel, but maximum response always appeared at pressures below the normal 90—100 mmHg arterial range. Conversely, the active elastic response (decrease in incremental elastic modulus under noradrenaline) always reached the peak value at normal and higher pressure levels. As a result of the special geometric and elastic responses, the characteristic impedance of the vessels with activated smooth muscle depends on the intraluminal pressure in a manner characterized by an U-shaped curve profile. The impact of the above features on autoregulation and on pathological events is discussed in detail.

The factors influencing the pressure-dependent characteristics of vascular responses (hormonal interactions, transient hypoxia, species-dependence, fibrosclerotic processes, „arterialized" veins) were also studied. Subpressor dose of vasopressin and also transient ischemia accounted for an increase in the amplitude of *in vitro* geometric response, especially in the low (subnormal) intraluminal pressure range. From this and other observations a probable physiological role of vasopressin in the regulation of arterial elasticity and peripheral circulatory resistance was implied. The contraction curves for human, canine and pig carotid arteries had practically identical profiles, suggesting that the principles of active biomechanics of dog or, rather pig arteries, may well apply also in humans. Fibrotic vessels (fibrosclerotic human cranial arteries, dog vein grafts transplanted into arteries) exhibited a lower elastic modulus at identical intraluminal pressure than vessels with histologically normal wall structure, but no difference was found in distensibility. Probably some compensating mechanism directed at maintenance of normal rheological conditions begin to operate in the wall tissues as fibrosis is progressing.

The foregoing observations suggest that apart from the caliber, the elastic properties (elastic modulus distensibility, characteristic impedance) of the arteries might also represent controlled variables of short-term and long-term regulatory mechanisms. It is proposed that the term „Windkessel" arteries be altered to „impedance vessels". The theory is advanced that the coordinated optimal regulation of arterial mean pressure, and of the wave damping function of arteries might follow the rules of a forced oscillation type optimizing system.

Biológia, **26**, 1978, 77—86.

PATKÁNY EMBRIÓK HIPOTALAMUSZÁBÓL KIALAKÍTOTT AGGREGÁTUMOK „LONG-TERM" TENYÉSZTÉSE ÉS PROSZTAGLANDIN TERMELÉSE *IN VITRO*

GYÉVAI ANGÉLA
MTA Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézet, Budapest

Beérkezett: 1977. november 9-én

Kulcsszavak: hipotalamusz-tenyészet, szinaptogenezis, prosztaglandin riliz.

Bevezetés

Célunk olyan hipotalamusz-tenyészetek előállítása volt, amelyek alkalmasak lehetnek a különböző rilizing hormonok szintézisének, kibocsátásának és e folyamatokat szabályzó tényezőknek a vizsgálatára. Mivel felnőtt állatok hipotalamuszából csak ún. „short term" tenyészetek készíthetők, amelyek egy-két napos túlélés után elhalnak, embrionális patkányok hipotalamuszából indítottuk tenyészeteinket. E tenyészetekkel szemben a következő feltételeket támasztottuk:

1. az embrionális szövetnek differenciálódnia kell úgy, hogy finom-szerkezete hasonlóvá kell hogy váljon a felnőtt patkányok hipotalamusz-szövetéhez,

2. alkalmasnak kell lenniük a tenyészeteknek arra, hogy akár a tápfolyadékot, akár a darabkákat a tenyésztés különböző idejében biokémiai módszerekkel vizsgálni lehessen,

3. legalább 3—4 hétig kell őket úgy fenntartani, hogy bennük számottevő sejtpusztulás ne történjen.

Többféle tenyésztési eljárást próbáltunk ki az elmúlt időszakban. Megállapítottuk, hogy az ún. aggregált tenyészetek azok, amelyekből tekintélyes mennyiségű differenciált hipotalamusz-szövet nyerhető a kiindulástól számított 2—3 hét alatt. Ezek a tenyészetek 8—10 hétig is fenntarthatók a degenerálódás jelei nélkül. Az eljárás lényege az, hogy patkány embriók hipotalamuszából sejtszuszpenziót alakítunk ki, majd a sejteket reaggregáltatjuk. Tudomásunk szerint ezt az eljárást hipotalamusz-tenyészetek előállítására elsőként alkalmaztuk. A hipotalamusz izolált sejtjei reaggregálódás után oly mértékben differenciálódnak, hogy finom-szerkezetük a felnőtt állatok hipotalamuszának finom-szerkezetére emlékeztet. A darabkák immunoaktív prosztaglandin E_2-t szintetizálnak és adnak le a tápfolyadékba. A spontán kibocsátott PGE_2 mennyisége a differenciálódás folyamán fokozatosan csökkent. A megbeszélésben e prosztaglandin feltételezett szerepét tárgyaljuk a hipofízis hormonok befolyásolásában az ontogenezis folyamán.

Anyag és módszer

Tenyésztési eljárás

17—19 napos patkány embriók hipotalamuszát az agyalapról úgy távolítottuk el, hogy egy vágást ejtettünk az n. opticusok magasságában, egy másikat a mammilláris testek előtt. Ezután a hipotalamuszok csipesszel könnyen eltávolíthatók a talamusztól és az agykéregtől. Az agyhártyákat eltávolítottuk, a hipotalamuszokat MEM F—15 szintetikus tápfolyadékban apró darabkákra vágtuk és 4 °C-on tartottuk addig, míg az összes, alkalmanként 50 – 60 hipotalamuszt összegyűjtöttük. Ezután a darabkákat Ca^{++} és MG^{++} mentes Hanks oldatban mostuk 4 – 5-ször, a felülúszókat elöntöttük és a darabkákat friss Hanks oldatban 20 percre 37 °C-os termosztátba helyeztük. Húsz perc múlva a Hanks folyadékot eltávolítottuk, és a darabkákat 0,1% kollagenáz (Worthington CLS), 0,1% tripszin (Nutritional Biochem Corp.) és 1% csirkesavóból álló keverékbe tettük, majd 20 percig 37 °C-on inkubáltuk. Ezután a darabkákat a fenti emésztőkeverékben 30 percig forgómágnessel kevertük, a szabaddá váló sejteket centrifugacsőbe tettük és 800 ford/perccel centrifugáltuk 10 percig. A felülúszót leöntöttük és a sejteket reszuszpendáltuk MEM F—15 kémiailag deffiniált tápfolyadékba, amely 600 mg% glukózt, 20% fetális borjúsavót (Bio-Cult) és 20 mE/ml inzulint (Sigma) tartalmazott. A sejtszuszpenziót, amely $1—2 \times 10^6$ sejtet tartalmazott milliliterenként, 25 ml-es Erlenmayer lombikokba osztottuk szét úgy, hogy mindegyik lombikba 3 ml szuszpenzió került. A lombikok száma esetenként változott, általában 3—4 db volt. A lombikokat levegő és CO_2 95 : 5 keverékkel áramoltattuk át 10 percig és 36 °C vízfürdőben rázógépbe helyeztük. A sejtszuszpenziót ezután folyamatosan ráztuk 70/perc frekvenciával. Három nappal a kiültetés után a reaggregált darabkákat új lombikokba vittük és a tenyészfolyadékot 5 ml, az előbbivel azonos összetételű folyadékkal helyettesítettük. A lombikok továbbra is vízfürdős rázógépbe kerültek, és a tenyésztés egész folyamán 70/perc frekvenciával rázattuk őket. A tenyészetek mosása ezután 48 óránként történt. A tenyésztés 14. és 56. napján meghatároztuk a tenyészetek tápfolyadékának prosztaglandin-E_2 tartalmát, ill. a tenyészetekről leöntött tápfolyadékokat hipofízis monolayer tenyészetekhez adtuk, és mértük a hipofízis tenyészetek prolaktin termelését. 24 órával a tápfolyadékokból történt prosztaglandin meghatározás előtt, ill. mielőtt a hipotalamuszokról leöntött tápfolyadékokat hipofízis monolayer tenyészetekhez adtuk, a tápfolyadékból a szérumot és az inzulint kihagytuk.

Elektronmikroszkópos technika

A tenyészetekből különböző időben darabkákat vettünk ki és 2 óráig 2,5% kakodilát-pufferben oldott glutáraldehidben fixáltuk őket szobahőn. Majd 1% OsO_4-ben utánfixáltuk 30 percig. Acetonos vízteleníté után a darabkákat Epon-Araldita ágyaztuk. Ultravékony metszeteinket Porter Blum MT 1 mikrotommal készítettük, és a metszeteket uranilacetátos kontrasztozás után Philips EM 300 mikroszkópban vizsgáltuk.

Hipofízis tenyészeteinket a már korábban leírt [34] módszer szerint készítettük. A tripszinnel izolált hipofízisekből aliquotokat vettünk ki és 500 000 sejtet ültettünk egy-egy 35 mm-es Petri-csészébe. A tenyészeteket, amelyek

2 ml 199 kémiailag deffiniált tápfolyadék és fetális borjúsavó (Bio-Cult) 8 : 2 arányú keverékében nőttek, 8 napon keresztül másodnaponként mostuk és a 8. napon a különböző ideig tenyésztett hipotalamuszok, szérum-mentes tápfolyadékával kezeltük őket 24 óráig.

*A prolaktin meghatározása radioimmunoassay-vel történt**

A reagenseket a Rat Pituitary Hormone Distribution Program keretében a National Institute of Health-től (Bethesda) kaptuk.** Prolaktin standardként NIAMD patkány-prolaktin-2 preparátumot használtunk. Ennek biológiai aktivitása 30 NE/mg szikzacskó. Az anti-szérumot nyúlban preparáltuk. Referencia preparátumként a NIAMD patkány-prolaktin RP—L-t használtuk, amelynek biológiai aktivitása 11 NE/mg deciduoma volt. Minden preparátumot liofilizálva tároltunk és csak használat előtt oldottuk őket. A jódozást GREEN WOOD és HUNTER [13] módszere szerint végeztük. A végső tisztításhoz Sephadex G—75 oszlopot használtunk. Minden mintát 1 : 100 hígítottunk és egy-egy csőbe a meghatározáshoz 100 μl-t használtunk fel. Nem történt korrekció a nem specifikus plazma-kötésre, mivel ezek a minták nem plazmából származtak.

A prosztaglandin-E_2 meghatározást radioimmunoassay-vel végeztük.*** A tápfolyadékot savanyítottuk 0,1 N HCl-dal úgy, hogy a pH 3,5 legyen. 1000 cpm ^{3}H – PGE_2-t adtunk a mintákhoz (New England Nuclear) és 2 × 5 ml etilacetáttal extraháltuk őket. Az organikus fázist N_2-ben szárítottuk és reszuszpendáltuk benzil-etilacetát-metanol 60 : 40 : 2 keverékében, majd a mintákat sziálsavas oszlopra vittük [6]. Ezen az oszlopon a PGA és a PGE jól elváltak egymástól. A két típust ezután PGB-vé alakítottuk úgy, hogy a mintákat 40 percig szobahőn 1 ml 0,1 N metanolos KOH-dal inkubáltuk lúgos pH-n. Miután a PGB kialakult, a folyadékokat savanyítottuk és újra extraháltuk kloroform— víz keverékében. Az organikus fázist nitrogénben evaporáltuk és pH 7,4 tris-izozselatinnal reszuszpendáltuk. Ennek 50 és 100 μl-éből történt a radioimmunoassay. A RIA-hoz ^{3}H-PGB_1-t és -pGB_1 elleni antiszérumot használtunk. Egy órás 37 °C-on történt inkubáció után a mintákat dextrános-szénnel hoztuk össze, amely a kötött és szabad antigént elválasztotta egymástól. Centrifugálás után a felülúszót folyadék szcintillációs spektrométerben mértük [6].

Eredmények

A sejtszuszpenzióból az aggregátumok 2—3 napon belül alakultak ki. A darabkák nagysága 2 – 3 napon keresztül nőtt, jelezve, hogy bennük sejtszaporodás történik. Annak ellenére, hogy a sejt „viability" teszt, amelyet tripán kékkel végeztünk, azt jelezte, hogy a sejteknek kb. csak 5 6%-a szenvedett sérülést, a sejtszuszpenzió 20—25%-a soha nem aggregálódott, bár többféle

* Köszönetet mondunk a NIH-nek a reagensekért.
** A prolaktin meghatározásért köszönetet mondunk D. LAKATUA-nak (Minneapolis, St. Paul Ramsey Hospital).
*** A prosztaglandin meghatározásért köszönetet mondunk W. DOUGLAS-nak (Lake Placid, N. Y., W. A. J. Cell Science Center).

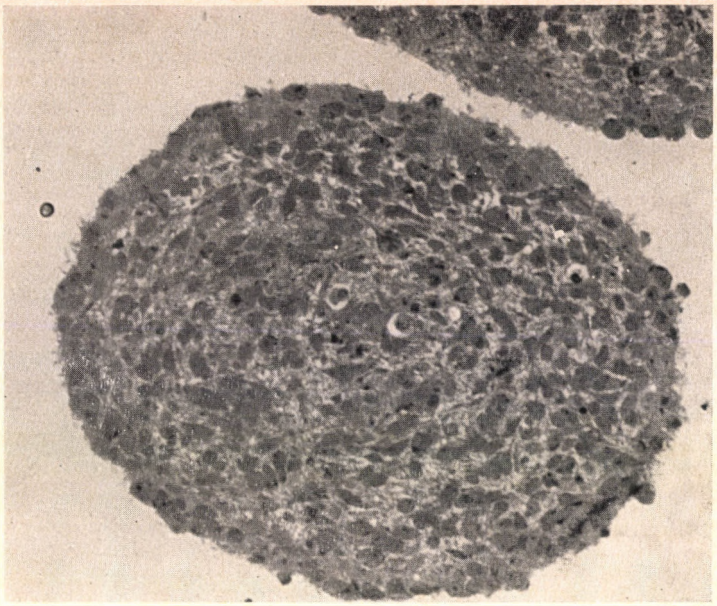
módon próbáltuk eljárásunkat módosítani. A nem reaggregálódó sejtek általában kisebb sejtek voltak és nem mutattak jellegzetes szerkezetet. A reaggregált darabkák szerkezete a korai szakaszokban igen laza szivacsos szerkezetű *(1.A kép)*. A neuropilben csak kevés differenciálatlan szinapszis található *(2.A kép)*. Az idegsejtekben jól fejlett a Golgi-apparátus *(2.B kép)*, bár a sejtek még embrionális jelleget mutattak. A sejtekben viszonylag sok a glikogén. Mielinizáció még nincsen. Három-négy héttel a reaggregálódás után a darabkák belső szerkezete tömötté válik *(1.B kép)*, bennük differenciált idegsejtek, a neuropilben differenciált szinapszisok láthatók. A Golgi-apparátus továbbra is feltűnően fejlett, ugyancsak fejlett a durva felszínű endoplazmás retikulum is. A citoplazmában krisztás szerkezetű mitokondriumok helyezkednek el *(3.A kép)*. A Golgi környékén sok a sötét szélű vezikula, közöttük több elektrondenz anyagot tartalmaz. Lizoszóma-szerű képletek a sejtekben nagy mennyiségben találhatók *(3.B kép)*. A szinapszisok száma nőtt és szerkezetük a felnőtt állatok szinapszisára emlékeztet *(4.A, B, C, D kép)*; a pre- és post-szinaptikus membrán jól fejlett, a preszinaptikus részben számos üres és elektrondenz anyagot tartalmazó vezikulal látható *(5. Akép)*. A preszinaptikus terminálisokban gyakoriak a mitokondriumok. Ezek nagysága 300—500 Å, ill. 700—1200 Å között változik. Axodendritikus és axoszomatikus szinapszisok egyaránt láthatók *(5.B kép)*. A differenciált darabkákban mielinizáció is megfigyelhető. A tenyészetek 8—10 hétig is fenntarthatók lényeges degeneráció és nekrózis nélkül.

A tenyészetek prosztaglandin-E_2 termelését a tenyésztés két különböző időpontjában határoztuk meg. 24 órával a tápfolyadékokból történő prosztaglandin meghatározás előtt a tenyészetek csak kémiailag definiált tápfolyadékot kaptak. Az *első táblázat*unkban öt különböző tenyészet prosztaglandin—E_2 termelését tüntettük fel a tenyésztés egy korai és egy későbbi időpontjában. Adataink szerint az idősebb tenyészeteinkben kevesebb radioimmunoaktív prosztaglandin-E_2 volt kimutatható, mint ugyanezen tenyészetek tápfolyadékából a tenyésztés egy korábbi időpontjában.

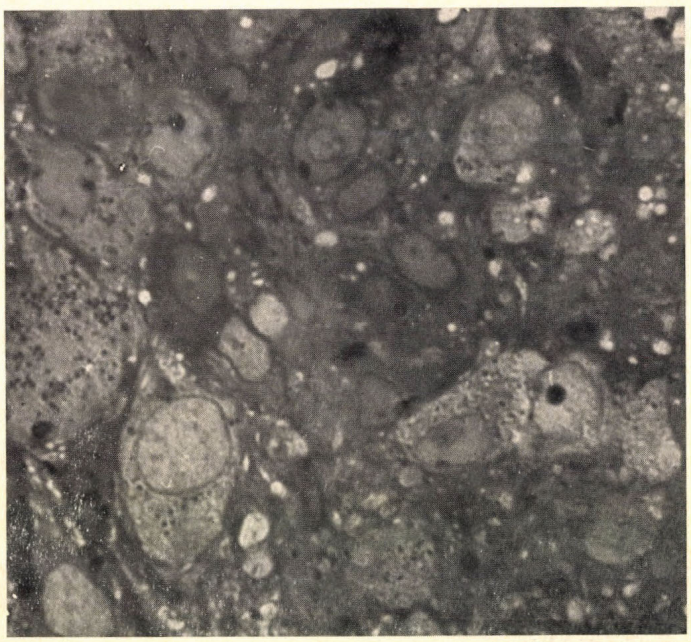
A *második táblázat*unk a tenyészetek tápfolyadékának monolayer hipofízis-tenyészetek prolaktin szekréciójára kifejtett hatását mutatja. A radioimmunoassay-vel mért prolaktin mennyisége változott a kontroll tenyészetek termeléséhez viszonyítva attól függően, hogy idősebb vagy fiatalabb hipotalamusz-tenyészetek tápfolyadékát adtuk a hipofízisekhez. Mivel az emelkedett prolaktin szekréciót a fiatalabb hipotalamusz-tenyészetek tápfolyadékának hozzáadása után mértük, megmértük a kezelésre használt tápfolyadékok prosztaglandin-E_2 tartalmát is. A *3. táblázat*ból kitűnik, hogy stimulált prolaktin termelést a magasabb PGE_2-t tartalmazó hipotalamusz-tenyészetek folyadékának felhasználásakor kaptunk, míg az alacsony prosztaglandin-E_2-t tartalmazó tápfolyadékok adása után csökkent a prolaktin szekréció.

Megbeszélés

Számos adat bizonyítja, hogy a hipotalamusz neuroszekretorikus neuronjain keresztül transzformálódnak az idegi impulzusok endokrin funkciókká. A hipotalamusz irányítja a hipofízis hormonjainak szabadonválását és azt, hogy ezek a hormonok a hipofízistől a megfelelő célszervekhez jussanak. Bár a kutatók többsége állítja, hogy ezeket az irányító, rilizing hormonokat a



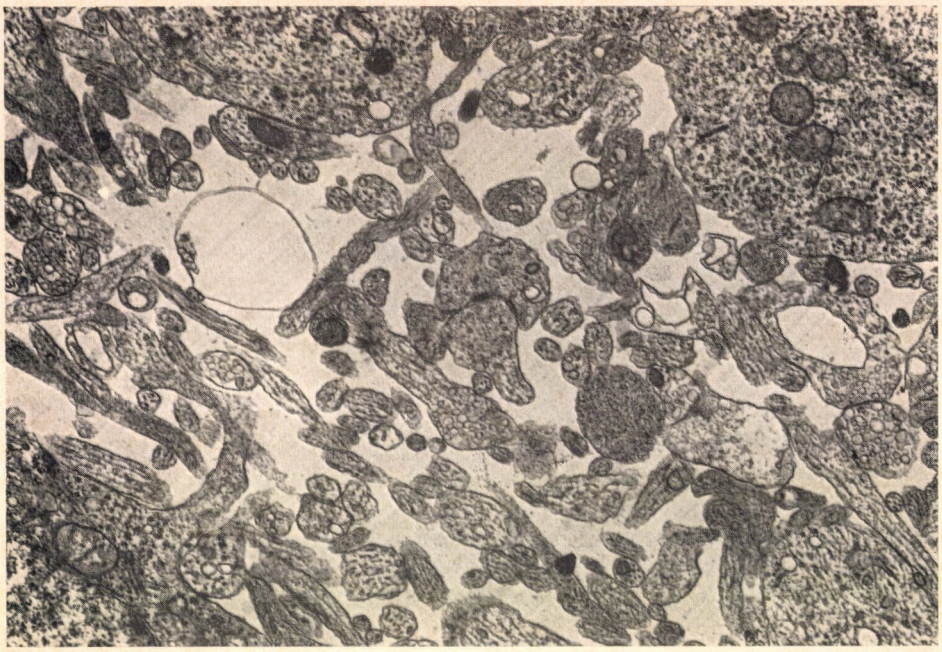
A



B

1. kép. Hat- (*A*), ill. 60- (*B*) napig tenyésztett aggregátumok keresztmetszete. Jól látható a fiatalabb (6 napos) és idősebb (60 napos) darabka szerkezete közötti különbség: a fiatalabb darabka szivacsos, az idősebb tömött szerkezetű. Nekrózis a darabkákban nincsen. Nagyobb nagyítással (*B*) az idegsejtek citoplazmája világos, a mag kromatinban szegény, a citoplazmában a Nissl-féle szemcsék láthatók. Félvékony metszetek toluidinkékkel és Azur II-vel festve. A végső nagyítások kb. 800, ill. 1200 ×.

Fig. 1. Cross section of aggregates cultured for 6 (*A*) and 60 (*B*) days. The young (6-day) and older (60-day) pieces differ considerably, the former exhibiting a spongy, the latter a compact structure. Necrotic change is not seen in either aggregated piece. At a higher power of magnification (*B*) the nerve cells show a light cytoplasm containing Nissl granules, and paucity of nuclear chromatin. Semi-thin sections stained with toluidine blue and Azur II. Final magnifications: about ×800 and ×1200.



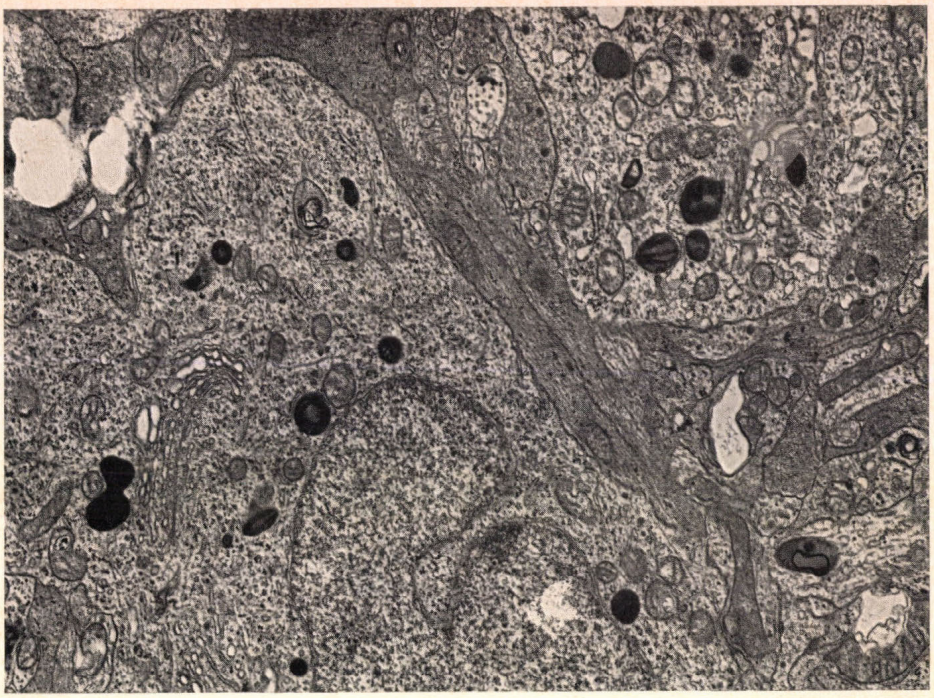
A



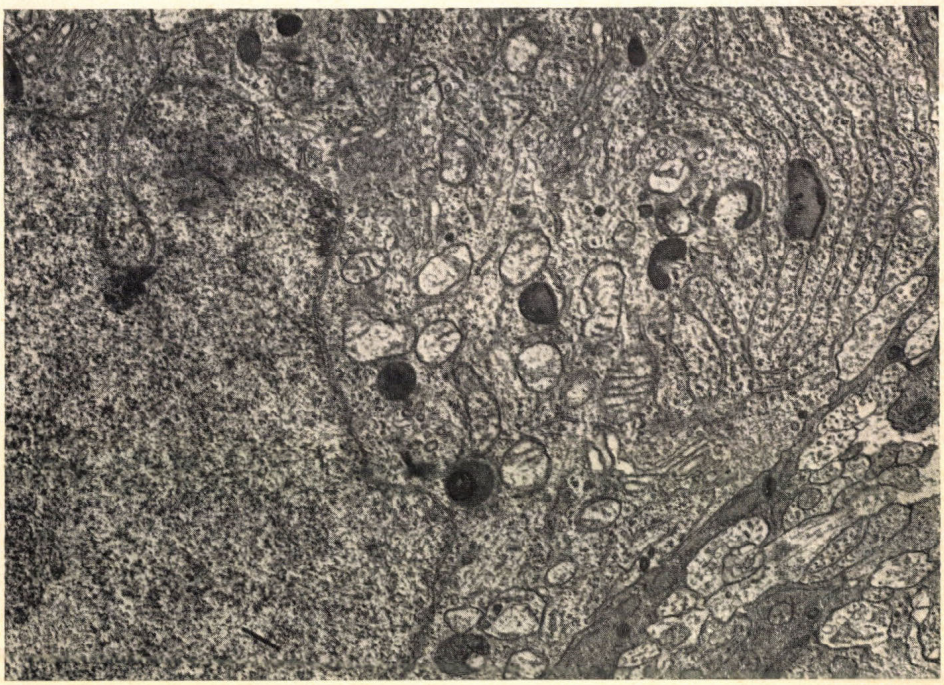
B

2. kép. Tíznapos darabka finom-szerkezete. A neuropil (*A*) szivacsos szerkezetű, laza, szinapszisok csak ritkán láthatók, szerkezetük még differenciálatlan. Az embrionális idegsejtben (*B*) jól fejlett a Golgi-apparátus, a sejtekben kevés a citoplazma. Nagyítás: 10 000×, ill. 18 000×.

Fig. 2. Ultrastructure of 10-day aggregated piece. The neuropil (*A*) shows a loose, spongy structure, synapses are rare and undifferentiated. Note well developed Golgi complex in the embryonic nerve cell (*B*), and paucity of cytoplasm in the aggregated cells. ×10 000; ×18 000.



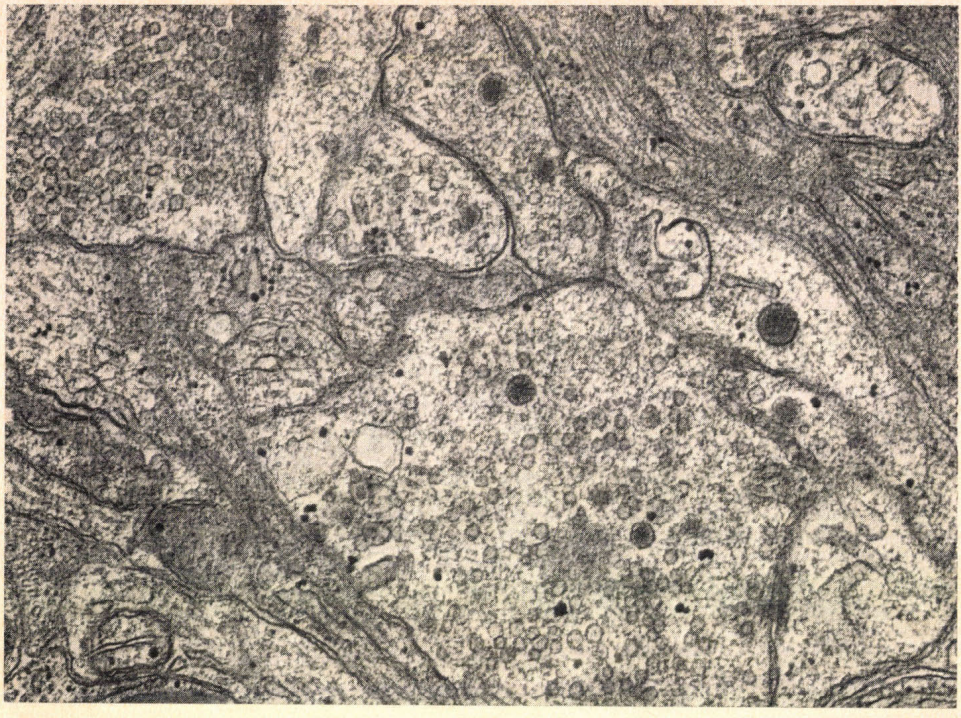
A



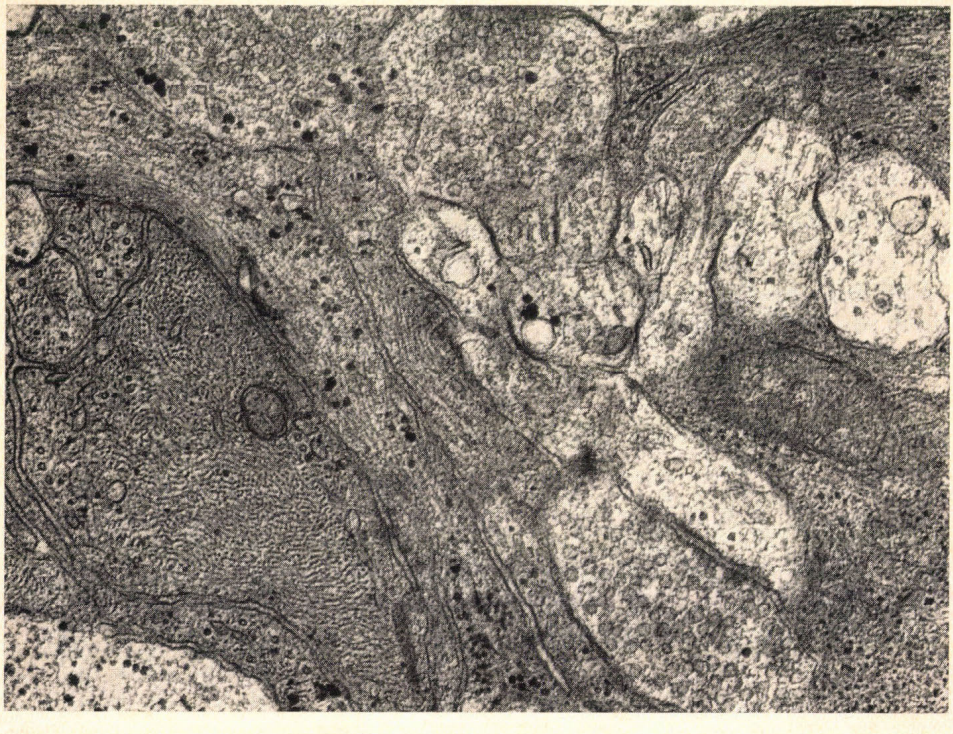
B

3. kép. 57 napos tenyészet finom-szerkezete. Az idegsejtek citoplazmája világos, a Golgi-apparátus jól fejlett, ugyancsak fejlett a durvafelszínű endoplazmás retikulum. Számos krisztás szerkezetű mitokondrium található a citoplazmában. Gyakran elektrondenz testek is láthatók (*A*). Nagyobb nagyítással jól kivehetők a sötét szélű vezikulák (*B*). Nagyítás: 12 000 ×, ill. 16 000 ×.

Fig. 3. Ultrastructure of 57-day aggregate culture. The nerve cells have a light cytoplasm, comprising a well developed Golgi complex, an also well developed rough-surfaced endoplasmic reticulum, and many mitochondria with well defined cristae. Electron dense bodies (*A*), too, are frequently present. The dark-contoured vesicles (*B*) are easily visible at a higher power of magnification. ×12 000; ×16 000.



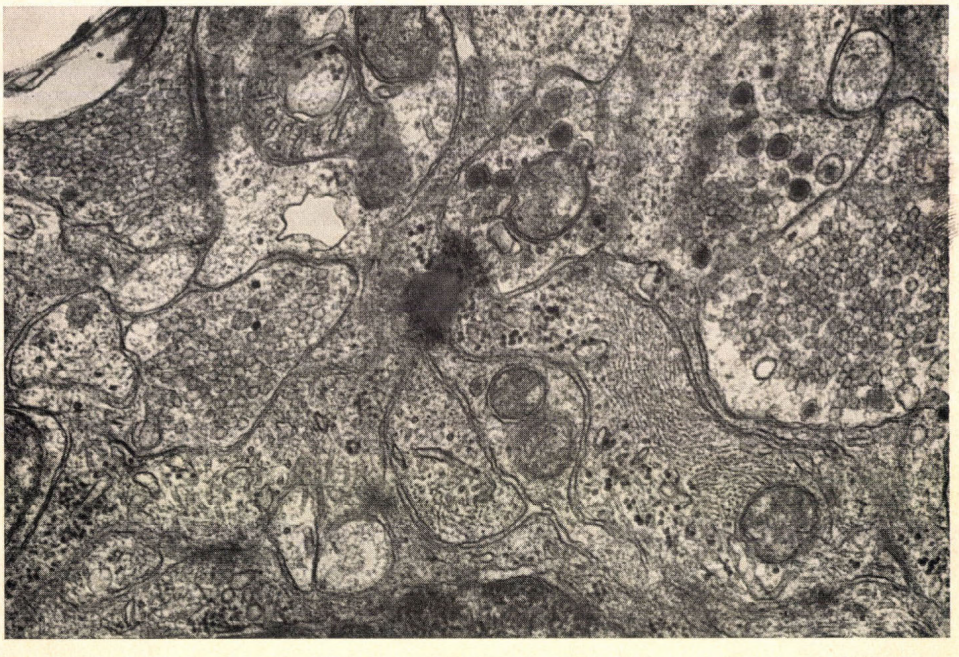
A



B



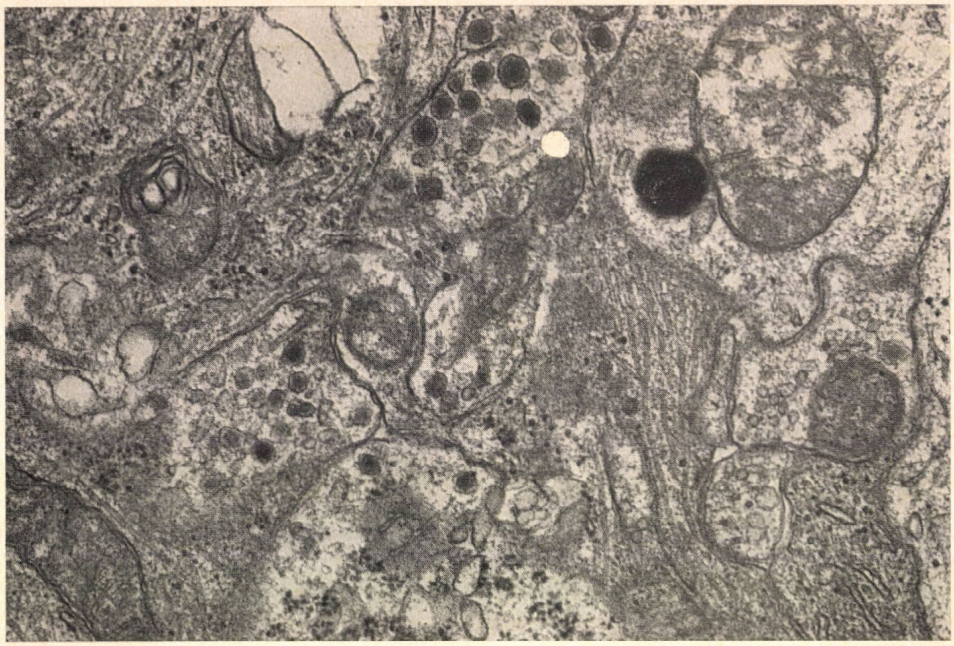
C



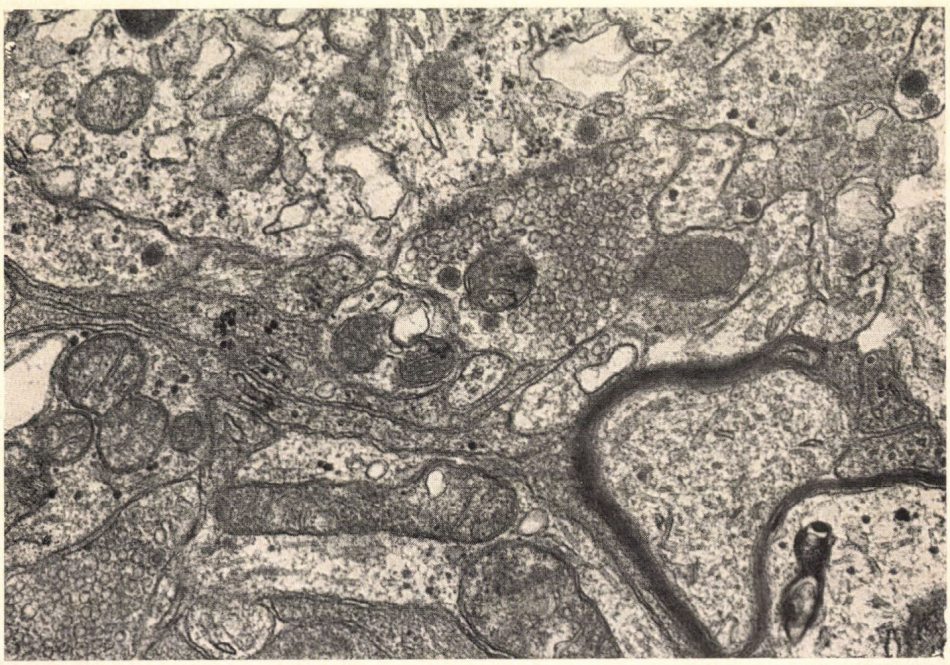
D

4. kép. Szinapszisok egy 65-, (*A*) 58-, (*B*) 70-, (*C*) és 75- (*D*) napos tenyészetből. Szerkezetük már a felnőtt állat differenciált szinapszisát mutatja. Számos vezikula látható a preszinaptikus részben, a pre- és postszinaptikus membrán jól fejlett. Gyakran mitokondriumokat találunk a preszinaptikus végződésben. Szinapszis kristályos elrendeződésű vezikulákkal (*D*). Nagyítások: 40 000×, ill. 55 000×.

Fig. 4. Synapses from 65-, 58-, 70-, and 75-day aggregate cultures (*A*, *B*, *C* and *D*, respectively). The structural details are in every respect similar to the differentiated synapsis of the adult rat. There are many vesicles in the pre-synaptic region, and the pre- and post-synaptic membrane parts are well developed. Mitochondria can be seen in several pre-synaptic terminals. Note synapsis with vesicles ordered in a crystal-like pattern (*D*). ×40 000; ×55 000



A



B

5. kép. 60 napos tenyészetek finom-szerkezete. Agranularis és granuláris vezikulákat tartalmazó idegrostok. Átmérőjük 300—500 Å, ill. 700—1500 Å (*A*). Axodendritikus és axoszomatikus szinapszisok egyaránt láthatók. Az idősebb tenyészetekben mielinizáció is megfigyelhető (*B*). Nagyítás: 50 000×.

Fig. 5. Ultrastructure of 60-day aggregate cultures. The nerve fibres contain agranular and granular vesicles, 300—500 and 700—1500 Å in diameter, respectively (*A*). Both axodendritic and axosomatic synapses can be seen, and in the older cultures myelinization is readily obvious (*B*). ×50 000.

hipotalamusz neuronjai termelik, még ma sem ismert pontosan, hogy *1.* milyen hipotalamusz sejtek felelősek a különböző rilizing hormonok termeléséért, *2.* hogyan szabályozódik a rilizing hormonok szintézise és kibocsátása, *3.* van-e a hipotalamusznak olyan önállósága a rilizing hormonok termelésében, mint a hipofízisnek a hipofízis-hormonok szintézisében és kibocsátásában, és végül *4.* mi az összefüggés a hipotalamikus hormonok termelése és a hipotalamusz morfológiai differenciálódása között az ontogenezis folyamán. Elméletileg egy olyan modell-rendszer, amelyben biztosítva van a hipotalamusz hormonok szintézise és szekréciója hosszabb időn keresztül, lehetőséget nyújthat az említett problémák vizsgálatához.

Hipotalamuszok tenyésztésére vonatkozóan az első pionír munkák 1954-ből származnak [2, 16]. Ezt követően több kutató számolt be sikeres hipotalamusz-tenyésztésről [1, 20, 21, 26, 35, 36, 39, 46], közöttük a legszámottevőbbek Masurovszky és mts-ának 1971-ben [27], valamint Toran—Allerand 1976-ban megjelent munkái [42], akik kimutatták azt, hogy újszülött egerek hipotalamuszából készített anyadarabos tenyészetek hosszú ideig, 6—7 hétig fenntarthatók és bár a darabkák centrális része nekrotizált, a széli részében differenciálódtak az idegi elemek. Ezekből a tenyészetekből csak igen körülményes eljárással lehetséges biokémiai vizsgálatokat végezni arra vonatkozóan, vajon ezek a darabkák aktívak-e a hipotalamikus hormonok szintézise és rilize szempontjából. Az embrionális hipotalamuszokból kialakított aggregátumok ezzel szemben ideális lehetőséget nyújtanak annak eldöntésére, hogy e tenyészetekben történik-e rilizing hormon szintézis, és ha igen, megtalálhatók-e ezek az anyagok a tenyészetek tápfolyadékában. Ha igen, úgy ez a tény a hipotalamusz darabkák spontán hormontermelését támasztaná alá, szemben egy olyan elképzeléssel, amely szerint a rilizing hormonok csak megfelelő elektromos vagy kémiai ingerre szabadulnak fel és szecernálódnak a tápfolyadékba.

Tudomásunk szerint nincsen olyan adat az irodalomban, amely azt igazolná, hogy izolált hipotalamusz-sejtekből olyan aggregált tenyészetek alakíthatók ki, amelyekben tökéletes a morfológiai differenciálódás és több hétig is fenntarthatók. Ezt a módszert korábban más szerzők sikeresen alkalmazták embrionális neurális retina sejtek, valamint különböző embrionális agyterületek (csirke, egér, patkány) sejtjeinek reaggregáltatására [7, 8, 9, 10, 19, 24, 25, 29, 37]. Ezek az aggregátumok a szerzők vizsgálatai szerint biokémiailag oly mértékben differenciálódnak, hogy pl. marker enzimjeik aktivitásai lényegesen magasabbak, mint az ugyanazon szövetből kialakított monolayer tenyészetek enzim aktivitásai [17, 28, 38]. Az aggregáció foka függ az embriók korától, és az agy esetében attól, hogy milyen agyterület sejtjeiről van szó [5, 12, 33]. Kísérleteinkben a terhesség második feléből származó embriókkal dolgoztunk. A 17—19 napos patkány embriók hipotalamusz-sejtjei vizsgálataink szerint 48—72 óra alatt aggregálódtak. Ha az embriók idősebbek voltak, vagy ha újszülött állatokat használtunk, soha nem kaptunk aggregátumokat. A sejtek 20—25%-a nem aggregálódott, bármilyen korú is volt az embrió, de a sejtek alkalmasak voltak arra, hogy belőlük pl. monolayer tenyészetek alakuljanak ki.

A legtökéletesebb differenciálódást azokban a darabkákban figyeltük meg, amelyek átmérője 0,5—0,8 mm volt. Ezekben centrális nekrózis soha nem lépett fel. A darabkák mitotikus aktivitása az első 5—6 nap után leállt és ez kedvezően hatott a differenciálódásra. Három-négy hét alatt a darabkák finom-szerkezete a felnőtt patkányok hipotalamuszának finom-szerkezetével csaknem teljesen azonos volt. Ezek az *in vitro* differenciálódott szövetek, ellen-

tétben a felnőtt állatokból kivett hipotalamusz darabkákkal, heteken keresztül túléltek *in vitro*. A darabkák morfológiai differenciálódása bátorított bennünket arra, hogy megvizsgáljuk, képesek-e ezek a tenyészetek biológiailag aktív anyagok szintézisére és rilizére?

Az utóbbi két-három évben több adat jelent meg az irodalomban, amelyek arra utaltak, hogy prosztaglandinok (E és F) találhatók az idegszövetben, így a központi idegrendszerben is, amelyek spontán diffundálnak ki az agyszövetből és többek között az agyfolyadékban is megtalálhatók [4, 14, 17]. Mivel a prosztaglandinokról közismert, hogy több hipofízis-hormon rilizét befolyásolják [3, 15, 22, 23, 30, 31, 32, 43, 44, 45, 47], elsőként arra akartunk feleletet kapni, hogy a mi hipotalamusz-tenyészeteink termelnek és adnak-e le

1. táblázat

Hipotalamusz-tenyészetek tápfolyadékának PGE_2-tartalma a tenyésztés két különböző időpontjában· [ng/ml/24h]

Table 1. PGE_2-content in the media of hypothalamic cultures at two different times of cultivating. [ng/ml/24 hr]

Tenyészet jele	2 hetes	8 hetes	Nedves súly mg-ban
HT_{20}	0,75	0,064	16
HT_{21}	0,78	0,054	15
HT_{22}	4,6	0,108	35
HT_{22}	3,4	0,01	30
HT_{23}	2,3	0,086	22
HT_{24}	13,0	0,82	60

*radioimmunoassay-vel mérve

prosztaglandinokat a tápfolyadékba? Amint az *1. táblázat*ban látható, a tenyészetek tápfolyadékából prosztaglandin-E_2-t sikerült kimutatnunk. Ennek mennyisége változott attól függően, hogy a tenyészetek milyen idősek voltak. A fiatalabb tenyészetek tápfolyadékában több, az idősebbekében kevesebb prosztaglandint találtunk. A darabkák tehát szintetizáltak és spontán minden stimulus nélkül adtak le PGE_2-t a tápfolyadékba. Az is nyilvánvaló adatainkból, hogy a leadott prosztaglandin mennyisége fordítottan arányos a tenyészetek morfológiai differenciálódásával. Ezek az adatok összhangban vannak még nem közölt vizsgálatainkkal, amelyek szerint az embrionális patkány hipotalamuszok magasabb koncentrációban tartalmaznak prosztaglandinokat (E és F), mint a felnőtt patkány hipotalamuszok. Bár ma még nem állnak pontos adatok rendelkezésünkre arra vonatkozóan, hogy a prosztaglandinok hogyan kapcsolódnak be a hipotalamo-hipofizeális rendszer működésébe, azt már tudjuk, hogy ugyanazon receptor rendszert használják a hipofízisben, mint a valódi rilizing hormonok, nevezetesen az adenilcikláz—cAMP rendszert. Ebből mi arra gondoltunk, hogy a prosztaglandinoknak, többek között szerepük lehet a rilizing hormonok receptorainak kialakításában az ontogenezis folyamán abban az időben, amikor a valódi rilizing hormonok még nincsenek jelen, ill. nem juthatnak el a hipofízisbe, mert még nem alakult ki a portális érrendszer.

2. táblázat

Hipotalamusz-tenyészetről leöntött tápfolyadék hatása hipofízis-tenyészetek prolaktin termelésére [ng/ml/24h]

Table 2. Effect of medium decanted from hypothalamic cultures on prolactin production in cultures developed from pituitary gland [ng/ml/24 hr]

Kontroll tápfolyadék	1,015±6,67% (4)*	
Hipotalamuszról leöntött tápfolyadékok	1. 0,586±6,20% (7)	P < 99,9%
	2. 1,790±6,75% (5)	P < 99,9%

* A tenyészetek száma.

Az értékek az alap és stimulált, ill. gátolt prolaktin szekréció arányát mutatják.

A *2. táblázat*unkban azt tüntettük fel, hogy a hipotalamusz-tenyészetekről leöntött tápfolyadékok hogyan befolyásolják a tenyésztett hipofízisek prolaktin termelését. Az idősebb tenyészetek tápfolyadékával kezelt hipofízisek prolaktin termelése gátlódott, míg a fiatalabb tenyészetek tápfolyadéka stimulálta a prolaktin szekréciót. TAKARA és mtsa szerint [41] 2 μg/ml PGE_2 emeli a növekedési-hormon és a prolaktin szekrécióját fél hipofízisekben, de nem hat az ACTH és az LH szekréciójára. GAUTVIK és mtsa [11] kimutatták, hogy a GH_3 hipofízis-sejtvonalban a prosztaglandinok, többek között a PGE_2, emelik a prolaktin szekréciót. Mások szerint viszont a prosztaglandinoknak nincsen hatásuk sem a prolaktin szintézisére, sem a rilizére [18, 32]. Mivel esetünkben a hipofízis-tenyészetek a hipotalamuszokról leöntött ún. kondicionált tápfolyadékot kapták, nem zárhatjuk ki, hogy a prosztaglandinok mellett más anyag(ok) is közreműködhettek a prolaktin szekréció növelésében. De az a tény, hogy csak a fiatalabb tenyészetekről leöntött tápfolyadékoknak volt stimuláló hatásuk, mégis amellett szól, hogy a radioimmunoassay-vel kimutatott prosztag-

3. táblázat

Összefüggés a hipotalamusz-tenyészetek PGE_2 tartalma és az általuk kiváltott prolaktin szekréció mértéke között.

Kontroll 11,4±0,8 (6)*

Table 3. Correlation of the PGE_2 content of hypothalamic aggregate cultures with the degree of prolactin secretion induced by it in pituitary-derived cultures.

PGE_2 nM-ban /24 h	Prolaktin szekréció, μg/ml/24 h
0,8	8,5
0,77	7,5
0,24	6,8
0,08	6,5
2,22	14,6
2,13	15,9
2,53	16,1
6,53	18,5
9,66	19,9

* Tenyészetek száma.

landin biológiailag aktív volt, és ez is okozhatta a prolaktin növekedését. Azt a tényt, hogy az idősebb tenyészeteinkről leöntött tápfolyadék gátolta a prolaktin akkumulációt a tápfolyadékban, véleményünk szerint azzal lehet magyarázni, hogy a differenciálódás folyamán egy prolaktin-gátló anyag szintetizálódott és adódott le a médiumba, amely abban az időben, amikor a prosztaglandin mennyisége már csökkent, gátolhatta a prolaktin-termelő sejteket. Ez utóbbi feltételezésünket, valamint azt, hogy tenyészeteink szintetizálnak-e valódi rilizing hormonokat is, folyamatban levő kísérleteink hivatottak eldönteni.

Összefoglalás

Tripszinnel izolált embrionális patkány hipotalamusz-sejtekből folyamatos rázással aggregátumokat alakítottunk ki. Ezek az aggregált hipotalamusztenyészetek 2—3 hét alatt morfológiailag tökéletesen differenciálódtak és finom-szerkezetük a felnőtt patkányok hipotalamuszának finom-szerkezetére emlékeztetett. A darabkák folyamatosan szintetizáltak és spontán adtak le PGE_2-t a tápfolyadékba. A leadott PGE_2 mennyisége a darabkák morfológiai differenciálódása folyamán csökkent. A magasabb PGE_2-t tartalmazó tápfolyadékok emelték a tenyésztett hipofízisek prolaktin termelését.

IRODALOM

1. Benda, P., De Vitry, F., Picart, R. and Tixier-Vidal, A. (1975) Dissociated cell cultures from fetal mouse hypothalamus. Patterns of organization and ultrastructural features. *Exp. Brain Res.*, **23**, 29—48.
2. Borghese, E. (1954) Mammalian hypothalamic nuclei cultivated *in vitro*. *Texas Rep. Biol. Med.*, **12**, 215—228.
3. Chobsieng, P., Naor, Z., Koch, Y., Zor, U. and Lindner, H. R. (1975) Stimulatory effect of prostaglandin E_2 on LH release in the rat: evidence for hypothalamic site of action. *Neuroendocrinology*, **17**, 12—17.
4. Coceani, F. (1974) Prostaglandins and the central nervous system. *Archives of Internal Medicine*, **133**, 119—129.
5. Cornet, M., Alliot, F., Pessac, B. and Monsigny, M. (1975) Intercellular adhesion of neuroretina chick embryo cells: enhancement by bovine serum albumin and derivates. *FEBS Letters*, **60**, 290—293.
6. Dunn, M. J., Staley, R. S. and Harrison, M. (1976) Characterization of prostaglandin production in tissue culture of rat renal medullary cells. *Prostaglandins*, **12**, 37—49.
7. Garber, B. B. and Moscona, A. A. (1969) Enhancement of aggregation of embryonic brain cells by extracellular materials from cultures of brain cells. *J. Cell. Biol.*, **43**, 41—42a.
8. Garber, B. B. (1972) Brain histogenesis *in vitro:* reconstruction of brain tissue from dissociated cells. *In Vitro*, **8**, 167—174.
9. Garber, B. B. and Moscona, A. A. (1972) Reconstruction of brain tissue from cell suspensions. II. Specific enhancement of aggregation of embryonic cerebral cells by medium from homologous cell cultures. *Develop. Biol.*, **27**, 235—243.
10. Garber, B. B., Moscona, A. A. (1972) Reconstruction of brain tissue from cell suspensions. I. Aggregation patterns of cells dissociated from different regions of the developing brain. *Develop. Biol.*, **27**, 217—234.
11. Gautvik, K. M. and Kriz, M. (1976) Effects of prostaglandins on prolactin and growth hormone synthesis and secretion in cultured rat pituitary cells. *Endocrinology*, **98**, 352—358.
12. George, J. V. and Rao, K. V. (1977) Rate of aggregation of disaggregated cells. *Indian J. exp. Biol.*, **15**, 174.

13. GREENWOOD, F. C., HUNTER, W. M. and GLOVER, J. S. (1963) The preparation of ^{131}I labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, **89**, 114—123.
14. HAFS, H. D. (1975) Prostaglandins and the control of anterior pituitary hormone secretion. *In: Hypothalamic Hormones*. Academic Press Inc. (London) 183—193.
15. HARMS, P. G., OJEDA, S. R., MCCANN, S. M. (1973) Prostaglandin involvement in hypothalamic control of gonadotropin and prolactin release. *Science*, **181**, 760—761.
16. HILD, W. (1954) Das morphologische, kinetische und endokrinologische Verhalten von hypothalamischen und neurohypophysären Geweben *in vitro*. *Z. Zellforsch.*, **40**, 257—312.
17. HONEGGER, P. and RICHELSON, E. (1977) Biochemical differentiation of aggregating cell cultures of different fetal rat brain regions. *Brain Res.*, **133**, 329—339.
18. HEDGE, G. A. (1977) Roles for prostaglandins in the regulation of anterior pituitary secretion. Minireview. *Life Sciences*, **20**, 17—34.
19. ISHII, K. (1966) Reconstruction of dissociated chick brain cells in rotation-mediated culture. *Cytologia* (Tokyo), **31**, 89—98.
20. MCKELVY, J. F. (1974) Biochemical neuroendocrinology. I. Biosynthesis of thyrotropin releasing hormone (TRH) by organ cultures of mammalian hypothalamus. *Brain Res.*, **65**, 489—502.
21. KNIGGE, K. M., HOFFMAN, G., SCOTT, B. E. and SLADEK, J. R. JR. (1977) Identification of catecholamine and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-containing neurons in primary cultures of dispersed cells of the basal hypothalamus. *Brain Research*, **120**, 393—405.
22. KRAGT, C. L. and BERGSTROM, K. K. (1975) Interactions of prostaglandin E_1 and LRH on anterior pituitary function. *Prostaglandins*, **10**, 833—851.
23. MAC LEOD, R. M. and LEHMEYER, J. E. (1970) Release of pituitary growth hormone by prostaglandins and dibutyryl adenosine cyclic 3'5' monophosphate in the absence of protein synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **67**, 1172—1179.
24. LILIEN, J. E. and MOSCONA, A. A. (1967) Cell aggregation: its enhancement by a supernatant from cultures of homologous cells. *Science*, **157**, 70—72.
25. DELONG, G. R. (1970) Histogenesis of fetal mouse isocortex and hippocampus in reaggregating cell cultures. *Develop. Biol.*, **22**, 563—583.
26. MAKARA, G. B., GYÉVAI, A. and RAPPAY GY. (1976) ^3H—GABA uptake and acetylcholinesterase activity in dissociated cell cultures of medial hypothalamus. *Acta biol. Acad. Sci. Hung.*, **27**, 191—197.
27. MASUROVSKY, E., BENITEZ, H. and MURRAY, M. (1971) Synaptic development in long term organized cultures of murine hypothalamus. *J. comp. Neurol.*, **143**, 263—278.
28. MORRIS, J. E. and MOSCONA, A. A. (1971) The induction of glutamine synthetase in cell aggregates of embryonic neural retina: correlations with differentiation and multicellular organization. *Develop. Biol.*, **25**, 420—444.
29. MOSCONA, A. A. (1973) Cell aggregation. *In:* BITTAR, E. E. (ed.): *Cell Biology in Medicine*, John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 571—591.
30. OJEDA, S. R., JAMESON, H. E., MCCANN, S. M. (1977) Prostaglandin-E_2.-induced growth hormone release-effect of intrahypothalamic and intrapituitary implants. *Prostaglandins*, **13**, 943.
31. OJEDA, S. R., JAMESON, H. E and MCCANN, S. M. (1977) Hypothalamic areas involved in prostaglandin-induced gonadotropin release. I. Effects of PGE_2 and PGF_2 implants on luteinizing hormone release. *Endocrinol.*, **100**, 1585—1594.
32. OJEDA, S. R., JAMESON, H. E. and MCCANN, S. M. (1977) Hypothalamic areas involved in prostaglandin-induced gonadotropin release. II: Effect of PGE_2 and PGF_2 implants on follicle stimulating hormone release. *Endocrinol.*, **100**, 1595—1603.
33. RAKIC, L. L., SIDMAN, R. L. and BARKLEY, D. S. (1972) Genesis of isocortical patterns in aggregates of embryonic mouse cerebrum. *In Vitro*, **7**, 250.
34. RAPPAY, GY., GYÉVAI, A., KONDICS, L. and STARK, E. (1973) Growth and fine structure of monolayers derived from adult rat adenohypophyseal cell suspensions. *In Vitro*, **8**, 301—306.
35. SACHS, H., GOODMAN, R., OSINCHAK, J. and MCKELVY, J. (1971) Supraoptic neurosecretory neurons of the guinea pig in organ culture. Biosynthesis of vasopressin and neurophysin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**, 2782—2786.
36. SAKAI, K. K., MARKS, B. H., GEORGE, J. M. and KOESTNER, A. (1974) The isolated organ-cultured supraoptic nucleus as a neuropharmacological test system. *J. Pharm. exp. Ther.*, **190**, 482—491.
37. SEEDS, N. W. and VATTER, A. E. (1971) Synaptogenesis in reaggregating brain cell culture. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**, 3219—3222.

38. SEEDS, N. W. (1971) Biochemical differentiation in reaggregation brain cell culture. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68,** 1858—1861.
39. SOBKOWICZ, H., BLEIER, R. and MONZAIN, R. (1974) Cell survival and architectonic differentiation of the hypothalamic mamillary region of the newborn mouse in culture. *J. comp. Neurol.*, **155,** 355—376.
40. SUNDBERG, D. K., FAWCETT, C. P., ILLNER, P. and MCCANN, S. M. (1975) The effect of various prostaglandins and a prostaglandin synthetase inhibitor on rat anterior pituitary cyclic AMP levels and hormone release *in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **148,** 54—59.
41. TAKAHARA, J., MORI, M., OFUJI, N., HASHIMOTO, K., YAMAUCHI, J., YAMANE, Y., HOSOGI, H. and OFUJI, T. (1977) Effects of prostaglandin-E_1 and idomethacin on ACTH, prolactin, GH and LH from rat pituitary *in vitro. Endocrinol.*, Japan., **24,** 97.
42. TORAN-ALLERAND, C. D. (1976) Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area *in vitro:* implications for sexual differentiation. *Brain Research.*, **106,** 407—412.
43. WARBERG, J., ESKAY, R. L. and PORTER, J. C. (1976) Prostaglandin-induced release of anterior pituitary hormones: structure-activity relationships. *Endocrinol.*, **98,** 1135-1141.
44. WESTFALL, T. C., KITAY, D. (1977) The effect of prostaglandins on the release of ^{3}H-dopamine from superfused slices of rat striatum following electrical stimulation. *Exp. Biol. Med.*, **155,** 305.
45. DEWIED, D., WITTER, A., VERSTEEG, D. H. G. and MULDER, A. H. (1969) Release of ACTH by substances of central nervous system origin. *Endocrinology*, **85,** 561—569.
46. WILKINSON, M., GIBSON, C. J., BRESSLER, B. H., INMAN, D. R. (1974) Hypothalamic neurons in dissociated cell culture. *Brain Res.*, **82,** 129—138.
47. WYLIE, V. and RIVIER, C. (1977) Effects of a putative hypothalamic CRF and known substances on the secretion of radioimmunoassayble ACTH by cultured anterior pituitary cells. *Abstract on the Endocrine Society 59th Annual Meeting.*

IN VITRO LONG-TERM CULTURING AND PROSTAGLANDIN PRODUCTION OF HYPOTHALAMIC AGGREGATE CULTURES DEVELOPED FROM RAT EMBRYO

Angéla Gyévai

Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

Hypothalamic aggregate cultures were developed from hypothalami taken from rat embryos at 17—19 days of gestation. The cells in reaggregated cultures developed the most significant patterns of differentiation and biochemical analysis was possible either in the culture media or in extracts prepared from the reaggregated pieces. The reaggregated pieces released a substantial amount of prostaglandins into the medium. During differentiation the spontaneously released prostaglandin decreased to a barely measurable level. Media containing a higher PGE_2 concentration enhanced extracellular prolactin accumulation in monolayer cultures developed from adult rat hypophysis. The putative role of this prostaglandin in the discharge of the hypophysis hormones during ontogenesis is discussed.

Biológia, **26**, 1978, 87—97

HIPOFÍZIS HORMONOK ÁTFEDŐ HATÁSA A KÉTÉLTŰEK METAMORFÓZISÁRA

CSERHALMI MÁRIA ÉS CSABA GYÖRGY
Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biológiai Intézete, Budapest

Beérkezett: 1978. március 20.

Kulcsszavak: hormonreceptorok képlékenysége, deformálhatósága, hormonreceptorok érési folyamata

Bevezetés

A magasabb rendű állatokra jellemző hormonok specifikusan hatnak alacsonyabb rendűekben is. Ennek jellegzetes példáját láthatjuk, ha megvizsgáljuk az egyszerű szöveti hormonok — hisztamin, szerotonin — egysejtűek fagocitózisára kifejtett hatását [7], amikor nemcsak, hogy specifikus válasz jelentkezik, de az egysejtű differenciálni tud a szerotonin és közeli rokona, az indolecetsav (növényi hormon) között is. A szelekciós képesség e hormonok és antagonistáik között is fellelhető [8]. Az inzulin és az adrenalin egyaránt fokozza az egysejtű *Tetrahymena* cukorfelvételét, sőt az adrenalin, glukagon és inzulin feltehetőleg cAMP mechanizmuson keresztül hatnak [12]. A planáriák regenerációja is befolyásolható a magasabb rendűekre jellemző hormonokkal [3]. A csigák gonádjai esetében nemcsak a hipofízis-hormonok hatása, hanem ezek átfedése is kimutatható [4, 5]. Mindez arra utal, hogy azok a membránmintázatok, amelyek a magasabb rendűek sejtjeire jellemzőek, alacsonyabb rendűekben, sőt egysejtűekben is jelen vannak, és amennyiben a magasabb rendűekre jellemző hormonokat mesterségesen hozzájuk juttatjuk, akkor a receptor funkciót el tudják látni.

A hormonreceptorok érési folyamaton mennek keresztül [1, 16]. Ez alatt az adott hormon jelenléte a receptor-struktúrák megerősödéséhez vezet, míg a hormonhoz hasonló — a receptorhoz ugyancsak kapcsolódni képes — anyagok jelenléte a receptor deformációját okozhatja.

Kísérleteinkben az alacsonyabb rendű állatok membránmintázatának fentebb ismertetett tulajdonságait, illetve reakcióit kívántuk modellezni az amphibiumok metamorfózisának vizsgálatával. A kétéltűek metamorfózisát ugyanis a tiroxin befolyásolja, és már az ivari periódusban megtalálható egy tireotropin-szerű (TSH) hormon [19]. A gonadotrop-hormon (GTH) viszont alfa alegységében azonos a TSH-val, és csak béta alegysége tér el attól [23]. A metamorfózis alatt érő receptorok szelekciós készségét tehát megvizsgálhatjuk oly módon, hogy GTH kezelést alkalmazunk, és ennek hatását a TSH-val történt kezeléssel hasonlítjuk össze. Ugyanakkor a korai időpontban adott GTH deformálhatja is a fejlődőben levő receptort, és a későbben jelentkező TSH hatását megváltoztathatja [2, 13]. Ezzel választ kaphatunk arra is, hogy a receptor-deformáció a kétéltűekre is érvényes-e.

Anyag és módszer

Kísérleti állatokként *Rana arvalist*, *Pelobates fuscust* és *Xenopus laevist* használtunk fel. Minden egyes kísérleti csoportban 40—40 lárvát vizsgáltunk. Vízcsere 2—3 naponként történt. Figyelemmel kísértük a vízhőfok és szobahőmérséklet változását és rendszeresen mértük a lárvák vizének pH-ját.

Hormonkezelésre tireotrop-hormont (Ambinon, Organon-Oss) és gonadotrop-hormont (Gestyl, Organon-Oss) használtunk fel.

Az egyes állatfajok esetében 9—9 kísérleti csoportot alkalmaztunk, illetve választottunk ki a felhasznált hormonok koncentrációja, valamint a kezelés módja alapján. Jelölésükben az adott hormonok kezdőbetűjét alkalmaztuk. Kisbetűvel jelöltük a korai stádiumban, nagybetűvel a későbbi stádiumban kezelteket. Római számmal különböztettük meg az első, illetve a második kezelési időpontot.

Az egyes kísérleti csoportokban alkalmazott dózisokat és a kezelés rendszerét az *1.* és *2. táblázat* mutatja.

A békalárvák fejlettségi állapotát a *Rana arvalis* és *Pelobates fuscus* esetében a TYERENTYEV beosztása alapján [23], míg a *Xenopus*-lárvák esetében a NIEUWKOOP beosztása alapján [20] állapítottuk meg.

Az első kezelések alkalmával a hormonokat a lárvák vizébe fecskendeztük és 24 óra [6, 15, 18] eltelte után vizet cseréltünk. Második kezelés alkalmá-

1. táblázat

A Rana arvalis és a Pelobates fuscus kísérleti csoportok jelölése.

Table 1. Designation of the *Rana arvalis* and *Pelobates fuscus* groups according to stage of development.

Csoportok jelölése	1. kezelés	Stádium
I/a	0,001 NE/ml TSH	25.
I/g	0,01 NE/ml GTH	25.

Csoportok jelölése	2. kezelés	Stádium
II/A	0,1 NE/ml TSH	27.
II/G	1,0 NE/ml GTH	27.

Csoportok jelölése	1 + 2. kezelés	Stádium
II/a + A	0,001 NE/ml TSH + 0,01 NE/ml TSH	25. és 27.
II/a + G	0,001 NE/ml TSH + 1,0 NE/ml GTH	25. és 27.
II/g + G	0,01 NE/ml GTH + 1,0 NE/ml GTH	25. és 27.
II/g + A	0,01 NE/ml GTH + 0,01 NE/ml TSH	25. és 27.

K: kontroll csoport

2. táblázat

A Xenopus laevis kísérleti csoportok jelölése.

Table 2. Designation of the *Xenopus laevis* experimental groups according to stage of development.

Csoportok jelölése	1. kezelés	Stádium
I/a	0,001 NE/ml TSH	50—51.
I/g	0,01 NE/ml GTH	

Csoportok jelölése	1. +2. kezelés	Stádium
II/a + A	0,001 NE/ml TSH + 0,1 NE/ml TSH	50—51. és 54.
II/a + G	0,001 NE/ml TSH + 10,0 NE/ml GTH	
II/g + G	0,01 NE/ml GTH + 10,0 NE/ml GTH	
II/g + A	kevés lárvaszám miatt nem értékelhető	

Csoportok jelölése	2. kezelés	Stádium
II/A	0,1 NE/ml TSH	54.
II/G	10,0 NE/ml GTH	

K: kontroll csoport
I: irodalmi kontroll csoport

val a *Rana*- és *Pelobates*-lárvák esetében a kezelés időtartama 48 óra volt, és a hormonokat ugyancsak a lárvák vizébe fecskendeztük. A *Xenopus*-lárvák farki izomzatába három alkalommal fecskendeztünk be a hormonokból a második kezelés során.

Adatok feldolgozása

A kontroll csoportban levő lárvák fejlettségét hetente háromszor sztereomikroszkóppal, illetve vizuálisan figyeltük meg. Megfigyeléseinket rajzzal illusztrálva az adott dátumhoz feljegyeztük és a Tyerentyev- és Nieuwkoop-sémákhoz viszonyítottuk. Ennek alapján készítettük el az ún. „békanaptár"-t. Ehhez a békanaptárhoz viszonyítottuk a többi kísérleti csoportban levő lárvák fejlettségét.

A meghatározott napokon történt ún. „stádiumfelvétel" adatait a következő függvénykapcsolat segítségével dolgoztuk fel:

$$\frac{d(ST_t)}{dt} = k(ST_v - ST_t)$$

ahol t a stádiumfelvétel időpontja napokban kifejezve; ST_t a „t" időpontban felvett stádium napokban kifejezve [Ezen napok száma átlagszám, mely az adott körülményektől (vízmennyiség, állatszám, vízhőfok, táp-

lálás, megvilágítás stb.) függ [14]. A felsorolt körülmények szigorú állandóvá tételével ezek, mint függő változók figyelmen kívül hagyhatók. Ezen adatok azonban, csak az általunk biztosított körülmények — feltételek — mellett igazak]; ST_v a maximálisan elérhető stádiumhoz szükséges napok száma; k az átalakulás sebességi állandója.

Az egyenletet megoldva és a „k" sebességi állandót kifejezve:

$$k = \frac{\lg ST_v - \lg(ST_v - ST_t)}{t} \times 2{,}3$$

A meghatározott napokon felvett stádiumok megoszlása az adott kísérleti csoporton belül különböző. A békanaptár alapján megállapítható, hogy az adott stádium alapján a lárvák hány naposnak felelnek meg. Minden egyes kísérleti csoporton belül a különböző stádiumokban levő lárvákra jellemző sebességi állandók kiszámíthatók (k_1, k_2 stb.).

Ha az adott kísérleti csoportban a stádiumfelvétel napján „n" számú lárva van, akkor az adott napra jellemző $k_{átl.}$ sebességi állandó a következő összefüggés alapján számítható ki:

$$k_{átl.} = \frac{n_1 \times k_1 + n_2 \times k_2 + \ldots\ldots\ldots\ldots n_z \times k_z}{n}$$

ahol $n_1 \ldots . n_z$ a különböző stádiumokban levő lárvák száma; $k_1 \ldots . k_z$ a különböző stádiumokban levő lárvákra jellemző sebességi állandók.

Meghatározott idő-intervallumra — átalakulási időtartamra — jellemző sebességi állandót az adott napokra jellemző sebességi állandók ($k_{átl.}$) átlaga adja. Ennek jelölése: K.

Eredmények

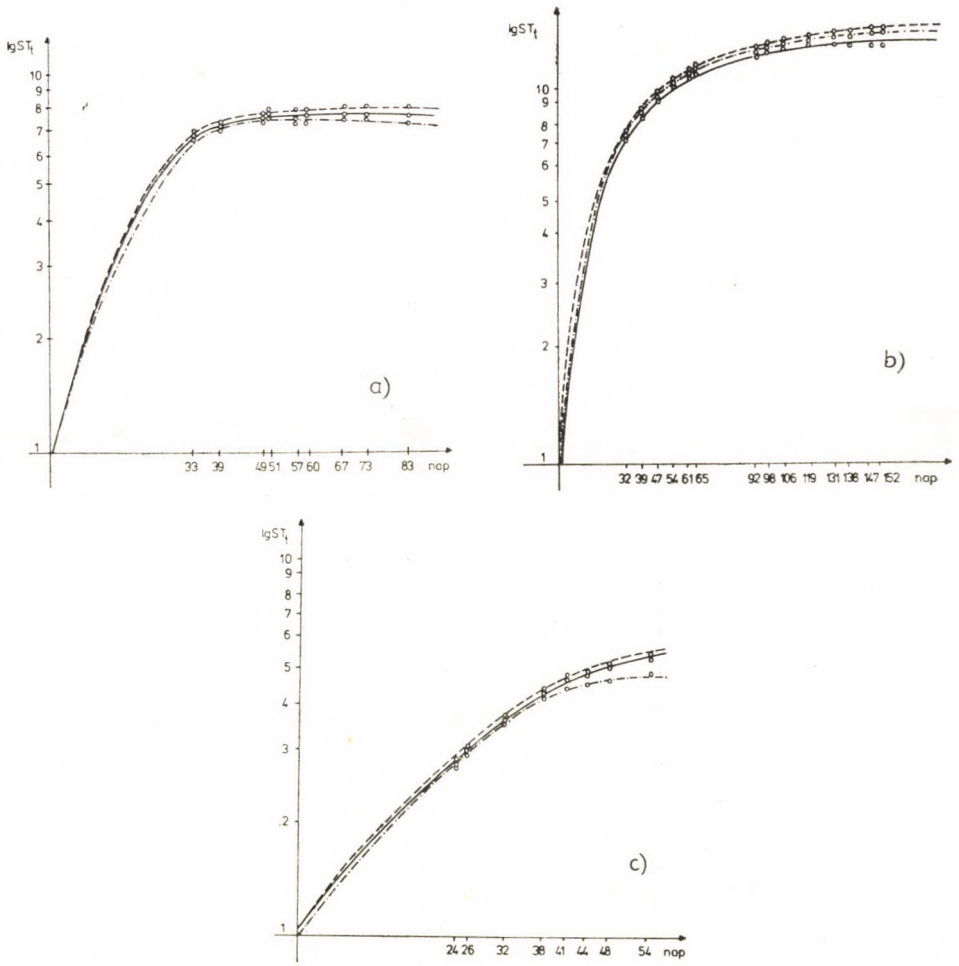
A meghatározott napokon történt stádiumfelvétel adatai alapján kiszámítottuk a — minden kísérleti csoportra jellemző — k sebességi állandókat.

Grafikusan ábrázoltuk a $\lg ST_t$-t az idő függvényében féllogaritmusos papíron *(1., 2., 3. és 4. ábra)*.

Az eredményekből megállapíthatjuk, hogy az első kezelés hatására a 60. napig (Rana-kísérlet esetében), a 120. napig (Pelobates-kísérlet esetében), ill. a 41. napig (Xenopus-kísérlet esetében) lényeges különbség a kontroll és az I/a, I/g kísérleti csoportok között nem volt. A 60., 120., 41. naptól kezdve az I/g csoport fejlődése lelassult.

A Rana- és a Pelobates-kísérletben a II/A, II/G és a K kísérleti csoportok között minimális különbség figyelhető meg. A II/A, II/G, a kontrollhoz képest gyorsabban fejlődött. A Xenopus-kísérletben a leggyorsabban a II/A kísérleti csoport fejlődött, de a kontrollhoz képest a II/G kísérleti csoport is gyorsabb fejlődést mutatott.

A Rana- és Pelobates-kísérletben a II/a+A a kontrollhoz és a II/a+G csoporthoz viszonyítva, kis különbséggel gyorsabban fejlődött; a Xenopus-kísérletben valamennyi kísérleti csoporthoz viszonyítva a II/a+A kísérleti csoport fejlődött a leggyorsabban. A II/a+G csoport a kontrollhoz képest szintén gyorsabban fejlődött.



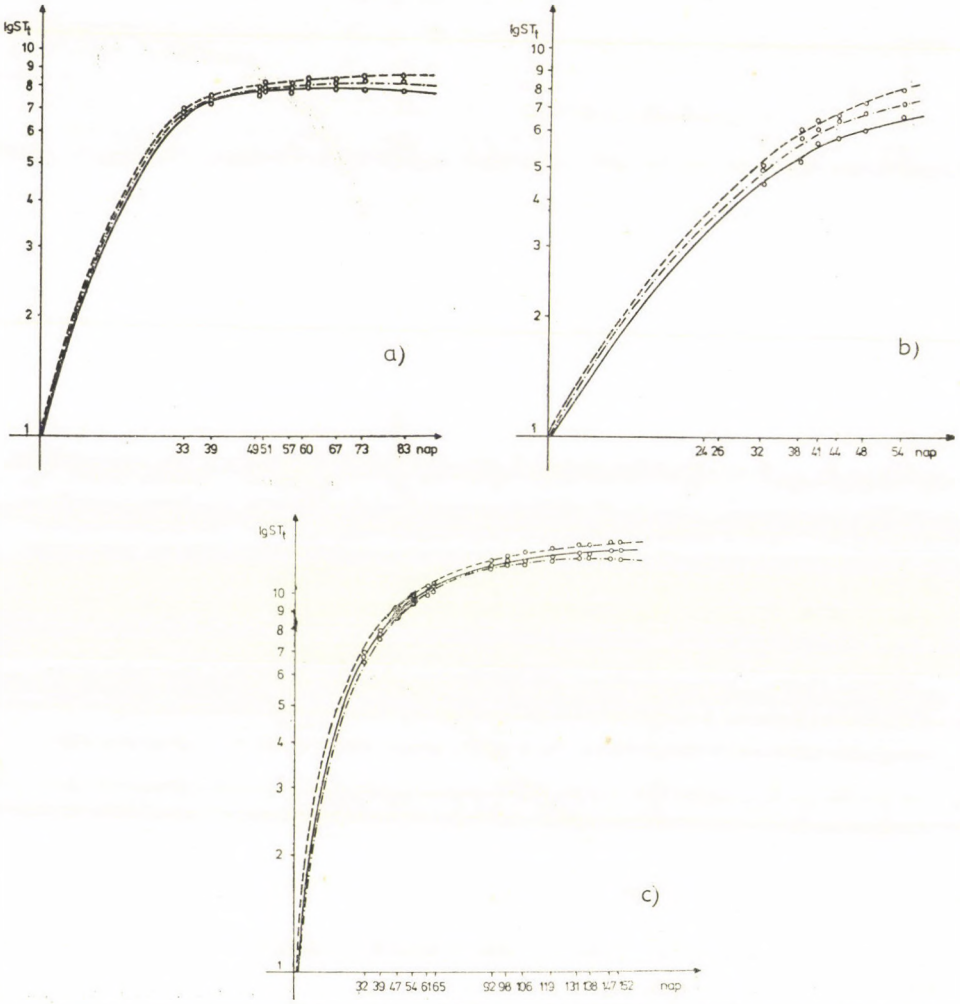
1. ábra. Rana arvalis (a), *Pelobates fuscus* (b) és *Xenopus laevis* (c) metamorfózisának vizsgálata
Az $lgST_t$ ábrázolása az eltelt napok függvényében.
—— kontroll, – – – – I/a, – · – · – I/g

Fig. 1. Study of metamorphosis in *Rana arvalis* (a), *Pelobates fuscus* (b) and *Xenopus laevis* (c).
$lgST_t$ versus time (days).
—— control, – – – – I/a, – · – · – I/g

Legnagyobb különbség a II/g+A, II/g+G és a kontroll csoport között volt. Ezen csoportok a kontrollhoz képest a leglassabban fejlődtek.

Kiszámítottuk az átalakulási időtartamra jellemző sebességi állandókat (K). Ezeket az értékeket ábrázoltuk oszlopdiagramon *(5. ábra)*.

A Rana- és Pelobates- kísérlet eredményeiből megállapíthatjuk, hogy a kontrollhoz viszonyítva a II/A és II/G csoportnak volt a legnagyobb átalakulási sebességi állandója, legkisebb a II/g+G csoportnak. A Xenopus-kísérlet esetében a kontrollhoz viszonyítva a II/a+A és II/A csoportnak volt a legnagyobb átalakulási sebességi állandója.



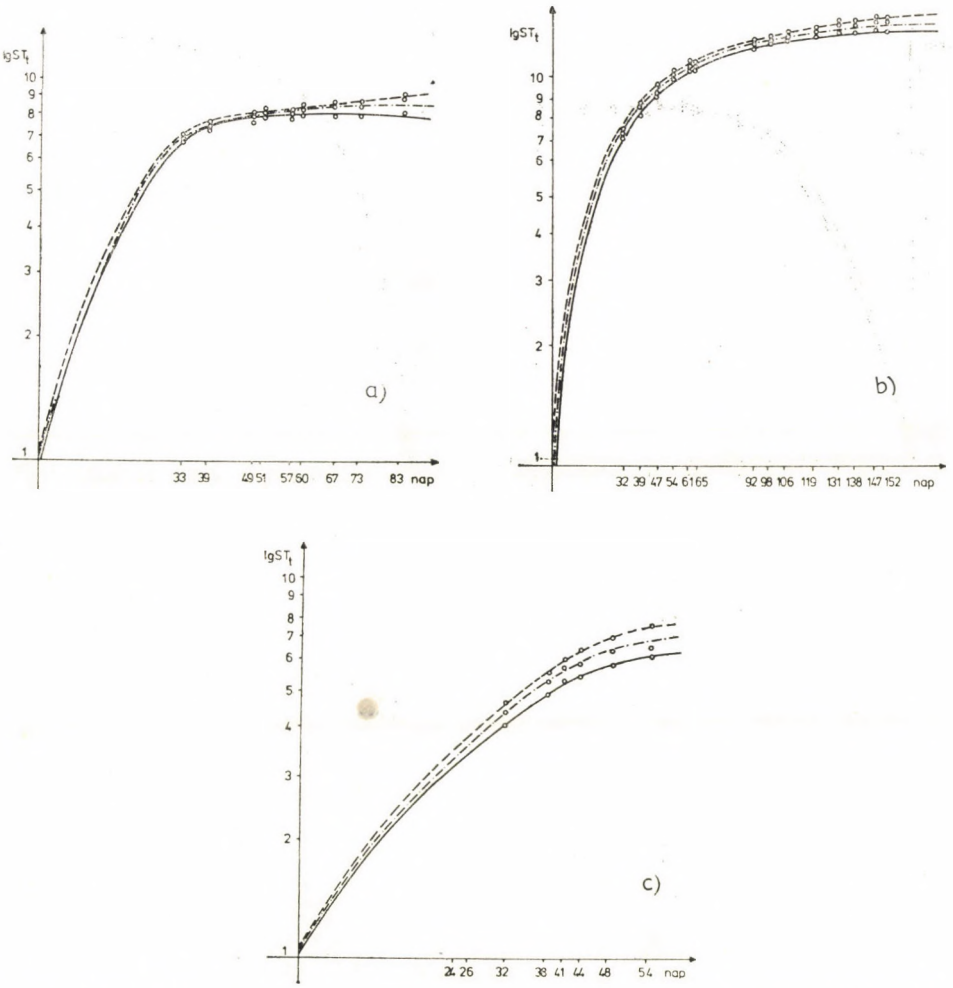
2. ábra. Rana arvalis (a), *Pelobates fuscus* (b) és *Xenopus laevis* (c) metamorfózisának vizsgálata. Az $lgST_t$ ábrázolása az eltelt napok függvényében.
——kontroll, – – – – II/A, – · – · – II/G

Fig. 2. Study of metamorphosis in *Rana arvalis* (a), *Pelobates fuscus* (b) and *Xenopus laevis* (c). $lgST_t$ versus time (days).
—— control, – – – – II/A, – · – · – II/G

Az eredmények megbeszélése

A kísérleti orvostudomány vizsgáló módszerei közül, mint biológiai módszert alkalmazták az ebihalak metamorfózisának vizsgálatát a tireotrop-hormon meghatározásra [22].

Ezeket a vizsgálatokat a 3—5 mm-es hátsó lábhosszúságú ebihalakon végezték. Ez Tyerentyev beosztása alapján kb. a 27. stádiumnak felel meg.



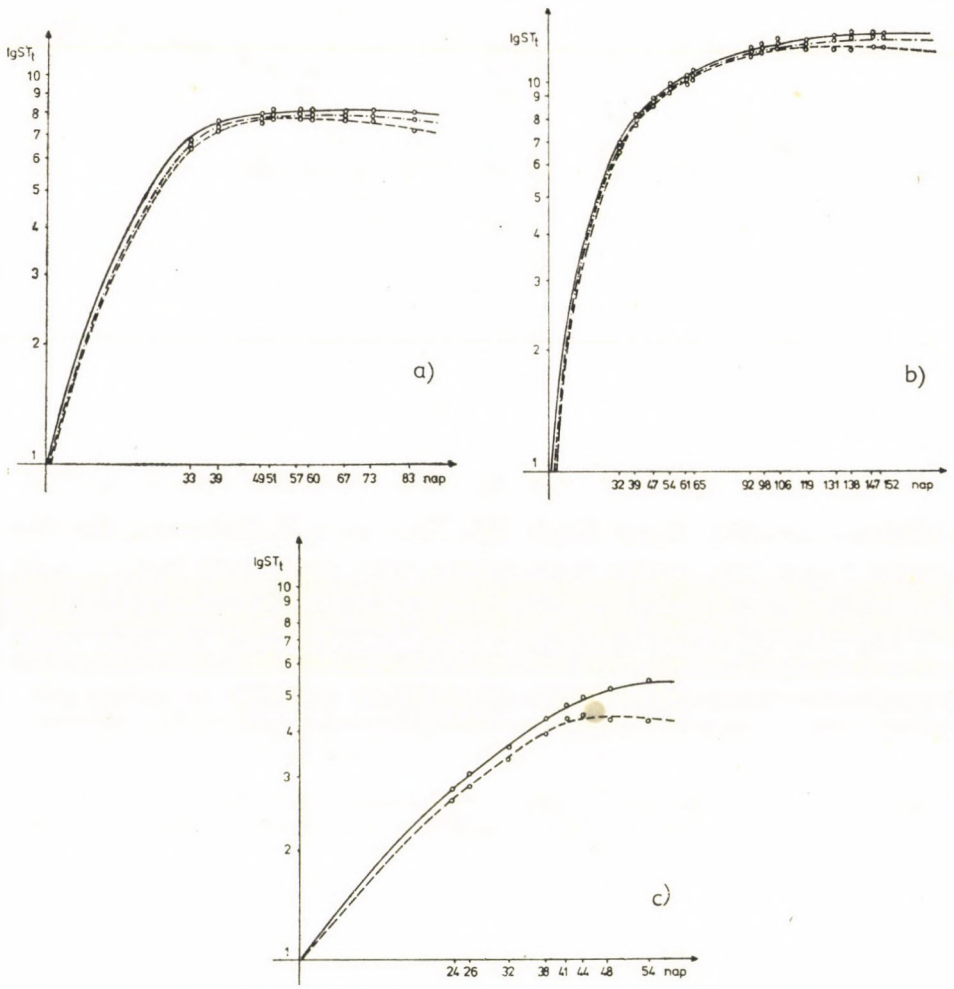
3. ábra. Rana arvalis (a), *Pelobates fuscus* (b) és *Xenopus laevis* (c) metamorfózisának vizsgálata. Az lgST$_t$ ábrázolása az eltelt napok függvényében.
—— kontroll, – – – – II/a+A, – · – · – II/a+G

Fig. 3. Study of metamorphosis in *Rana arvalis* (a), *Pelobates fuscus* (b), and *Xenopus laevis* (c). lgST$_t$ versus time (days).
—— control, – – – – II/a+A, – · – · – II/a+G

Ekkorra már a pajzsmirigyük kialakul, tireotropin-szerű anyag termelése megindul [19], tehát az exogén TSH-ra is fokozott pajzsmirigyhormon termeléssel reagálnak.

Vizsgálataink során először arra kerestünk választ, hogy a korai metamorfózis során a tireotrop-hormon, valamint a gonadotrop-hormon gyorsítja-e az átalakulást, képes-e a pajzsmirigy receptoraihoz kötődni.

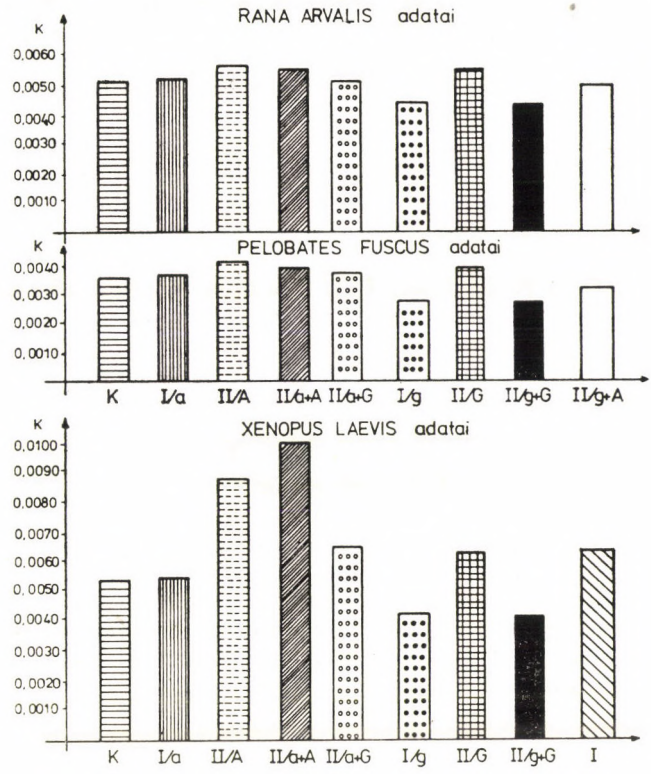
A kapott eredményekből *(1. ábra)* azt a következtetést vonhatjuk le, hogy mind a TSH, mind a GTH a 25. stádiumban (Rana, Pelobates), illetve az



4. ábra. Rana arvalis (a), *Pelobates fuscus* (b) és *Xenopus laevis* (c) metamorfozisának vizsgálata. A $lgST_t$ ábrázolása az eltelt napok függvényében.
——— kontroll, – – – – II/g+G, – · – · – II/g+A

Fig. 4. Study of metamorphosis in *Rana arvalis* (a), *Pelobates fuscus* (b), and *Xenopus laevis* (c). $lgST_t$ versus time (days).
——— control, – – – – II/g+G, – · – · – II/g+A

50. stádiumban (Xenopus) képes volt kötődni a pajzsmirigy receptoraihoz. Ezt mutatja, hogy mindkét hormonnak volt hatása a metamorfózis sebességére: a hormon dózisával összefüggő metamorfózis-gyorsulást kaptunk. A 48 órás kezelés, illetve a farki izomba történt injekciós kezelés eredményeiből *(2. ábra)* azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a 27., illetve az 54. stádiumban sem tud a pajzsmirigy differenciálni e két hormon között, ugyanis a hormon dózisától függő metamorfózis-gyorsulást tapasztalhattunk a kontroll csoporthoz képest.



5. ábra. A fejlődés ütemét tükröző sebességi állandók átlagának (K) ábrázolása oszlopdiagramon.

Fig. 5. Diagrammatic presentation of the mean velocity constants (K) reflecting the rate of development.

Az ismételt kezelés eredményeiből *(3. ábra)* megállapíthatjuk, hogy a korai tireotrop-hormonkezelésnek gátló hatása a további fejlődésre nem volt, sőt az ismételt tireotrop-hormonkezeléssel a kontrollhoz képest metamorfózisgyorsulást figyelhettünk meg. Ugyanakkor a korai gonadotrop-hormonkezelésnek gátló hatása volt a további fejlődésre *(4. ábra)*. Ezáltal feltételezhető, hogy a gonadotrop-hormonkezelés hatására a pajzsmirigy TSH receptorai deformálódhattak, elveszthették érzékenységüket, így az endogén TSH-ra (is) csökkentett módon válaszoltak. A metamorfózis nem gyorsult az ismételt gonadotrop-hormonkezelés hatására sem, noha ebben a stádiumban (27., illetve 54. stádium) ezen hormon „előkezelés nélkül" gyorsította az átalakulást.

Összegezve, az elvégzett vizsgálatokból megállapíthatjuk:

1. A tireotrop-hormon a metamorfózis korai stádiumában is fokozza az ebihalak átalakulását. A korai kezelésnek a fejlődés további alakulására gátló hatása nem volt.

2. A gonadotrop-hormon a fejlődésnek mind a korai, mind egy későbbi szakaszában gyorsította az átalakulást. A korai kezelésnek azonban a fejlődés további alakulására gátló hatása volt.

3. A TSH receptor-struktúrák kialakulása feltehetőleg a 25., illetve az 50. stádiumban már megtörténik. Ennek specifitása azonban még egy későbbi stádiumban sem mutatható ki.

4. A fejlődés korai szakaszában a még érőben levő receptor-struktúrákhoz történő kötődés is eredményezhet specifikus választ.

5. A receptor-struktúra deformálhatóságának kritikus időpontja a fejlődés korai szakaszára tehető és feltehetőleg mindaddig tart, míg a receptor-struktúrák teljesen érett, specifikus struktúrákká nem válnak.

E vizsgálatokból megállapítható, hogy a hormonreceptorok érzékenysége — az adott hormonra specifikus válaszadás — az ontogenezis során alakul ki és tökéletesedik. A fejlődés korai stádiumában a szelekciós képesség még nem tökéletes. Ezért, kémiailag hasonló anyagok között a receptor nem tud differenciálni. Ebből következik, hogy kémiailag hasonló szerkezetű anyagokra hasonló módon reagál. Ugyanez teszi lehetővé, hogy a receptorhoz kapcsolódó idegen hormon az érett korra is kiható „deformáló" hatású.

Összefoglalás

Ebihalak fejlődésének korai és késői stádiumában hipofízis-hormonokkal való kezelésük alapján megállapítható, hogy mind a tireotrop-, mind a gonadotrop-hormon serkenti a metamorfózist. A gonadotrop-hormon korai időpontban alkalmazva gátolni tudja a később adott TSH hatását. Ez valószínűleg a korai időpontban még nem szelektív — képlékeny — receptor deformálódásának a következménye.

IRODALOM

1. Blazquez, E., Rubalcava, B., Montesano, T., Orci, L. and Unger, R. H. (1976) Development of insulin and glucagon binding and the adenylate cyclase response in liver membranes of the prenatal, postnatal and adult rat: evidence of glucagon resistance. *Endocrinology*, **98**, 1014.
2. Csaba, G. (1975) Néhány gondolat a hormonreceptorok filo- és ontogeneziséről. *MTA Biol. Oszt. Közl.*, **23**, 37—44.
3. Csaba, G. and Bierbauer, J. (1974) Investigations on the specificity of hormone receptors in Planarians. *Gen. comp. Endocrinol.*, **22**, 132—134.
4. Csaba, G. and Bierbauer, J. (1975) Universiality of gonadotropic hormone effect. Effect of mamalian FSH on the ovotestis of the snail *Helix pomatia*. *Acta biol. med. germ.*, **34**, 269—273.
5. Csaba, G. and Bierbauer, J. (1977) Overlapping effects of different pituitary hormones on the oogenesis and spermatogenesis of *Helix pomatia*. *Acta biol. Acad. Sci. hung.*, **36**, 201—204.
6. Csaba, G., Darvas, S., and László, V. (1977) Effect of treatment with the plant hormone gibberelline on neonatal rats. *Acta biol. med. germ.* (Közlés alatt).
7. Csaba, G. and Lantos, T. (1973) Effect of hormones on protozoa. Studies on the phagocytotic effect of histamine, 5-hydroxytryptamine and indolacetic acid in *Tetrahymena pyriformis*. *Cytobiologie*, **7**, 361—365.
8. Csaba, G. and Lantos, T. (1975) Specificity of hormone receptors in *Tetrahymena*. Experiments with serotonine and histamine antagonists. *Cytobiologie*, **11**, 1 44—49.
9. Csaba, G. and Lantos, T. (1975) Effect of insulin on the glucose uptake of Protozoa. *Experientia*, **31**, 1097.
10. Csaba, G. and Lantos, T. (1976) Effect of epinephrine on glucose metabolism in *Tetrahymena*. *Endokrinologie*, **68**, 239—240.
11. Csaba, G., László, V., and Darvas, S. (1977) Antagonistic effect of H_1 and H_2 receptors in *Tetrahymena*. *Acta biol. med. germ.* (Közlés alatt).

12. Csaba, G., U. Nagy, S. and Lantos, T. (1976) Are biogenic amines acting on *Tetrahymena* through a cyclic AMP mechanism? *Acta biol. med. germ.*, **35**, 259—261.
13. Csaba, G. and U. Nagy, S. (1976) Plasticity of hormone receptors and possibility of their deformation in neonatal age. *Experientia*, **32**, 651—652.
14. Eichler, V. B. and Gray, L. S. Jr. (1976) The influence of environmental lighting on the growth and prometamorphic development of larval *Rana pipiens*. *Dev. Growth Differ.*, **18**, 177—182.
15. Gellert, R. J., Lewis, J. and Pétra, P. H. (1977) Neonatal treatment with sex steroids: relationship between the uterotropic response and the estrogen „receptor" in prepubertal rats. *Endocrinology*, **100**, 520.
16. Hubbert, W. T. and Miller, W. J. (1974) Immungenetic ontogeny of cellular membrane function: a review. *J. Cell. Physiol.*, **84**, 429.
17. Jenkin, P. M. (1970) *Control of growth and metamorphosis.* Pergamon Press. Oxford.
18. Louret, J. P. and Vaitukaitis, I. L. (1977) Induction of FSH receptors in rat ovaries by estrogen priming. *Nature*, **265**, 407.
19. Lynne, E. and Lipner, H. (1976) Amphibian metamorphosis: the role of thyrotropin-like hormone. *Gen. comp. Endocrinol.*, **29**, 333—336.
20. Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. (1967) *Normal table of Xenopus laevis (Daudin).* North Holland, Amsterdam.
21. Pierce, J. G., Faith, M. R., Giudice, J. R. and Reeve. (1976) Structure and structure-function relationship in glucoprotein hormones. *In: Polypeptide hormones.* Ciba Found. Symp. 41. Elsevier, Amsterdam.
22. Takács, L. (1954) A thyreotrop hormon vizsgálata *In:* Kovács, A. (ed.) *A kísérleti orvostudomány vizsgáló módszerei.* VI. Akadémiai Kiadó, Budapest, 315.
23. Tyerentyev, B. P. (1950) *Ljaguska.* Goszizdat Szovjetszkaja Nauka Moszkva.

THE EFFECT OF PITUITARY HORMONE OVERLAP ON AMPHIBIAN METAMORPHOSIS

Mária Cserhalmi and *G. Csaba*

Institute of Biology, Semmelweis Medical University, Budapest, Hungary

Certain hormones characteristically present in higher animals can also act on lower organisms. The present studies on amphibian metamorphosis were conducted with the aim to model the membrane patterns of unicellular animals, *i. e.* the responses of these to hormones operative in higher organisms. The development and responsiveness of hormone receptors were investigated.

The frogs *Rana arvalis*, *Pelobates fuscus* and *Xenopus laevis* were used as experimental animals, and thyrotropic (TSH) and gonadotropic (GTH) hormones were employed for experimental treatment.

The stage of development of the *Rana arvalis* and *Pelobates fuscus* tadpoles was established on the basis of Terentev's classification, that of Xenopus tadpoles according to Nieuwkoop's system.

It was concluded from the experimental observations that hormone receptor sensitivity, *i. e.* specific responsiveness to a given hormone, is acquired gradually during ontogenetic development. Receptor specificity was incomplete during the early ontogenetic process, to judge from inability of the receptor structures to differentiate between chemically related materials, and consequent similar responses to these. This „deforming effect" exerted on „immature" receptors by non-physiological hormones in early ontogenesis appears to account for decreased sensitivity to the given hormone later in life.

Biológia, 26, 1978, 99—104

A GAMETOGENEZIS REGULÁCIÓJÁNAK KÍSÉRLETES VIZSGÁLATA *HELIX POMATIÁN* A TÉLI ÁLOM VÉGÉN

BIERBAUER JÓZSEF

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biológiai Intézete, Budapest

Beérkezett: 1978. március 13.

Kulcsszavak: Mollusca, endokrin szabályozás, gametogenezis, opticus tentaculum

Bevezetés

A tüdős csigákban a gametogenezis egyetlen gonádban, a hímnős ivarmirigy (glandula hermaphroditica seu ovotestis) follikulusaiban zajlik le. Természetesen az ovogenezis és a spermiogenezis nem folyik le párhuzamosan.

Megelőző munkáinkban a téli nyugvás közepén, majd tavasszal a természetes felébredés idején végzett vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a szemtapogatónak, az opticus tentaculumnak az eltávolítása után egy-két hét múlva a kontrollhoz viszonyítva az ovogenezis sejttípusainak a száma jelentősen emelkedett a hímnős ivarmirigy follikulusaiban az ovogenezis folyamán. Amikor az intakt éti csigákat im. az opticus tentaculum homogenizátumával injekcióztuk, a kontroll csoporthoz viszonyítva a spermiogenezis jelentősen emelkedett [1—9].

Jelen vizsgálatainkat a tüdős csigák egy másik fontos életciklusában a téli nyugvás, a téli álom alatt, pontosan ennek az időszaknak a végén végeztük el.

Anyag és módszer

A kísérleti állatokat a Rákos patak völgyében, a természetes téli környezetben a föld alól ástuk ki március 12-én. A csigákat (*Helix pomatia*, Gastropoda, Pulmonata) a téli álmukból mesterségesen langyos víz permetezésével ébresztettük fel.

A 20 db intakt kontroll állatot és 30 db kísérleti, vagyis a szemi tapogatójától megfosztott éti csigát ismét visszahelyeztük a természetes téli környezetébe, a talaj felszíne alá 3 cm mélyen a földbe.

Két hét eltelte után ismét mesterségesen ébresztettük, majd decapitáltuk az állatokat. Ezután az ovotestisüket kioperáltuk és Zenker ill. Bouin oldat ban fixáltuk. Paraffin beágyazás után belőlük 5μ vastagságú sorozat metszeteket készítettünk. A metszeteket haematoxilin-eozinnal festettük meg.

A follikulusokban az ovogenezis és a spermiogenezis következő fázisait értékeltük számszerűen: a petesejteket, I. és II. rendű ovocitákat, valamint a spermiumokat és az I. és II. rendű spermiocitákat.

Az ivarmirigyekből készített metszetsorozatok átlag 120 metszetének ¼-ét értékeltük a megfigyelt ivarsejtfejlődési alakokat illetően. A mikroszkópos megfigyelés útján nyert abszolút számértékek alapján relatív (%-os)

értékhez jutottunk, melyek azt fejezik ki, hogy a leszámolt follikulusok hány %-ában volt megtalálható az illető sejttípus. A kapott számértékből a számításokat a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Számítástechnikai Csoportja végezte el.

Eredmények

Vizsgálatainkban a téli álom végső időszakában a kontroll és a kísérleti csoport között igen jelentős különbségeket észleltünk.

Az *1. ábrán* és az *1. táblázaton* jól látható az, hogy két hét után a kísérleti, vagyis az extirpált tapogatójú csoportban az I. és II. rendű ovocitáknak

1. táblázat

Ovogenesis a téli álom alatt (III. 13—27.).
A follikulusokban talált sejtek abszolút száma és relatív százaléka.

Table 1. Ovogenesis during winter hibernation (March 13 to 27). Absolute numbers and relative proportions of the cells found in the follicles.

Az összes follikulus száma		A follikulusok száma csoportonként					
		I. rendű ovocita		II. rendű ovocita		Ovium	
E	K	E	K	E	K	E	K
973	956	522	169	185	18	577	181
Összehasonlító matematikai módszer							
100%	100%	308,8%	100%	1027,78%	100%	318,7%	100%

K: kontroll csoport: intakt opticus tentaculummal rendelkező állatok
E: experimentalis csoport: extirpált, tehát opticus tentaculummal nem rendelkező állatok.

2. táblázat

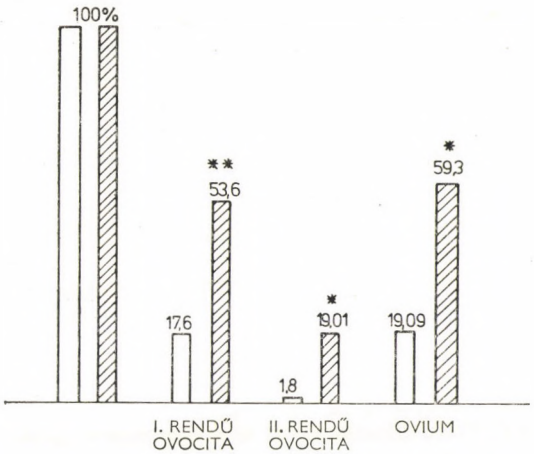
Spermiogenezis a téli álom alatt (III. 13—27.).
A follikulusokban talált sejtek abszolút száma és relatív százaléka.

Table 2. Spermiogenesis during winter hibernation (March 13 to 27). Absolute numbers and relative proportions of the cells in the follicles.

Az összes follikulus száma		A follikulusok száma csoportonként							
		I. rendű spermiocyta		II. rendű spermiocyta		Spermium		Sok spermium	
E	K	E	K	E	K	E	K	E	K
973	956	692	946	398	937	274	330	0	0
Összehasonlító matematikai módszer									
100%	100%	73,15%	100%	42,18%	100%	83,03%	100%	0%	0%

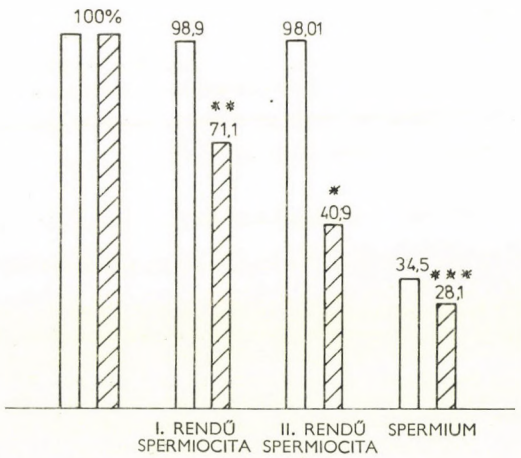
K: kontroll csoport: intakt opticus tentaculummal rendelkező állatok
E: experimentalis csoport: extirpált, tehát opticus tentaculummal nem rendelkező állatok.

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA KÖNYVTÁRA



1. ábra. Ovogenezis a téli álom végén (III. 13—17.)
□ Kontroll (intakt szervezetek) //// az extirpált tapogatójú (kísérleti) csoport.
* $p < 0{,}001$ ** $p < 0{,}002$

Fig. 1. Ovogenesis by the end of winter hibernation.
□ Control group (intact snails), //// experimental group (snails deprived of tentacles).



2. ábra. Spermiogenezis a téli álom végén (III. 13—17.).
□ Kontroll (intakt szervezetek) //// az extirpált tapogatójú (kísérleti) csoport.
* $p < 0{,}001$ ** $p < 0{,}002$ *** $p < 0{,}02$

Fig. 2. Spermiogenesis by the end of winter hibernation.
□ Control group (intact snails), //// experimental group (snails deprived of tentacles).

és az érett petesejteknek a száma a kontroll csoporthoz viszonyítva nagymértékben és szignifikánsan emelkedett, amit az idevonatkozó százalékos értékek is jól kifejeznek.

A *2. ábrán* és a *2. táblázaton* megfigyelhetjük, hogy két hét után a kontroll csoporthoz viszonyítva a kísérleti, vagyis az extirpált tapogatójú csoportban az I. és II. rendű spermiocitáknak a száma szignifikánsan csökkent.

Diszkusszió

Több szerző foglalkozott az opticus tentaculummal [10, 11, 18, 19], s többen a Molluscák gametogenezisének problémáival [12—17, 20].

Az eddigi kísérleti eredményeinkből levonhatjuk azt a következtetést, hogy a tüdős csigák esetében a szemtapogató tavasszal, a természetes felébredés időszakában fontos szerepet tölt be a gametogenezis regulációjában, hiánya nagymértékben fokozza az ovogenezist. Ezt egy másik munkánk eredménye is igazolja, amely szerint az opticus tentaculum homogenizatuma az intact éti csigák esetén a spermiogenezist serkenti. Ezt támasztja alá, hogy az elektronmikroszkópos vizsgálataink alapján a tentacularis ganglionban is megtaláltuk az elemi neuroszekreciós szemcséket [4].

Jelenleg a téli álomban levő éti csigákon a téli időszak végén elvégzett vizsgálataink megerősítik, hogy a szemtapogató eltávolítása az ovogenezis felgyorsulását eredményezi, amit az I. és II. rendű ovocitáknak és a petesejteknek a kontrollhoz képest nagy mértékben emelkedett száma igazolt.

Következésképpen megelőző és jelen vizsgálataink is megerősítik, hogy az opticus tentaculum a gametogenezis regulációjának az egyik fontos szerve.

Összefoglalás

A kísérleti eredményekből levonhatjuk azt a következtetést, hogy a tüdős csigák opticus tentaculumának hiánya a téli időszak végén már két hét múlva az ovogenezist serkenti. Ennek alapján megelőző vizsgálatainkkal összhangban az opticus tentaculumot jelentős endokrin centrumnak tekintjük, amely a gametogenezis regulációjában fontos szerepet tölt be.

IRODALOM

1. Bierbauer, J. (1967) Examination on the tentacular ganglion system of pulmonates. *Gen. comp. Endocrinol.*, **9**, 433—434.
2. Bierbauer, J. (1974) Experimental study on the regulation of the gametogenesis in *Helix pomatia* (Gastropoda) in the period foregoing the oviposition. *Gen. comp. Endocrinol.*, **22** 393.
3. Bierbauer, J. (1974) Regulation of gametogenesis in *Helix pomatia* in the period of natural awakening after hibernation. *Acta biol. Acad. Sci. hung.*, **25**, 147—150.
4. Bierbauer, J. (1977) Az opticus tentaculumnak, mint endokrin szervnek összefüggése a gametogenesis regulációjával. *Állattani Közl.* Közlés alatt.
5. Bierbauer, J. and Fehér, S. (1976) Effect of cerebral ganglion homogenate on the gametogenesis in *Helix pomatia*. *Zentralblatt für Vet. Med.* R. C. C. Anat. Hist. Embryol. **5**, 98—99.
6. Bierbauer, J., Kiss, J. and Vigh, B. (1967) Autoradiographic examination of the distribution of ^{35}S-cysteine in special and secretory cells of the optic tentacle and tentacular ganglion of Pulmonata. *In: Symposium on Neurobiology of Invertebrates*, 1967, Publ. House of Hung. Acad. Sci., Budapest.

7. Bierbauer, J. and Molnár, J. (1972) Gametogenesis regulációjának kísérletes befoyásolása tüdőscsigákon a téli álom idején. *Állattani Közl.*, **59,** 1—4.
8. Bierbauer, J. and Török, L. J. (1967) Histophysiological study of the optic tentacle in pulmonates. I. Histological examination of the optic tentacle with special regard to morphology of the collar and lateral cells. *Acta biol. Acad. Sci. hung.*, **19,** 133—143.
9. Bierbauer, J. and Vigh-Teichmann, I. (1970) Histophysiological examination of the optic tentacle of pulmonates. II. Cytochemistry of the special and secretory cells. *Acta biol. Acad. Sci. hung.*, **21,** 11—24.
10. Gabe, M. (1954) La neurosecrétion chez les Invertébrés. *Ann. biol. Fr.*, **30,** 6—62.
11. Gabe, M. (1966) *Neurosecretion.* Pergamon Press, Oxford.
12. Gomot, L. (1970) Analyse expérimentale du déterminisme du cycle de la gonade chez les mollusqes. *Bull. Sci. Zool. Fr.*, **95,** 429—451.
13. Gomot, L. and Guyard, A. (1964) Evolution en culture in vitro de la glande hermaphrodite de jeunes escargots de l'espece *Helix aspersa* Müll. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **258,** 2902—2905.
14. Gottfried, H., Dorfman, R. I., Forcheielle, E. and Wall, P. E. (1967) Aspects of the reproductive endocrinology of the giant land slug *Agriolimax californicus. Gen. comp. Endocrinol.*, **9,** 454—462.
15. Griffond, B. (1969) Survie et évolution, en culture *in vitro*, des sexes séparés. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **268,** 963—965.
16. Guyard, A. (1967) Féminisation de la glande hermaphrodite juvénile d'Helix aspersa Müll. associée *in vitro* au ganglion cérébroide d'escargot adulte ou de paludine femelle. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **265,** 145—149.
17. Joose, J., Boer, M. H. and Cornelisse, C. J. (1968) Gametogenesis and oviposition in Lymnea stagnalis as influenced by X-ray-irradiation and hunger. *Symp. Zool. Soc.* (London), **22,** 213—235.
18. Kuhlmann, D. and Nolte, A. (1967) Spermiogenese, Eireifung und Neurosekretion. Untersuchungen an der Weinbergschnecke *Helix pomatia.* L. *Z. Wiss. Zool. A.* Dtsch. **176,** 271—286.
19. Lane, N. J. (1964) The fine structure of certain secrezory cells in the optic tentacles of the snail *Helix aspera*, *Quart. J. micr. Sci.*, **105,** 33—47.
20. Lane, N. J. (1964) Localization of enzymes in certain secretory cells of Helix tentacles. *Quart. J. Micr. Sci.*, **105,** 49—60.
21. Pelluet, D. and Lane, N. J. (1961);The relation between neurosecretion and cell differentiation in the ovotestis of slugs. *Canad. J. Zool.*, **39,** 789—804.
22. Röhlich, P., and Bierbauer, J. (1966) Electronmicroscopic observations on the special cells of the optic tentacle of *Helicella obvia. Acta biol. Acad. Sci. hung.*, **17,** 359—373

AN EXPERIMENTAL STUDY OF THE REGULATION OF GAMETOGENESIS IN *HELIX POMATIA* BY THE END OF WINTER HIBERNATION

J. Bierbauer

Institute of Biology, Semmelweis Medical University, Budapest, Hungary

Previous studies performed at midtime of the winter hibernation and in the period of natural revival in the spring have shown that removal of the optic tentacle of Helix pomatia snails was followed within one-two weeks by a considerable numerical increase of first and second oocytes and ova over the control.

Intact snalis treated intramuscularly with a homogenate of optic tentacle before oviposition showed a marked increase of spermiogenesis relative to the control. This accorded well with the electron microscopic detection of elementary neurosecretory granules in the tentacular ganglion, too.

The present experiments permit the conclusion that removal of the optic tentacle by the end of winter hibernation accounts for stimulation of ovogenesis already within two weeks, to judge from the significant quantitative increase of first and second oocytes and ova over the controls.

First and second spermiocytes, on the other hand, decreased significantly in number relative to the control.

The present and previous studies unequivocally suggest the important role of the optic tentacle in gametogenesis.

A kiadásért felelős az Akadémiai Kiadó igazgatója
Műszaki szerkesztő: Sándor István
A kézirat a nyomdába érkezett: 1978. X. 23. — Terjedelem: 9,1 (A/5) ív

79.6029 Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György

MAGYAR
TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
KÖNYVTÁRA

TARTALOM

Újhelyi M.: Adalékok az evolúcióelmélet továbbfejlesztéséhez 3

Tarján I.: A biológiai sugársérülés molekuláris problémái 25

Monos E.: Hemodinamikai tényezők szerepe az artériás vérkeringés szabályozási folyamataiban 47

Gyévai A.: Patkány embriók hipotalamuszából kialakított aggregátumok „long-term" tenyésztése és prosztaglandin termelése *in vitro* 77

Cserhalmi M. és Csaba Gy.: Hipofízis hormonok átfedő hatása a kétéltűek metamorfózisára 87

Bierbauer J.: A gametogenezis regulációjának kísérletes vizsgálata *Helix pomatián* a téli álom végén 99

Ára: 21,— Ft
Előfizetés egy évre: 42,— Ft

INDEX: 26 073
ISSN 0133—3844

INDEX

BIOLÓGIA (Budapest)
26/1 (1978)

ÚJHELYI, M.: A Contribution to the Further Development of the Evolution Theory 3

TARJÁN, I.: Molecular Problems of Biological Radiation Injuries 25

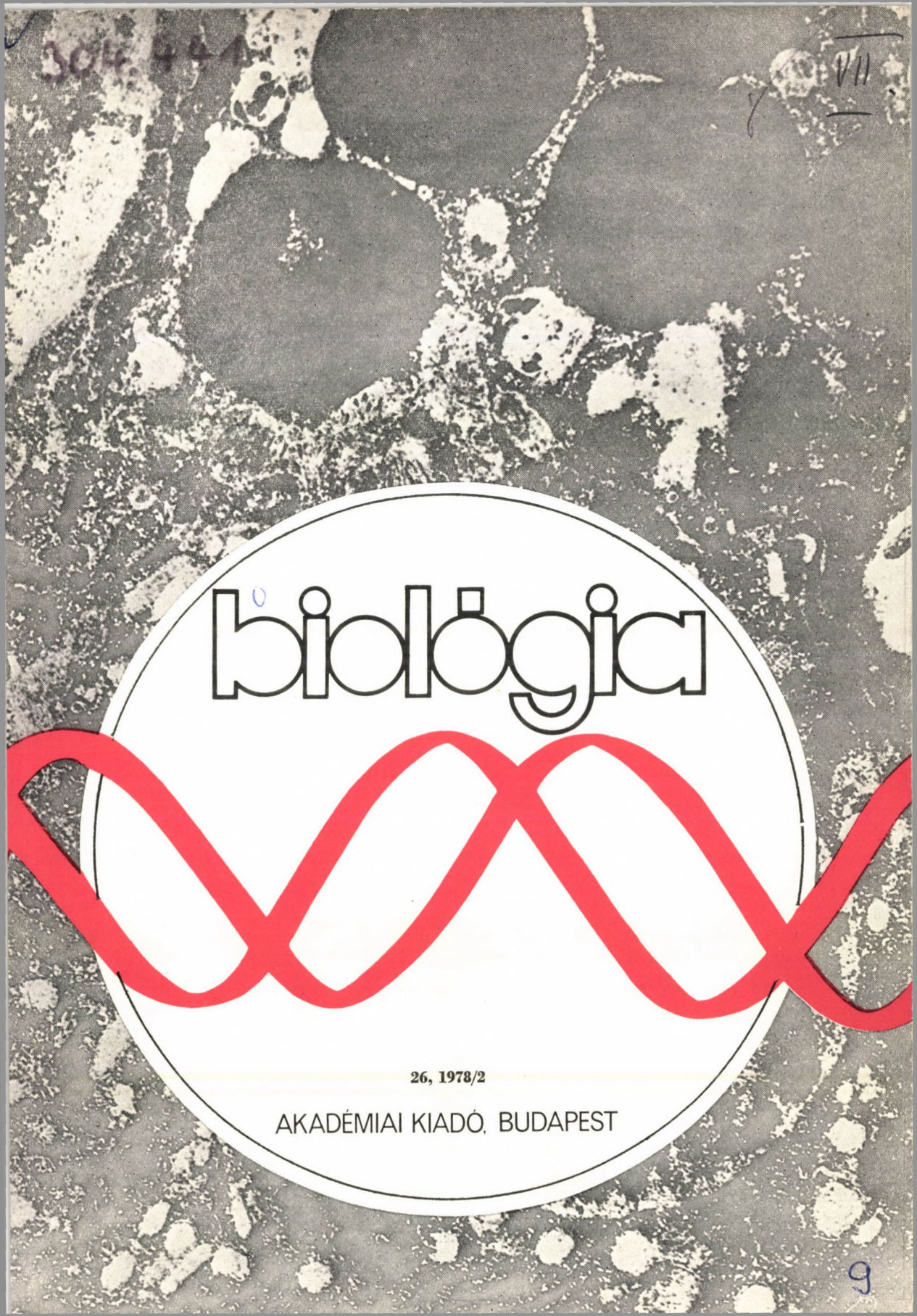
MONOS, E.: The Role of Haemodynamic Factors in the Regulation of Arterial Circulation 47

GYÉVAI, A.: *In Vitro* Long-Term Culturing and Prostaglandin Production of Hypothalamic Aggregate Cultures Developed From Rat Embryo 77

CSERHALMI, M. and CSABA, G.: The Effect of Pituitary Hormone Overlap on Amphibian Metamorphosis 87

BIERBAUER, J.: An Experimental Study of the Regulation of Gametogenesis in *Helix pomatia* by the End of Winter Hibernation 99

304.441
VII



biológia

26, 1978/2

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

9

SZERZŐINK SZÍVES FIGYELMÉBE

1974-től a BIOLÓGIA (korábban: *Biológiai Közlemények*) tartalmilag és technikailag korszerűsített alakban jelenik meg. Kötetszámozása folyamatos (1974: 22. kötet), évente két füzetet tartalmaz. Elsősorban az *elméleti és molekuláris biológia, a sejttan, örökléstan, kísérletes onto- és filogenetika* tárgyköréből közöl cikkeket. A dolgozatok következő típusait részesítjük előnyben:

— *teoretikus* cikkek
— valamely *munkacsoport* kísérletekre alapozott *elméletének* ismertetése, elsősorban a koncepció bővebb kifejtése
— a biológia valamely részterületének legújabb irodalmát *összefoglaló (review)* munkák
— az adott formában másutt nem publikált *kísérleti* beszámolók.

A lap ezenkívül *vitákat indító* vagy azokhoz *hozzászóló* cikkeket, valamint *könyvismertetéseket* és *kongresszusi beszámolókat* is közöl.

A kéziratokat gépelve, két példányban, a mellékleteket (rajzokat, fényképeket) egy példányban — az intézmény vezetőjének jóváhagyása után — a következő címre kérjük beküldeni:

BIOLÓGIA Szerkesztősége
Dobozy Ottó techn. szerkesztő
1445 Budapest, Nagyvárad tér 4.

A dolgozatok fejléce tartalmazza a címet, a szerző(k) teljes nevét, az intézet és a város megnevezését, valamint a kulcsszavakat. A lapban megjelenő dolgozatokat a legfontosabb külföldi *referáló folyóiratok* angol nyelvű összefoglalójuk, illetve címük alapján *ismertetik.* Ezért célszerű a külön angol fordítás céljára készült összefoglalók szövegének informatív, szabatos megfogalmazása. A dolgozat végén jelöljék meg a *szerző nevét* és munkahelyének pontos *címét* (irányítószámmal). A kéziratok elkészítéséhez a szerkesztőség — előzetes kérésre — *Útmutatót* bocsát a szerzők rendelkezésére. Folyóiratunk egységes technikai kivitelezése érdekében *kizárólag az Útmutató figyelembevételével készült munkákat fogadhatunk el.*

Szerzőinket a megjelent cikkekért az Akadémiai Kiadó által szabályozott ívhonorárium illeti meg, és — amennyiben előzetesen nem rendelkeznek másként — térítés ellenében 100—100 különlenyomatot bocsátunk rendelkezésükre.

Terjeszti a Magyar Posta

Előfizethető a hírlapkézbesítő postahivataloknál és a Posta Központi Hírlap Irodánál (PKHI 1900 Budapest V., József nádor tér 1.) közvetlenül vagy postautalványon, valamint átutalással a PKHI 215-96162 pénzforgalmi jelzőszámra. Előfizetés bejelenthető az Akadémiai Kiadónál (1363 Budapest V., Alkotmány utca 21. Telefon: 111—010).

Példányonként beszerezhető: az Akadémiai Könyvesboltban (1368 Budapest V., Váci utca 22. Telefon: 185—881), a PKHI Hírlapboltjában (1055 Budapest V., Bajcsy Zsilinszky út 76. Telefon: 116—269) és minden nagyobb árusítóhelyen.

Előfizetési díj egy évre: 42 Ft

1 szám ára: 21 Ft

Index szám: 26 073

Külföldön terjeszti a KULTURA Külkereskedelmi Vállalat,
H-1389 Budapest, Pf. 149.

BIOLÓGIA

ELMÉLETI ÉS KÍSÉRLETI BIOLÓGIAI FOLYÓIRAT

Szerkesztő:

CSABA GYÖRGY

A szerkesztő bizottság tagjai:

BALÁZS ANDRÁS
CSÁNYI VILMOS
DOBOZY OTTÓ
(technikai szerkesztő)
GUBA FERENC
KISZELY GYÖRGY
TÖRÖK LÁSZLÓ
VIDA GÁBOR

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

Biológia **26**, *1978, 107—138*

A FŐ HISZTOKOMPATIBILITÁSI KOMPLEX BIOKÉMIAI ALAPJAI

T. SZABÓ MÁRIA
Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. sz. Kémiai-Biokémiai Intézete, Budapest

Beérkezett: 1978. október 27.

Kulcsszavak: hisztokompatibilitási komplex, hisztokompatibilitási antigének, a hisztokompatibilitási komplex biokémiai jellemzése

Bevezetés

A beültetett szövet (graft) vagy átültetett szerv „kilökését" előidéző immunológiai reakciókat a donor szövet sejtjeinek felületén levő egyes molekulacsoportok, a sejtfelületi antigének váltják ki. Ezekben a reakciókban nagy szerepük van a sejtek közötti kölcsönhatásoknak. A befogadó (akceptor) immunrendszere a keringő limfociták révén a donor sejteken felismeri a sejtfelületi antigéneket és megkülönbözteti a saját sejtek felületén levő molekuláktól. A graft kilökés intenzitását a donor és a recipiens sejtfelületi antigénjei között fennálló szerkezeti különbség mértéke szabja meg, a kilökés jelensége a recipiens immunválaszának az eredménye, amely válasz elsősorban a „transzplantációs", a hisztokompatibilitási antigének ellen irányul.

A Fő Hisztokompatibilitási Komplex, az irodalomban elterjedt rövidítéssel az MHC (Major Histocompatibility Complex) az a kromoszomális régió (az a DNS szakasz egy meghatározott kromoszómán), melynek géntermékei a sejtfelületi, transzplantációs antigének. A graft kilökésen kívül, az MHC egyes DNS szakaszai — génjei — szerepet játszanak számos „immunológiai" jelenségben, a limfocita aktiválásban, az immunreakciókat kiváltó és befolyásoló különböző celluláris kölcsönhatásokban, egyes komplement faktorok szintézisében stb.

A gerincesek MHC rendszereinek jelzésére a következő rövidítéseket használja az irodalom:

ember:	HLA	nyúl:	H—1
majom:	RhL—A	patkány:	A B
kutya:	DLA—A	egér:	H—2
		csirke:	B

Az MHC vizsgálata 1950 körül indult el, ebben az időben sikerült kimutatni egér leukociták felületén a hisztokompatibilitási antigéneket. Az egér H—2 rendszerének tanulmányozása szolgáltatta az alapokat az ember HLA rendszerének vizsgálatához, megismeréséhez.

Az első hisztokompatibilitási antigént emberben DAUSSET és NENNA [10] írták le, politranszfundált betegek vérében specifikus, fehérvérsejteket agglutináló antitesteket mutattak ki.

PAYNE és mtsai néhány sejtfelületi antigén-specifitás kimutatásával 1964—66 körül [5, 26] definiálták a HLA rendszert. 1968-ban a WHO (World

Health Organisation) elfogadta az ember MHC rendszerének jelzésére a HLA (*H*uman *L*eukocyte-Locus-*A*) elnevezést.*

Rövidesen kiderült, hogy a szerológiai módszerekkel kimutatható Ag-specificitásokat, a transzplantációs antigéneket az MHC régión belül két egymással szorosan kapcsolódó fő locus határozza meg: ezeket A (LA), ill. B (Four) jelzéssel látták el.

1973-ban az V. Hisztokompatibilitási Nemzetközi Munkaértekezleten (V. Histocompatibility Workshop) már kb. 50 különböző humán populáció szerológiai vizsgálatának és összehasonlításának adatait elemezték, s a HLA antigének eloszlásában jelentős különbségeket találtak. A gyakoribb Ag-specificitásokat arab számokkal látták el. A széles körű összehasonlító vizsgálatok alapján azt is bizonyították, hogy számos, eddig homogénnek vélt Ag-specificitás megfelelő módszerrel vizsgálva 2—3 Ag-specificitásra válik szét. Ezen a konferencián fogadták el azokat az eredményeket is, amelyek szerint egyes transzplantációs antigéneket egy harmadik locus, a C-locus (AJ) határoz meg.

Az A, B, C locusok géntermékeit legegyszerűbben szerológiai módszerekkel lehet kimutatni és vizsgálni, ezért ezeket „szerológiailag definiált" *SD-antigéneknek* nevezzük.

Jelenlegi ismereteink szerint az MHC-ben több olyan locus is van, amelyet szerológiai módszerekkel nem vagy nehezen lehet definiálni. Ezeket elsősorban kevert limfocita reakcióval (MLR: *m*ixed *l*ymphocyte *r*eaction) lehet kimutatni.

Az MHC által meghatározott antigéneknek számos genetikai variációja létezik, vagyis az egyes locusok által meghatározott allo-antigén molekulák kémiai felépítésüket tekintve polimorf szerkezetűek. Ezért az antigének kémiai és biokémiai vizsgálata a nem „beltenyésztett" emberi populációknál különösen nagy nehézségekbe ütközik.

A kísérleti állatok néhány csoportjának, elsősorban az egér beltenyésztett és kongenikus törzseinek használata megkönnyíti és lehetővé teszi a kiterjedt, szervezett kutatást. Ezért az MHC rendszerre vonatkozó ismereteink jelentős része elsősorban az egér H—2 rendszerrel kapcsolatos eredményekből származik. Az utóbbi években azonban határozott fejlődést értek el az ember MHC rendszerének, a HLA rendszernek és géntermékeinek genetikai, kémiai és biokémiai tanulmányozásában, valamint a HLA rendszer biológiai funkciójának felderítésében.

1. Az MHC általános tulajdonságai; vizsgálati módszerek

Az MHC által meghatározott géntermékek, a HLA, illetve a H—2 antigének, glükoproteinek, amelyek minden maggal rendelkező sejt felületén, legintenzívebben a leukociták, ill. a limfociták felületén mutathatók ki (aorta szöveten alig, zsír- és agyszöveten gyakorlatilag nem detektálhatók). A magvatlan vörösvérsejteken a HLA antigének koncentrációja rendkívül kicsi. A HLA-antigének a sejtmembrán integrális részét képezik.

*Akkor még azt hitték, hogy egyetlen locus határozza meg a hisztokompatibilitási antigéneket.

A hisztokompatibilitási antigének genetikai kifejeződését az MHC néven összefoglalt, egy meghatározott DNS régió szabályozza. Transzplantáláskor a donor és akceptor közötti hisztoinkompatibilitás az allograft kilökésében nyilvánul meg, amely jelenség közvetlenül kapcsolatba hozható emberben a HLA három — az A (LA), B (Four), C (JA) — locusának, egérben a K és D locusok géntermékeivel. A H-antigén (hisztokompatibilitási antigén) elnevezés kizárólag azokra az antigénekre vonatkozik, amelyek azonosak az ún. „szerológiailag definiált" antigénekkel.

A H-antigének kimutatása, a különböző Ag-specifitások meghatározása azon alapul, hogy a H-antigénekkel szemben antitestek nyerhetők. Egy meghatározott antigénnel szemben termelt antitest specifikusan reagál azokkal a sejtekkel, amelyek ugyanazon antigéneket hordozzák. A specifikus kölcsönhatás különböző módszerekkel tanulmányozható:

1. Az antitest a leukocitákat agglutinálja,
2. az antitest komplement jelenlétében lizálja a megfelelő antigént hordozó sejteket,
3. az antitest leukocita vagy trombocita jelenlétében komplementet köt meg.

Az említett módszerek közül kvantitatív mérésre legalkalmasabb a 2. az „antitest mediált, komplement dependens" sejt lízis mérése, amelyben legáltalánosabban ^{51}Cr-mal jelzett célsejteket alkalmaznak, s a sejtekből felszabaduló ^{51}Cr jelzettség mérése alapján a specifikus lízis nyomon követhető [35].

A sejtmembránból izolált, oldható H-antigének mérésénél radioaktív jelzés után a jelzett antigének kötődését vizsgálják.

A humán Ag-specifitások vizsgálatára különböző eredetű emberi szérumokat használnak. Legfontosabb szérumforrások: politranszfundált betegek széruma; szervátültetésen átesett betegek széruma, multipara nők széruma.

Önkéntes, transzfúziót még nem kapott véradók között gyakran lehet olyan véradó párokat találni, akiknél a H-antigének között csak egyetlen locus által meghatározott antigénben van különbség (monospecifikus szérumok). Humán eredetű H-antigéneket — nagyobb mennyiségben — *in vitro* fenntartott limfoblasztoid sejtek membránjából, különböző feltárási és tisztítási eljárások után lehet nyerni, a homogenitásra való törekvés miatt elsősorban homozigótaként tipizált sejtsorokból. Egér H-antigéneket, illetve más állatból származó H-antigéneket lépsejtekből szoktak izolálni.

2. Antigén-specifitás, antigén-determináns

Fogalmilag érdemes tisztázni, hogy mit értünk az „antigén-specifitás", illetve az „antigén-determináns" kifejezéseken. Az „antigén-specifitás" kifejezést jelen ismertetésünkben mint specifikus antigén tulajdonságot használjuk, amely meghatározott kémiai szerkezethez kötött. A különböző, sejtfelületi antigén-specifitásokat az antigének nagy részénél a velük szemben termelt ellenanyagok, antiszérumok segítségével határozzák meg. A különböző sejtfelületi antigének a nekik megfelelő specifikus ellenanyagokkal lépnek kapcsolatba, vagyis az azonos Ag-specifitású szérummal. Az antigén-specifitás ilyen értelemben az ellenanyagoknak azon tulajdonsága, hogy csak egy vagy korlátozott számú, a termelődésüket kiváltó antigénhez hasonló szerkezetű antigénnel képesek reagálni.

Az „antigén-determináns" kifejezés biokémiai értelemben nehezen definiálható, sőt elterjedt irodalmi használata ellenére általánosan is nehéz meghatározni. Általános értelemben az Ag-determináns az antigén molekulának azt a részét jelenti, amelyhez a vele szemben reagáló, specifikus ellenanyag kapcsolódik. Az Ag-determináns az Ag-molekulának az a része, azon részletei, amelyek megszabják az antigén által kiváltott specifikus válaszokat.

Az MHC géntermékei, a hisztokompatibilitási antigének polimorf szerkezetű glükoproteinek. Mint minden fehérjénél, a H-antigéneknél is a jellegzetes biológiai funkcióhoz jellegzetes, meghatározott térszerkezet, konformáció tartozik. A molekulák polimorfizmusa az egyedre jellemző, specifikus különbségeket biztosítja. A polimorfizmust — feltehetően — egyes molekularészletekben fellépő változó, egyedenként különböző aminosav-szekvencia részletek idézik elő.

Jelenlegi ismereteink szerint úgy tűnik, hogy a különböző, szerológiailag elválasztható Ag-specifitások különálló, egyedi Ag-molekulákhoz tartoznak. Egyetlen Ag-specifitáshoz azonban nemcsak egyetlen Ag-determináns tartozik. A molekulának feltehetően több olyan részlete van, amelyek együtt adnak a molekulának egyedi jelleget.

A különböző Ag-specifitásokat tisztított H-antigénekkel szemben termelt ellenanyagoknak a reakciója alapján lehet a sejteken detektálni. Már régóta ismert azonban az, hogy vannak olyan antitestek (antiszérumok), amelyek több különböző Ag-specifitással is reagálnak és vannak olyanok, amelyek csak egy meghatározott Ag-specifitással. Ezért „szupertipikus", közös specifitásnak hívják azokat, amelyek mint Ag-determinánsok megvannak nemcsak egyetlen, hanem több különböző Ag-molekulában is. Saját „szubtipikus" specifitásnak azt jelölik, amely mint „fő-determináns" a molekula egyedi jellegzetességét adja. A specifitások vizsgálatában ez úgy jelentkezik, hogy a „szupertipikus" specifitások ellen termelt antiszérum több különböző egyed sejtfelületi antigénjével reagál, míg a „szubtipikus" ellen termelt szérum csak egyféle, egyetlen Ag-specifitással. Általában először a „szupertípust" ismerik fel. Ezért még most is gyakran előfordul az, hogy az addig egységesnek tartott Ag-specifitást ketté vagy többfelé kell választani a részletesebb, alaposabb analízis alapján. Erre számos példát lehet felhozni, pl. a sokáig egységesnek vélt A_9 specifitás két specifitásra választható szét, ezeket az AW_{23}, illetve az AW_{24}-gyel jelzik.

A kétféle (szupertipikus és szubtipikus) specifitás közötti különbséget legegyszerűbben úgy érzékelhetjük, hogy egy olyan polipeptid láncot képzelünk el, amelynek vannak olyan részletei, amelyek megtalálhatók más, hasonló funkciójú molekulában is, míg vannak olyanok, amelyek kizárólag csak abban a molekulában fordulnak elő.

Az MHC genetikai jellemvonásai

E fejezet összeállításánál az irodalomjegyzékben található [1, 2, 12, 13 14, 18, 19, 22, 27, 28] forrásokat használtuk.

1. A HLA rendszer

a) Az A, B, és C locusok

A szerológiai módszerekkel kimutatható HLA antigéneket a 6. autoszomális kromoszómán egymás mellett elhelyezkedő 3 géncsoport, az A, B, C locusok határozzák meg (a locus és régió elnevezéseket szinonim értelemben használják). Az „A" locus jelzése az irodalomban LA, a „B" locusé 4 (four), a „C" locusé AJ is lehet (ennek történeti okai vannak).

Az MHC komplexen belül a locusok helyzete olyan, hogy a B locus közelebb van a centromerhez, mint az A locus. Azt azonban nem ismerjük teljes bizonyossággal, hogy a HLA „szupergén" a kromoszóma rövidebb vagy hosszabb karján van-e.

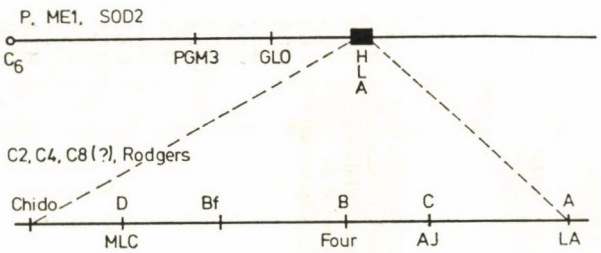
Az MHC régió olyan hosszúságú a koromoszóma adott DNS szakaszán, hogy kb. 2000 különböző, átlagosan 20 000 molekulasúlyú fehérje szintéziséhez szükséges információt tartalmaz. Az *1. ábrán* a HLA gén sematikus képét mutatjuk be.

Ugyanezen a kromoszómán a HLA régió közelében egyéb fehérjéket kódoló géneket is kimutattak, ezeknek nagy részét markernek használják a genetikai vizsgálatokban.

Kimutattak egyes vércsoport fehérjéket kódoló géneket (P és Chido), enzimeket meghatározó géneket, pl. foszfoglukomutáz (PGM_3), glioxaláz (GLO), citoplazmatikus almasavdehidrogenáz (ME_1), a properdin rendszer egyes fehérjéit kódoló régiókat (BF) és a komplement rendszer egyes komponenseinek, pl. C2, C4 kódolására szolgáló régiókat.

A D locus a három szerológiailag kimutatható, szorosan vett HLA locusokon kívül helyezkedik el az MHC-ben. A D locus olyan antigéneket határoz meg, amelyek a kevert limfocita reakcióval (l. később) vizsgálhatók. E régió géntermékeit mint limfociták által meghatározott (LD: lymphocyte defined) antigéneket ismerjük. Fontos szerepük miatt külön fogunk velük foglalkozni.

Mindhárom szerológiailag definiált HLA locus számos, egymást kölcsönösen kizáró allél által meghatározott antigént kódol, így mindegyik locushoz tartozik egy szegregáló, szétváló Ag-sorozat. Minden diploid sejtnek egy sorozatból 2 alloantigénje van. A szülő egyet biztosan átad az utódnak. A két homológ kromoszóma egyikén levő géneket haplotípusnak jelölik. A gének kodominánsan öröklődnek, heterozigótákban is kifejeződik mindkét,



1. ábra. A HLA rendszer sematikus ábrázolása a 6. kromoszómán. Rood, J. J. és mtsai [27] után

Fig. 1. Schematic presentation of the HLA system associated with the sixth chromosome

1. táblázat

*A legfontosabb erős hisztokompatibilitási antigének jelölése a „VI. Histocompability Workshop" után**

Table I. Terms for the main histocompatibility antigens as proposed in the 6th Workshop

HLA locusok jelölése	HLA—A (1. HL—A vagy SD1)		HLA—B (2. HLA vagy SD2)		HLA—C (3. HL—A vagy SD3)		HLA—D (MLC vagy MLR vagy LD)	
A HLA locusok által determinált antigén-sorozatok jelölése	HLA—A (LA vagy 1, vagy SD1)		HLA—B (Four vagy 2, vagy SD2)		HLA—C (3 vagy SD3)		HLA—D (MLC vagy MLR, vagy LD)	
	Új elnevezés	Régi elnevezés	Új elnevezés	Régi elnevezés	Új elnevezés	Régi elnevezés	Új elnevezés	Régi elnevezés
Az egyes sorozatokba tartozó antigének jelölése a VI. Histocompatibility Workshop szerint és azok korábbi szinonimái	HLA—A1	HL—A1	HLA—B5	HL—A5	HLA—CW1	T1	HLA—DW1	LD101,5a
	HLA—A2	HL—A2	HLA—B7	HL—A7	HLA—CW2	T2	HLA—DW2	LD102,7a
	HLA—A3	HL—A3	HLA—A3	HL—A8	HLA—CW3	T3	HLA—DW3	LD103,8a
	HLA—A9	HL—A9	HLA—B12	HL—A12	HLA—CW4	T4	HLA—DW4	LD104
	HLA—A10	HL—A10	HLA—B13	HL—A13	HLA—CW5	T5	HLA—DW5	LD105
	HLA—A11	HL—A11	HLA—B14	HL—A14			HLA—DW6	LD106
	HLA—A28	W28	HLA—B18	HL—A18				
	HLA—A29	W29	HLA—B27	HL—A27				
	HLA—AW23	W23	HLA—BW15	W15				
	HLA—AW24	W24	HLA—BW16	W16				
	HLA—AW25	W25	HLA—BW17	W17				
	HLA—AW26	W26	HLA—BW21	W21				
	HLA—AW30	W30	HLA—BW35	W5				
	HLA—AW31	W31	HLA—BW37	TY				
	HLA—AW32	W32	HLA—BW38	W16,1				
	HLA—AW33	19,6	HLA—BW39	W16,2				
	HLA—AW34	Malay 2	HLA—BW40	W10				
	HLA—AW36	Mo	HLA—BW41	Sabo4				
	HLA—AW43	BK	HLA—BW42	UWA				

* Dóbiás Gy. [12] alapján.

ugyanahhoz a sorozathoz tartozó antigén. Többgyermekes családoknál végzett vizsgálatok szerint úgy tűnik, hogy az allél gének szétválása (szegregálódása) az utódokban átlagosan egyenlő mértékű, azaz 50—50%.

A HLA antigéneket a sejtek membránjából sikerült tisztán izolálni, s az egyes Ag-specifitásokat hordozó molekulákat, mint önálló polipeptideket, sikerült egyes esetekben egymástól elválasztani. Vannak azonban olyan Ag-specifitások, amelyek egymástól nem választhatók el. A jelenlegi irodalmi adatok alapján az a valószínű, hogy minden Ag-specifitáshoz egy meghatározott Ag-molekula tartozik. Ebből az is következik, hogy mindhárom locuson különálló allél kódolja az egyes specifikus antigéneket.

Mint már említettük, mindegyik locushoz számos allél tartozik, az Ag-specifitások egész sora, s a locusok polimorf szerkezetűek. Minden allél egy Ag-specifitást határoz meg, amely „egyetlen" (unique) a haplotípus számára, ez a szubtipikus, a saját specifitás. Ezenkívül az egyes allélek olyan specifitásokat is meghatároznak, amelyek több Ag-molekulában közösek, ezek a szupertipikus, közös specifitások.

A WHO-nak a hisztokompatibilitással foglalkozó munkaértekezletein, amelyeket két-három évenként tartanak, foglalkoznak az Ag-specifitások elfogadásával, elnevezésével és jelölésével. A locusok jelei mellé írt arab számok a már eddig elfogadott specifitásokat jelzik, a locus mellé írt „W" jelzés arra utal, hogy bár többen kimutatták a specifitást, de még csak feltételesen fogadták el, pl. AW_{23}, AW_{24}, DW_1 stb.

Az *1. táblázat*ban a „VI. Histocompability Workshop" által elfogadott Ag-specifitásokat és jelzéseiket mutatjuk be [12].

A *2. táblázat*ban a „VII. Histocompatibility Workshop" által regisztrált Ag-specifitásokat mutatjuk be. A táblázatot a „Nomenklatúra Bizottság" 1978-ban megjelent [1] összefoglalója alapján állítottuk össze. Az értekezlet állásfoglalása szerint a régió jelzése: HLA; ezen belül az individuális locusoké: A, B, C, D. A C-locuson 6 specifitást véglegesnek fogadtak el, a C locus mellett a „W" jelzést azonban meghagyták, mert a C-jelzés mellé írt arab számokkal a komplement faktorokat jelölik.

A két táblázatból láthatjuk, hogy eddig kb. 30 specifitást fogadtak el véglegesen az A, B és C locusokon, és kb. ugyanolyan számú specifitást feltételesen. A D locuson még nincsenek véglegesen elfogadott specifitások, feltételesen 11 specifitást ismernek el.

A *3. táblázat*ban egy kaukázusi népcsaládban (populációban) talált Ag-specifitásokat és a fenotípusok előfordulási százalékát mutatjuk be Rood és mtsai [27] nyomán. A populációs és családvizsgálatok rendkívül fontos adatokat szolgáltatnak az egyes Ag-specifitások öröklődésére vonatkozóan.

Az öröklődési szabályok röviden a következőkben foglalhatók össze: Mindegyik szülő mindegyik sorozatból csak egy Ag-t örökít át (lásd előbb), a szülő egyik haplotípusa, vagyis a háromféle Ag-specifitás együtt kerül át az utódba. Ez bizonyítja, hogy a három locus génjei szorosan kapcsoltak, a kromoszómán egymás közelében helyezkednek el. Nagyon kis számban írtak le rekombinációs géneket, és ezt is főként csak az A és B locusok között. A három locus ennek ellenére „individuális", vagyis a három locushoz tartozó Ag-molekulák, mint önálló polipeptidláncok vannak jelen a sejtek felületén.

A *4. táblázat*ban egy családban a két szülőtől származó, 4 különböző haplotípus öröklődését mutatjuk be 4 utódban [18]. A táblázatban bemutatott családnál, minthogy az apa és anya haplotípusai mind különbözőek,

2. táblázat

*Az elfogadott hisztokompatibilitási antigének és jelölésük a 7. Workshop után**

Table II. Terms for the accepted histocompatibility antigens as proposed in the 7th Workshop

HLA—A	HLA—B		HLA—C	HLA—D
HLA—A1	HLA—B5	HLA—Bw42	HLA—Cw1	HLA—Dw1
HLA—A2	HLA—B7	HLA—Bw44	HLA—Cw2	HLA—Dw2
HLA—A3	HLA—B8	HLA—Bw45	HLA—Cw3	HLA—Dw3
HLA—A9	HLA—B12	HLA—Bw46	HLA—Cw4	HLA—Dw4
HLA—A10	HLA—B13	HLA—Bw47	HLA—Cw5	HLA—Dw5
HLA—A11	HLA—B14	HLA—Bw48	HLA—Cw6	HLA—Dw6
HLA—Aw19	HLA—B15	HLA—Bw49		HLA—Dw7
HLA—Aw23	HLA—Bw16	HLA—Bw50		HLA—Dw8
HLA—Aw24	HLA—B17	HLA—Bw51		HLA—Dw9
HLA—A25	HLA—B18	HLA—Bw52		HLA—Dw10
HLA—A26	HLA—Bw21	HLA—Bw53		HLA—Dw11
HLA—A28	HLA—Bw22	HLA—Bw54		
HLA—A29	HLA—B27			
HLA—Aw30	HLA—Bw35			
HLA—Aw31	HLA—B37			
HLA—Aw32	HLA—Bw38			
HLA—Aw33	HLA—Bw39			
HLA—Aw34	HLA—B40			
HLA—Aw36	HLA—Bw11			
HLA—Aw43				
	HLA—Bw4			
	HLA—Bw6			

* ALBERT, E., és mtsai [1] után.

3. táblázat

*HLA antigének és a fenotípusokban megjelenő, megközelítő előfordulásuk egy kaukázusi (Swiss) népcsoportban**

Table III. HLA antigens and their approximative frequency in phenotypes belonging to a Caucasian (Swiss) ethnic group
The antigen labels are conform to those approved in the 7th Workshop

HLA—A	%	HLA—B	%	HLA—C	%
A1	27,6	B5	16,6	CW1	9,4
A2	50,6	B7	21,6	CW3	7,2
A3	25,0	B8	17,2	CW3	21,6
A9	22,4	B12	25,6	CW4	20,1
A10	9,4	B13	5,6	CW5	13,7
A11	10,6	B14	7,6		
A28	9,6	B18	10,4		
A29	7,4	B27	7,2		
AW30	5,8	B15	11,8		
AW31	2,4	BW16	7,4		
AW32	8,2	B17	8,0		
AW33	3,9	BW21	4,2		
		BW35	23,5		
		B40	8,2		

* ROOD, J. J., VAN és mtsai [27] alapján.

4. táblázat

*HLA haplotípusok öröklődése egy családban**

Table IV. Inheritance of HLA haplotypes in a family. The antigen labels are conform to those approved in the 7th Workshop

	HLA—A			HLA—B				HLA—C			Fenotípusok	Genotípusok
	A1	A2	AW32	B12	B15	B17	B27	CW1	CW4	CW5		
Apa	+	−	+	−	+	−	+	+	+	−	a/b	A1, B15, CW4/AW32, B27, CW1
Anya	+	+	−	+	−	+	−	−	−	+	c/d	A1, B17, −/A2, B12, CW5
$Utód_1$	+	−	+	−	−	+	+	+	−	−	b/c	AW32, B27, CW1/A1, B17,—
$Utód_2$	+	−	−	−	+	+	−	−	+	−	a/c	A1, B15, CW4/A1, B17, —
$Utód_3$	+	−	−	−	+	+	−	−	+	−	a/c	A1, B15, CW4/A1, B17, —
$Utód_4$	+	−	+	−	−	+	+	+	−	−	b/c	AW32, B27, CW1/A1, B17, —

* JEANETT, M. [18] után.

ezért az antigének négyféle variációban lehetnek jelen az utódokban (apa: a/b; anya: c/d; kombinációk: a/c, a/d, b/c, b/d). Ebben az esetben csak kétféle kombináció valósult meg, kétféle fenotípus. Ha az egyik szülő a családban azonos haplotípusú (a/a, mindhárom locuson homozigota; közeli rokonok vagy testvérek házassága), akkor az utódokban összesen csak kétféle fenotípus jelentkezhet (a/a + b/c = a/b, ill. a/c). De mindkét családnál — a táblázatban bemutatottnál és ebben a példában is — minden utódnak csak az egyik haplotípusa lehet azonos a szülőével. Ez a körülmény nagyon fontos annál a transzplantációnál, amikor a szülők donor voltát kell mérlegelni. Legtöbb családban a szülő és utód genotípusa nem azonos, azonosság csak akkor fordulhat elő, ha a szülő átörökített haplotípusa azonos volt (szülők: a/b + a/b; kombinációk az utódoknál: a/a, a/b, b/b). A testvéreknél $^1/_4$ arányban lehet azonos a genotípus, s ha az egyik szülő homozigóta (a/a), akkor $^1/_2$ arányban. Testvérek között lehetnek HLA identikusak (pl. a/c, a/c); haploidentikusak (pl. a/c, b/c) vagy olyanok, amelyeknek nincs közös haplotípusuk (pl. a/c, b/d); ezek egymással genetikailag olyan kapcsolatban vannak, mintha nem is volnának rokonságban.

Sok emberi populációban megfigyelték, hogy egyes Ag-specifitások együttes előfordulása (pl. A1—B8; A3—B7; A2—B12), egyes Ag-kombinációk gyakoribbak, mint amit véletlenszerű eloszlásnál várni lehet. Ez valószínűleg arra vezethető vissza, hogy a szelekció során egyes Ag-asszociációk előnyösebbek voltak (linkage disequilibrium).

A H Ag-specifitások gyakoriságának feltérképezése a különböző emberi populációkban nagyban hozzájárult antropológiai ismereteink bővüléséhez. Külön tudományág foglalkozik az egyes népcsoportoknál a gén és antigén frekvenciák vizsgálatával. Ilyen kutatások eredményeiből tudjuk, hogy bizonyos Ag-specifitások egyáltalán nem fordulnak elő egyes populációkban, míg mások előfordulásának gyakorisága sokkal nagyobb az átlagosnál. Pl. a mongoloid főrasszban az A1, A3, B7 specifitások nem fordulnak elő, de gyakori az A9—B5, A9—B40, A9—BW42 társulás. Európában az A1—B8 haplotípus gyakori, Észak-Európában az A3—B7 társulás.

A vizsgálatok szerint a valóban csak egy meghatározott populációban kimutatható, a populációra jellemző antigén specifitás frekvenciája nagyon alacsony. A legfontosabb antropológiai következtetés az utóbbi idők eredményéből az, hogy az „emberiség családfája" két egymástól jól elkülöníthető ágból indul: egyik a „Kaukazoid" és „Negroid" ág, a másik az „Ausztraloid" és „Mongoloid" ág.

b) A D locus; (Ia) LD antigének

Régóta ismert az a jelenség, hogy ha azonos fajú, de különböző genetikus hátterű limfocitákat együtt tenyésztenek, akkor a sejtek egymást kölcsönösen stimulálják, ezért 4—5 napig intenzív sejtszaporodás észlelhető, majd a sejtek elpusztulnak. Ha az egyik egyedből (A) származó sejteket a tenyésztés előtt szaporodásukban meggátolják, mitomicin-C-vel kezelik vagy besugarazzák, akkor csak a másik (B) egyedből származó sejtek fognak szaporodni a kultúrában. Az ilyen módon beállított tenyészetben 4—5 nap után olyan sejtek jelennek meg, amelyek specifikusan elpusztítják a mitomicinnel kezelt (A) egyedek, illetve velük azonos genetikai hátterű egyedekből származó sejteket. A jelenség neve: sejtmediált limfolízis (CML), illetve sejtmediált citotoxicitás (CMC). A szaporodásban gátolt sejtek a stimulátor sejtek, a válaszoló sejtek a responderek. A kevert limfocita kultúrát — az irodalomban MLC-vel (mixed lymphocyte culture) jelzett kísérleti rendszert — kiterjedten használják a sejtmediált immunválasz *in vitro* modellezésére.

Ámos és Bach mutatták ki [2], hogy a kevert limfocita reakciót szintén az MHC kontrollálja. Ha olyan testvérek limfocitáit keverik össze, amelyeknél az A, B, C locusok által definiált antigének azonosak voltak, akkor a stimuláció nem következik be. De közvetlenül mégsem az A, B, C locusok antigénjei felelősek a proliferatív válaszért, mert ha nem rokon, de azonos A, B, C antigénekkel rendelkező egyedek limfocitáit tenyésztették együtt, a stimuláció és a proliferáció bekövetkezett. Ezért feltételezték, hogy az a gén vagy azok a gének, amelyek az MLC választ szabályozzák, szintén az MHC-ben vagy annak közelében vannak, de nem azonosak a már ismert A, B, C locusokkal. Azt a locust, azt a DNS szakaszt a 6. kromoszómán, amely az MLC választ kiváltja, D locusnak jelölték; ez a locus a B locustól balra, kb. ugyanolyan távolságra van, mint a B locus az A locustól, és kívül van a szorosan vett HLA régión (*1. ábra*).

A D locus is polimorf és számos specifikus antigént határoz meg. Eddig több HLA—D allélt azonosítottak, és 11 specificitás kapott feltételes WHO jelzést: DW1—DW11 [1]. 5 új specifitást az 1977-ben tartott — elsősorban a vizsgálati módszerekkel foglalkozó — 7. „workshop"-on fogadtak el. Minthogy a D locus géntermékeit más módszerekkel lehet kimutatni (LD = = lymphocyte defined antigen), mint az SD-antigéneket, ezért várható volt, hogy a locus által meghatározott géntermékeknek másfajta szerepük van az immunrendszer aktiválásában, mint az SD-antigéneknek.

A humán MLC-ben a limfociták csak azokkal a target sejtekkel szemben citotoxikusak, amely sejteknek részben vagy teljesen azonosak a HLA antigénjei a stimulátor sejtekéivel (HLA restrikció, lásd később). A HLA azonosság mellett azonban a D locus által meghatározott antigéneknek különbözőeknek kell lenni ahhoz, hogy citotoxikus reakció bekövetkezzék, vagyis a stimu-

látor és responder sejtek között a D locus inkompatibilitása szükséges követelménye a responder sejtek toxikus tulajdonságának. A kevert limfocita reakció kontrollálásában tehát az MHC—D locusának van szerepe. A D régió géntermékei — természetesen — együtt fejeződnek ki a többi hisztokompatibilitási antigénnel, de a B locus bizonyos alléljeivel való előfordulásuk gyakoribb, mint véletlenszerű (linkage disequilibrium). Ennek a jelenségnek fontos szerepet tulajdonítanak egyes betegségek előfordulásával kapcsolatban.

A D locus géntermékei, a D-antigének elsősorban az ellenanyag-termelő B-sejtek felületén mutathatók ki, s mint B-sejt specifikus alloantigéneket definiálták őket. Az antigének kémiailag és szöveteloszlásban is különböznek az A, B, C locusok géntermékeitől.

Az irodalomban széles körű vita folyik arról, hogy az ember D régiója az egér MHC—I (immun) régiójához volna hasonlítható, s a D locus egyes géntermékei pedig hasonlatosak volnának az egér *immun asszociált* (Ia) antigénjeihez. A vita nincs lezárva, kétségtelen tény azonban az, hogy bizonyos humán Ia antigén-determinánsokat szoros kapcsolatban levőnek találtak egyes HLA—D antigén-determinásokkal.

Számos irodalmi adat mutat arra, hogy a D régió az MLR-en kívül fontos szerepet játszik a természetes és mesterséges antigének hatására kifejlődött immunválasz szabályozásában, s a D régió egyes géntermékei mint Ia-antigének funkcionálnak.

A D locus által meghatározott antigének, illetve a humán Ia-antigének biológiai funkciójának felderítése, illetve kémiai és biokémiai vizsgálata folyamatban van.

c) Komplement komponenseket kódoló gének az MHC-ben

Számos irodalmi adat bizonyítja, hogy egyes komplement komponensek (C2, C4, C8) szintézisét irányító DNS szakaszok szintén a 6. kromoszómán, az MHC-ben helyezkednek el, de a szorosan vett HLA régión kívül. Pontos helyzetüket a kromoszómán azonban nem ismerjük.

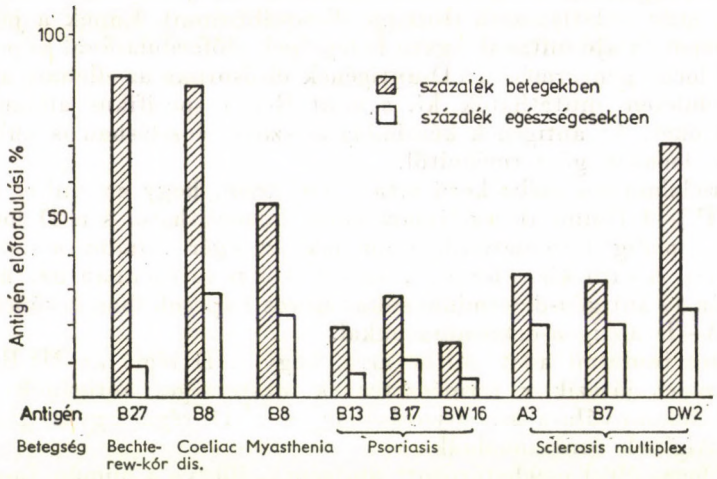
d) Betegségek és a HLA közötti kapcsolat

Széles körű populációs vizsgálat adatai alapján fel lehet tételezni, hogy valamilyen kapcsolat áll fenn egyes betegségek (immun-, autoimmun-betegségek) és bizonyos HLA antigének előfordulásának gyakorisága között, mivel bizonyos betegségben szenvedőknél meghatározott Ag-specifitások gyakrabban fordulnak elő, mint az egészséges populációban.

A legmeglepőbb, fenti feltételezést bizonyító adat az, hogy a Bechterew-kórban szenvedőknél a B27 antigént 90 %-os gyakorisággal lehet találni, míg az egészségesek között előfordulási gyakorisága csak 8—10 %. Azok az egyedek, akiknél a B27 antigén-specifitás kimutatható, a betegséget 300-szor nagyobb valószínűséggel kapják meg, mint azok, akiknél ehelyett más B specifitás található.

Sok más betegségnél (myasthenia gravis, psoriasis, sclerosis multiplex stb.) szignifikáns korrelációt találtak a betegség és egyes HLA — elsősorban B sorozatú — antigén gyakorisága között (*2. ábra*).

Fenti megfigyelések értelmezése bonyolult, és jelenleg még nem is vonhatók le végleges következtetések. Jelenleg azt a kérdést vizsgálják, hogy a D locus géntermékei (Ia antigének?) közül egyes antigének gyakorisága milyen betegség iránt jelent fogékonyságot. S minthogy egyes D (Ia?) anti-

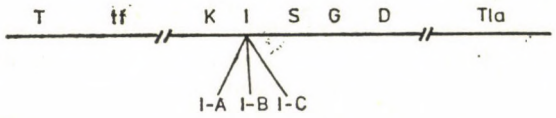


2. ábra. A HLA antigének és egyes betegségek közötti kapcsolat. JONES, L. és mtsai [19] után
Fig. 2. Relationship between HLA antigens and certain diseases

gének gyakran fordulnak elő meghatározott B locus specifitásokkal, ezért feltételezik, hogy az eddig talált B specifitások gyakorisága lényegében D (Ia?) specifitásokkal magyarázhatók. Így pl. kimutatták, hogy a sclerosis multiplex és a rheumatoid arthritis esetében a betegség meghatározott D (Ia?) antigénnel hozható kapcsolatba [13].

2. A H—2 rendszer

Az egér fő hisztokompatibilitási rendszere, a H—2 komplex, a 17. koromoszómán helyezkedik el s ez is több, szorosan kapcsolt locusból áll. Ezek mindegyike számos Ag-specifitást, számos specifikus fehérjét kódol (*3. ábra*).



3. ábra. A H-2 rendszer sematikus ábrázolása. GIU, T. J. és mtsai [14] után
Fig. 3. Schematic presentation of the H-2 system

a) K és D locus és géntermékeik

A két fő hisztokompatibilitási, szerológiailag definiált locus a K és D locus, ezek 0,5 centimorganra helyezkednek el egymástól. E locusok határozzák meg a szerológiailag kimutatható sejtfelületi antigének szintézisét. Ezek az emberi A, B, C locusok analógjai. Mindkét locusnak számos allélje van, ezek a K és D, szétváló sorozatok, amelyek a haplotípusra jellemző saját (szubtipikus) és közös (szupertipikus) specifitásokat határozzák meg. Eddig kb. 20—20 különböző saját specifitást azonosítottak mindkét locuson, különböző beltenyésztett egér törzseknél.

A K és D locusok géntermékei, mint emberben a HLA A, B, C locusának géntermékei, erős hatású transzplantációs antigének, e két locuson fennálló inkompatibilitás idézi elő legerélyesebben az átültetett graft kidobását.

Sok vadtípusú egértörzsnél vizsgálták az MHC polimorfizmusát, és számos olyan specifitást sikerült kimutatni, amelyek a beltenyésztett törzseknél nem vagy nagyon ritkán fordulnak elő. A K és D locusok polimorfizmusa sokkal nagyobb mértékű, mint amit a többi állatfajok megfelelő rendszereinél leírtak.

b) Az I. régió

Az I régió a H—2 komplexben a K és D locusok közötti DNS szakaszon helyezkedik el. Elhelyezkedésében nagyon különbözik a humán D régió elhelyezkedésétől, amely régió bizonyos szempontból analógja az egér I régiójának.

Az I régió 3 alrégióból áll, ezeket A, B, C jelzéssel említik az irodalomban. Ide sorolhatjuk még a két, újabban leírt szubrégiót, amelyeknek jelzése E, illetve J.

Az I régió géntermékeit elsősorban B-sejteken lehet kimutatni, T-sejteken sokkal kisebb mennyiségben fordulnak elő. A kevert limfocita reakcióban a T-limfociták ismerik fel a B-sejteken az I régió, valószínűen az IA alrégió géntermékeit.

Az egér MHC rendszerén belül az I régió számos olyan reakciót szabályoz, amelyekben celluláris felismerés, illetve különböző sejtkölcsönhatások szerepelnek, pl. a graft versus host reakció, a kevert limfocita reakció, a sejtmediált limfocitotoxicitás, illetve különböző kölcsönhatások a T-, B-sejtek és a makrofágok között.

A legjobban jellemzett géntermékek az Ia (immunasszociált) antigének valószínűleg az IA alrégió, illetve az IC alrégió produktumai. Eddig kb. 20-féle Ia specifitást azonosítottak különböző beltenyésztett egértörzseknél.

Az Ia antigének ellen termelt antiszérummal számos immunfunkció, illetve sokféle immunsejt produktum termelése gátolható. Ezek a jelenségek az Ia antigének sokoldalú szerepét támasztják alá az immunológiai folyamatokban. Gátolható pl. Ia antigénekkel szemben termelt antiszérummal az antigénnel *in vitro* indukált sejtproliferáció, az *in vitro* ellenanyag termelés (plaque képződés), az *in vivo* graft kidobás, valamint a T-sejt eredetű különböző helper és szupresszor faktorok termelése.

Az Ia-antigén molekula valószínűsíthető vizsgálati adatok szerint 60 000 molekulasúlyú dimer glükoprotein, amely két azonos molekulasúlyú — diszulfiddal összekapcsolt — monomérből áll. A fehérje nincs kapcsolatban sem

a K és D locusok géntermékeivel, sem a β-2-mikroglobulinnal, sem az immunoglobulinokkal. A molekula szénhidrát részének nincs szerepe az antigén tulajdonságban, csak a polipeptidláncnak, az aminosav szekvenciának. A különböző Ia-specifitású antigén molekulák aminosav szekvenciája meglehetősen különböző. Eddig két különálló Ia antigént azonosítottak biokémiailag és ezeket 2 különálló gén kontrollálja az IA és IC szubrégiókban.

c) Az immunválasz genetikai szabályozása

Az egérrel, mint kísérleti objektummal, széleskörűen vizsgálták a szintetikus polipeptid- és fehérje-antigénre adott immunválasz (Ir = immun response) genetikai szabályozását. A legtöbb esetben bebizonyosodott, hogy ezekre az antigénekre adott választ olyan gének szabályozzák, amelyek az MHC I régiójában lokalizálhatók. Először úgy tűnt, hogy egy adott antigénre bekövetkező válasz egyetlen, domináns génhez van kötve (Ir-gén = immun response gene), de később bebizonyosodott, hogy nem egy, hanem legalább két különálló gén felelős az I régión belül az immun válasz indukciójáért, bekövetkezéséért. A második DNS szakasz nincs is az MHC régióban, hanem azon kívül helyezkedik el. A vizsgálatok alapján az is valószínű, hogy a celluláris antigénekre adott immunválasz szabályozásában is szerepe van az I régiónak.

Egyáltalán nem ismert azonban az a mechanizmus, amely szerint az immunválasz „génjei" működnek. Feltételezik, hogy az Ir-gén vagy -gének T-sejtek felületén levő specifikus antigén receptorok szintézisét szabályozzák. Az antigén „felismerése" után a T-sejt az antigénnel együtt lépne kölcsönhatásba a B-sejttel, valószínűleg a makrofágok segítségével, és ez indítaná el azt az eseménysorozatot, amely végül az antitest termeléséhez vezet.

Számos próbálkozás történt abban az irányban, hogy az Ir-gén termékét (termékeit) izolálják és jellemezzék. Mind ez ideig azonban az Ir-gén termékeinek kémiai és biokémiai tulajdonságairól nincsenek megbízható ismereteink.

d) Az „S" régió

Az egér MHC rendszerén belül az S-régió egyes szérumfehérje komponensek szintézisét szabályozza. Az S-régió által kódolt Ss fehérje (serum substance) valószínűleg azonos a humán C4 komponensével. Az Ss fehérje molakulasúlya 150 000; két egyforma alegységből áll.

e) A „G" régió

A G-régiót nem régen azonosították az egér MHC rendszerben s valószínűleg a bőr-graft kidobásával kapcsolatos hisztokompatibilitási (minor) locust tartalmaz.

f) Az MHC-hez kapcsolódó „tájékozódási jelzők", markerek

A hisztokompatibilitási komplexben való „tájékozódásra" szolgálnak azok a DNS részletek a 17. kromoszómán, azok a locusok, amelyeket a komplex

két oldalán, az MHC-hez közel azonosítottak (*3. ábra*). Az egér esetében mindkét oldalon találtak ilyen markereket. A centromer felé eső oldalon van az egérnél a T locus, amely az egyed fejlődését szabályozó antigéneket, illetve a differenciálódással kapcsolatos antigéneket határozza meg. Hasznos marker a tf locus, amelynek terméke a szőrhullást előidéző recesszív mutációnál fejeződik ki. Az MHC másik oldalán van a Tla locus, amelynek antigénje elsősorban leukémiás egereknél fejeződik ki.

Az MHC géntermékeinek biokémiai és kémiai jellemzése

E fejezet összeállításánál az irodalomjegyzékben található [6, 7, 8, 9, 16, 24, 25, 31, 32, 33, 34] forrásokat használtuk.

Az MHC géntermékei a sejtmembránba beágyazott glükoproteinek, amelyek a sejtmembrán integrális részét alkotják. E molekulák szintézisét, ahogy ezt az előzőekben megismertük, az MHC különböző DNS szakaszai kontrollálják. A H—2 rendszerre vonatkozólag rekombinációs analízis szerint az MHC-ben elég információs jel (DNS, nukleotid bázis) van ahhoz, hogy a DNS kb. 2000 különböző struktúr fehérjét kódoljon, amelyek átlagban 20 000 mólsúlyúak.

Az antigének szerkezetére vonatkozó ismereteink elsősorban a szerológiailag definiált SD antigénekre korlátozódnak, ezeken belül a HLA—A és B sorozatba tartozó antigén molekulákra, illetve a H—2, K és D sorozatba tartozó antigénekre vonatkoznak. Jelen fejezetben ezeket mint H-antigéneket vagy H-molekulákat fogjuk jelölni.

Egyetlen sejten embernél maximálisan hatféle, egérnél maximálisan négyféle különböző szerkezetű H-molekula van. A H-antigének biológiai, genetikai vizsgálata és jellemzése jóval megelőzte kémiai, biokémiai jellemzésüket, mivel a szerkezetvizsgálathoz tiszta, genetikailag egységes anyag szükséges. Az utóbbi évek koncentrált vizsgálatai nyomán kialakult egy határozott, de nem teljes kép a H-antigének és részben az Ia antigének szerkezetéről és kémiai felépítéséről, amelyről rövid összefoglalást adunk.

1. Lokalizáció, izolálás

A H-molekulák szerkezetvizsgálata az egér H—2 rendszer antigénjeinek tanulmányozásával indult, minthogy egységesebb géntermék nagyobb mennyiségben való nyerésére itt volt meg a lehetőség. Az utóbbi években azonban humán eredetű limfoblaszt kultúrák alkalmazása lehetővé tette a HLA géntermékeinek nagyobb mennyiségben való előállítását és vizsgálatát is. Strominger és mtsai [33] vizsgálataikban a humán limfoblasztokat előzőleg vírussal (EBV) fertőzték; a vírussal transzformált sejteken a HLA-antigének mennyisége 20—50-szer nagyobb, mint a perifériás limfocitákon.

Az antigénmolekulák a sejtmembránba vannak beágyazva. A jelenleg elfogadott „folyadék membrán"-modell alapján úgy képzelik el, hogy a sejtmembrán fiziológiás körülmények között folyadék szerkezetű s a diszkontinuus kettős lipoid rétegbe ágyazódnak be a fehérjék, amelyek a membrán mindkét oldalán különböző mértékben ki is nyúlhatnak a lipid rétegből. A membrán 37 °C-on a lipidek és fehérjék dinamikusan változó, viszkózus

oldata. A fehérje molekulák hidrofil részei kitüremkednek a membránból, míg a hidrofób régiókat a lipid kettős réteg nagyrészben elfedi.

A membránba ágyazott fehérjék, így a H-antigének is, a sejtmembránból különböző eljárásokkal oldatba vihetők, izolálhatók. Az izoláláshoz tiszta plazmamembrán preparátumból indulnak ki. A sejtszerkezet szétroncsolása, megszüntetése után (homogenálás) ultracentrifugálással magtól, mitokondriumtól, riboszómáktól és endoplazmatikus retikulum fragmentumoktól mentes plazmamembrán preparátum nyerhető. Az ilyen plazmamembrán preparátumokat marker enzimekkel (5'-nukleotidáz, ill. K-Na-ATP-áz) és kémiai összetétel alapján jellemzik.

A H-antigének a plazmamembrán fehérjéknek kb. 0,1 %-át alkotják. Egyetlen limfocitán kb. 10^{-16} g H-antigén fehérje van. Ez a nagyon kis koncentráció mutatja, hogy milyen nagyfokú tisztításra van szükség ahhoz, hogy tiszta, homogén H-antigén fehérjét lehessen előállítani. 1000-szeres tisztítás volna az ideális, ezt még azonban eddig nem sikerült megközelíteni.

A plazmamembránból a fehérjéket a következő eljárásokkal vonják ki:

— Detergensekkel vagy organikus oldószerekkel, amelyek minden fehérjét kioldanak, ilyenkor azonban a biológiai aktivitás megszűnik.

— Proteolitikus emésztéssel, részleges enzimatikus hidrolízissel. Ezt úgy irányítják, hogy csak a membránból kiálló darab szakadjon le a membránról, ezzel az eljárással a biológiai aktivitás megmarad.

— „Kaotrop" ágensekkel, amelyek a víz „rendezett" szerkezetét megváltoztatják, s ezáltal a membrán fizikai-kémiai tulajdonságai is megváltoznak; ezzel az eljárással a biológiai funkció megmarad.

Detergensként leggyakrabban deoxicholsavat, illetve Triton X—100-at vagy Triton X—114-et alkalmaznak. Enzimként papaint, kaotróp ágensként leggyakrabban 3 M KCl-t használnak.

A membránból izolált fehérjeoldatot, amely az antigéneket is tartalmazza, a szokásos fehérjetisztítási lépéseket alkalmazva — és azokat kombinálva — tisztítják. A tisztítás egyes lépéseit az Ag-specificitás alapján ellenőrzik. Az alkalmazott eljárások a tisztításban a következők lehetnek: reverzibilis kisózás, immunprecipitáció, ioncserélő kromatográfia, gélszűrés, affinitási kromatográfia, gélelektroforézis, izoelektromos fókuszálás stb. Ezeket egymás után, váltakozva alkalmazzák.

Fenti eljárásokkal sikerült a H—2 és HLA antigének esetében egyes specifitásokat egymástól elválasztani, amely egyben azt is jelenti, hogy a különböző locusokhoz tartozó specifitások különböző molekulákat jelentenek.

A következő lépés az önálló H-molekulák aminosav összetételének, szénhidrát összetételének a megállapítása, majd a homogén termékek aminosav szekvenciájának a vizsgálata. Mint minden szekvencia vizsgálatában, úgy itt is a szekvenciaanalízis nem a teljes szekvencia felderítésével kezdődik, hanem egyes molekularészletek, peptidek szekvenciáját vizsgálják s ezekből próbálják összerakni az egész molekula szekvenciáját. Már most megjegyezzük, hogy nem ismerjük egyetlen H-molekula teljes szekvenciáját sem, csak egyes molekula fragmentumok szekvenciáit. Ebből következik, hogy a molekula térszerkezetét, konformációját sem ismerjük teljes bizonyossággal, csak olyan részleges adatokat, amelyekből következtetni lehet a térszerkezetre.

A szekvencia vizsgálatban sok „kisegítő módszert" alkalmaznak. Leggyakrabban a sejteket radioaktív aminosavval vagy szénhidráttal még az állatban *in vivo* jelzik, s ebből jelzett H-antigéneket izolálnak. Szoktak

kettős jelzést is alkalmazni, pl. ^{14}C, ^{3}H. Lehetséges az izolálás és tisztítás után, *in vitro* radioaktívan jelezni a tiszta fehérjepreparátumot. A radioaktivitás nyomon követésével egyes jelzett aminosavakat vagy jelzett szénhidrátot, a szekvencia analízis során detektálni lehet.

Nagyon fontos vizsgálati módszer, amelyet minden sejtfelületi antigén esetében gyakran alkalmaznak, az ún. „sapka" (cap)-képződés vizsgálata (lásd később). Minthogy minden sejten számos sejtfelületi antigén van, fontos volt annak a megállapítása, hogy ezek a sejt felületén külön-külön vagy egymással összekapcsolódva mozognak-e. A H-antigénekre vonatkozólag egyértelműen megállapították, hogy ezek a molekulák a sejtek felszínén egymástól függetlenül mozognak.

2. *Általános szerkezeti tulajdonságok*

A H-antigének glükoproteinek, a szénhidráttartalmuk kb. 10—20 %, az utóbbi időben azonban ezt az értéket alacsonyabbra becsülik. A fehérjetartalom ennek megfelelően 8—90 %.

Korábban feltételezték, hogy az antigén tulajdonságért a molekula szénhidrát része a felelős. Ma már teljes bizonyossággal tudjuk, hogy az antigén tulajdonságot a fehérje rész hordozza. Meggyőző vizsgálati adatok szerint a szénhidrát rész egyáltalán nem járul hozzá a molekula biológiai funkciójához, de a szerepe nem tisztázott. A HLA és H—2 antigének szénhidrát részének (molekulasúly 3500—4500) összetételét mutatjuk be az 5. *táblázat*ban.

5. táblázat
*A HLA és H-2 antigének szénhidrát összetétele**
Table V. Carbohydrate components of HLA and H-2 antigens

Vegyület	HLA, %	H—2, %
Neutrális cukor	4—6	3—4
N-acetil-glukózamin	3—5	2—3
N-acetil-galaktózamin	1	1
Sziálsav	1	1

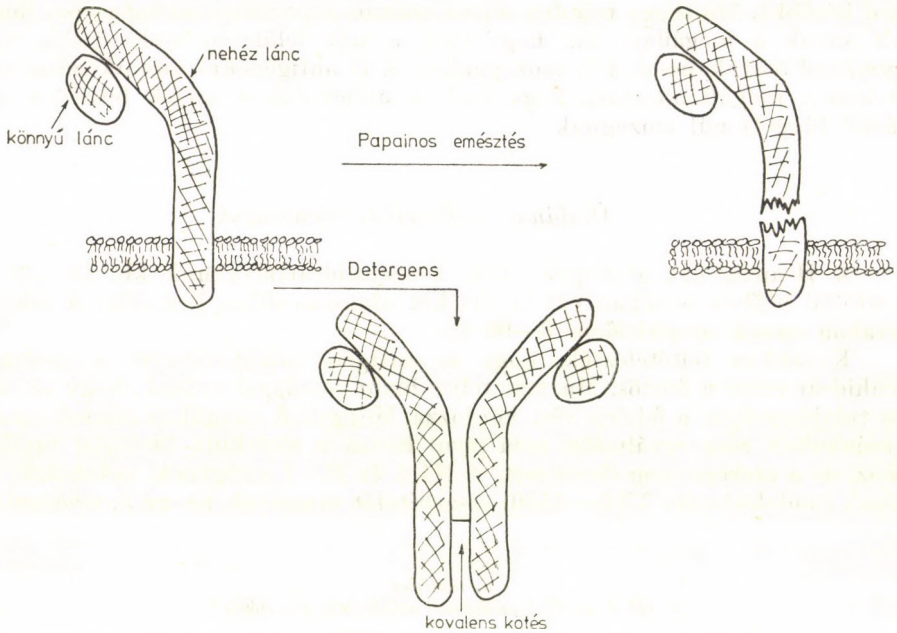
* Davies, D. A. L. és mtsai [9] után.

A H-antigén molekula monomér vagy dimér alakban van jelen a sejtek membránjában. Egy monomer — msúly: 56 000 — két polipeptidláncból áll.

A kisebb molekulasúlyú polipeptidet, a könnyű láncot (ms: 12 000) egybehangzóan a szérum β_2-mikroglobulin frakcióval azonosították, mert a polipeptidnek, amelyet β_2-mH-val jelölnek és a szérum β_2-mikroglobulin frakciójának aminosav szekvenciája rendkívül hasonló. A β_2-mH kb. 100 aminosavból álló peptid. Egy fajon belül, sőt különböző fajok között is, a β_2-mH molekulák aminosav szekvenciája rendkívül hasonlít egymáshoz. Kémiai, illetve immunológiai módszerekkel vizsgálva sem sikerült a molekulák között nagyobb különbségeket kimutatni. A β_2-mH ezenkívül aminosav szekvenciáját ille-

tően hasonló az immunoglobulin nehéz és könnyű láncainak konstans régióihoz, a C-domainekhez [7]. A β_2-mH biológiai funkciója ismeretlen.

A H-antigén molekulákban a nehéz és könnyű lánc (β_2-mH) között kovalens kapcsolat nincs, a polipeptid láncokat „harmadlagos" szerkezetet stabilizáló kölcsönhatások tartják össze. A nehéz lánc molekulasúlya: 44 000,



4. ábra. H-antigén feltárása a membránból
Fig. 4. Extraction of HLA-antigen from the cell membrane

amelyből kb. egy 10 000 mólsúlyú részlet a membránba ágyazódik, illetve a membrán papainos emésztése után sem válik szabaddá. Feltételezik, hogy a membránba nyúló peptidrészlet egy kb. 5000 mólsúlyú hidrofób részből áll, amely a membránt átéri és egy kb. 3000 mólsúlyú hidrofil végből, amely a sejt belseje felé irányul. Ez volna a C-terminális vég.

Nem eldöntött, hogy a H-antigén molekulák monomér vagy dimér alakban vannak-e jelen a membránban (*4. ábra*). Ha a sejteket detergenssel kezelik, egy viszkózus oldat nyerhető, amelyben a fehérjék csak detergens jelenlétében maradnak oldatban. Ilyen feltárás után CUNNINGHAM és mtársai [6] azt találták, hogy a H—2 antigén molekula két azonos nehéz és két azonos könnyű láncból áll. A két nehéz lánc között egyetlen kovalens kötést, egy diszulfid kötést találtak. Ez a diszulfid kötés azonban spontán oxidációval is kialakulhatott a fehérjével való manipulációk közben. Ha a detergens kezelés közben szabad —SH tartalmú reagens is jelen volt (dithiothreitol, mercaptoethanol), akkor csak monomért kaptak. Ha a diszulfid kötés létezne is, akkor is csak a membránon belüli részen kapcsolná össze a két monomért. Az azonban kétségtelen, hogy papainos hasítás után, amikor csak a „kilógó

rész" hagyja el a membránt, nem sikerült kovalens kapcsolatot kimutatni a könnyű és nehéz láncból álló monomérek között.

A primér szerkezet vizsgálatához homogén, egységes fehérjepopulációkat kell előállítani. Mivel egyetlen egyedben, akár ember, akár egér, a haplotípusoktól függően nem egyféle, hanem többféle H-antigén molekula fordul elő, ezért a legnagyobb nehézséget a konformációban hasonló, de primér szerkezetben biztosan különböző molekulák szétválasztása jelenti. Az egér H—2 antigének vizsgálatánál beltenyésztett, mindkét locuson (K, D) homozigóta egértörzsekkel dolgoznak, illetve ilyen egerek lépsejtjeivel. Az ember H-antigénjeinek vizsgálata ennél sokkal bonyolultabb, illetve nehezebb. STROMINGER [33] egy „beltenyésztett" vallásos szekta homozigóta egyedeiből származó limfocita tenyészettel dolgozott, mint HLA antigén forrással. Többek között volt egy olyan sejtsora, amelyben a sejtek csak HLA—A2 és HLA—B7 specifitású antigén molekulát termeltek. A C locus géntermékeit idáig még nem sikerült az A és B locustól származoktól elválasztani, ezért a szerkezetre vonatkozó eddigi vizsgálatokban a C-specifitásokat figyelmen kívül hagyták; egyébként ezek mennyisége sokkal kisebb a sejteken, mint a két másik locus termékeié.

Az A és B locusokon homozigóta limfocitákból sikerült homogén fehérjepopulációkat nyerni, és pl. a fenti esetben az A2 és B7 specifitásokat elválasztották egymástól.

3. A HLA—A2 és HLA—B7 antigén molekulák szerkezete

A következőkben röviden nagy vonalakban ismertetjük a HLA—A2 és HLA—B7 specifitású antigén molekulák szerkezetösszehasonlítására vonatkozó fontosabb adatokat, a vizsgálat egyes lépéseit.

A H-antigéneket a membránból két különböző módszerrel nyerték ki. *Papainos* emésztéssel a membránból „kiálló" rész válik le a sejtmembránból, amely nehézlánc-fragmentum (ms: kb. 33 000) és a β_2-mH (ms: kb. 12 000) 1 : 1 arányú keveréke. A keverékből a könnyű lánc frakció eltávolítható. A papainos emésztés után a kitermelés kb. 8 mg antigén-fehérje/100 g sejt.

Detergens kezeléssel (pl. Triton-X-100), szabad SH-tartalmú reagens jelenlétében 44 000 mólsúlyú teljes nehéz- és 12 000 mólsúlyú könnyűlánc nyerhető. A fehérjehozam ennél az eljárásnál kisebb, kb. 6,6 mg antigén-fehérje/100 g sejt.

A vizsgált sejtsornál a membrán fehérje tartalmának 1—2 %-a H-antigén-fehérje. A kivonatokat a szokásos fehérje tisztítási módszerekkel, DEAE-cellulózon és gélszűréssel (G—150), majd ismét DEAE-cellulózon tisztították. A tisztítás közben az egyes Ag-specifitásokat A2 és B7 antigének ellen termelt antitesttel vizsgálták azon az alapon, hogy a megfelelő antigén-specifitás antitest, komplement + target sejt jelenlétében az immunocitolízist gátolja. Az A2 és B7 specifitások a második DEAE-cellulózos lépésnél elváltak egymástól. Az egymástól elválasztott, kétféle fehérje homogenitását gondosan ellenőrizték.

Több különböző forrásból is előállítottak A2 és B7 specifitású homogén fehérjéket. Megállapították és összehasonlították két különböző forrásból származó A2 és B7, papainos emésztés után nyert nehézlánc preparátum aminosav összetételét, amelyet a *6. táblázat*ban mutatunk be.

6. táblázat

*RPMI 4265 és IJ limfoblasztoid sejtsorokból származó, papainnal oldatba vitt HLA—A2 és HLA—B7+B12, ill. HLA—A2 és HLA—B7 nehézláncok aminosav összetétele. mól/100 mól**

Table VI. Amino acid components of HLA—A2 and HLA—B7 + B12, as well as of HLA—A2 and HLA—B7 heavy chains derived from papain-solubilized RPMI 4265 and IJ lymphoblastoid cell lines (mol/100 mol)

Aminosav	$HLA—A2_{IJ}$	$HLA—A2_{4265}$	$HLA—B7_{IJ}$	$HLA—B7+B12_{4265}$
Asp	7,9	7,9	9,7	9,4
Thr	7,6	7,5	6,2	6,9
Ser	5,2	5,2	5,2	5,0
Glu	13,9	13,9	14,8	14,4
Pro	4,3	4,5	5,4	5,4
Gly	7,9	7,6	8,0	6,9
Ala	8,8	8,5	8,0	7,8
Val	6,3	6,4	5,0	5,0
Met	1,3	1,5	1,1	1,0
Ile	1,6	1,8	2,6	2,9
Leu	6,2	6,3	6,4	6,7
Tyr	4,8	4,7	4,5	5,3
Phe	2,9	2,9	2,3	2,4
Lys	4,2	4,3	3,7	3,6
His	4,8	4,5	3,5	3,3
Arg	7,6	7,8	8,8	9,3
Trp	3,2	3,2	3,1	3,2
CMCys**	1,5	1,6	1,6	1,7

* STROMINGER, J. L. és mtsai [33] után.
** karboxil-metil cystein

A kétféle fehérje nehéz láncának aminosav összetétele rendkívül hasonló, kisebb eltérést csak az Asp, Pro és Ile esetében tapasztaltak. A kétféle forrásból származó A2 és B7 molekulák aminosav összetétele gyakorlatilag azonosnak mondható.

Az aminosav analízis eredményéből számítással nyerhető „hasonlósági index" [33] szerint a vizsgált kétféle HLA—A2 molekula, illetve a kétféle HLA—B7 molekula aminosav összetétel szempontjából gyakorlatilag azonos, és az A2 és B7 molekulák is nagyon szoros rokonságban állnak egymással; ezzel szemben az A2 és B7 molekulák nehézlánca semmi rokonságban nincs a megfelelő könnyűláncokkal, a β_2-mH molekulákkal.

Az aminosav szekvencia vizsgálatához az egymástól elválasztott A2 és B7 nehézlánc fragmentumokat különböző proteolitikus enzimekkel kisebb peptidekké hasítják (tripszin, pepszin stb.). A nyert peptidek kromatográfiás profiljának az összehasonlítása már sokat elárul a primér szerkezetről (lásd később). Fontos lépés a szekvencia analízisben annak a megállapítása, hogy van-e diszulfid kötés, és ha van, hány darab mutatható ki az érintetlen molekulákban, illetve a proteolitikus hasítás után nyert fragmentumokban. A részletes szekvencia analízis előtt a talált diszulfid kötéseket szabad —SH csoportokká redukálják, s a termékeket úgy alakítják át (pl. karboximetilezés), hogy a spontán visszaoxidációt megakadályozzák.

A rendszeres szekvencia vizsgálatot az enzimatikus emésztés után nyert és egymástól elválasztott kisebb fragmentumokkal végzik el.

7. táblázat

*HLA és H—2 N-terminális nehézlánc fragmentumok részleges aminosav sorrendje**

Table VII. Partial amino acid sequence of HLA and H—2 N-terminal heavy chain fragments

		5				10						15						20						25				
HLA-A	A_2	Gly	Ser	His	Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Arg	Pro	Gly	Arg	Gly	Glu	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	Val	Gly	Tyr
	A_{12}		Ser		Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Phe	Thr	Ser	Val	Ala	Arg	Pro	Gly											
HLA-B	B_7	Gly	Ser	His	Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Thr	Ser	Val	Ser	Arg	Pro	Gly	Arg	Gly	Glu	Pro	Pro	Phe	Ile	Ala	Val	Gly	Tyr
	$B_{8,13}$		Ser		Ser	Met	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Val	Ser	Arg	Pro	Gly											
H-2D	D^b		Pro				Arg	Tyr				Ala	Val		Arg	Pro		Leu			Pro	Arg	Tyr				Leu	Tyr
	D^d	Met		His		Leu	Arg	Tyr	Phe	Val	Thr	Ala	Val	Thr	Arg	Pro												
H-2K	K^b		Pro	His		Leu	Arg	Tyr	Phe	Val	Thr	Ala	Val		Arg	Pro		Leu			Pro	Arg	Tyr				Leu	Tyr
	K^d	Met	Pro	His			Arg	Tyr			Thr	Ala			Arg	Pro					Pro	Arg	Phe					Tyr
	K^k	Met	Pro	His		Leu	Arg	Tyr	Phe	His		Ala	Val		Ile	Pro		Leu		Lys	Pro	Phe	Ala					Tyr

Főantigének / Variánsok

▨ HLA-A, HLA-B ill. H-2K; H-2D-ben közös aminosavak

* Cunningham, B. A. [6] után. Kiegészítés: Parham, P. és mtsai [25], valamint Terhorst, C. és mtsai [34] alapján.

A 7. *táblázat*ban négy különböző emberi, illetve öt különböző egér eredetű H-molekulának az N-terminus felé eső, 27 aminosavból álló szekvenciáját mutatjuk be.

Feltűnő az, hogy sok hasonlóság van az aminosavak sorrendjében. Pl. a 6., 7., 12., 14., 15. helyeken levő aminosavak mindenhol azonosak.

Az A2 és B7 molekulák esetében [25] megállapították a szénhidrogén oldalláncok összetételét, illetve pozícióját. E vizsgálatnál a papainos nehézlánc fragmentumot különböző glükozidázokkal fokozatosan emésztették, amely kezelés a szénhidrát oldalláncot teljesen lebontotta és csak a glükopeptid kötésben levő szénhidrát maradt meg a polipeptid láncban. Ilyen hasítás után szénhidrátként N-acetil-glukózamint tudtak detektálni. A szénhidrát asparagin γ-N-hez kapcsolódott (a glükoproteinekben nagyon gyakori az asp-NH_2-höz kötött szénhidrát). A „szénhidrátmentes" termékek — az A2 és B7 esetében — antigén tulajdonságaikat megtartották, jeléül annak, hogy az antigén tulajdonságot nem a szénhidrát, oldallánc hordozta.

A glükozidázzal kezelt fehérjét ezután mindkét molekulánál tripszinnel kezelték; az enzim arg-lys aminosavak mellett bont. A hasítás után nyert peptideket egymástól elválasztották és szénhidrát tartalomra analizálták. Csak egyetlen triptikus peptid tartalmazott szénhidrátot, a fent említett N-acetil-glukózt. Ezzel bebizonyosodott, hogy csak egyetlen szénhidrát oldallánc van mindkét molekulában, s a szénhidrát oldallánc aszparagin γ-N-hez kapcsolódik. A következőkben megállapították, a szénhidrát oldallánc cukor összetételét. A papainos emésztés utáni, 44 000 molekulasúlyú nehézlánc fragmentumokat most egy másik proteázzal, a pronázzal hosszabb ideig

emésztették. Az enzim a teljes peptidláncot aminosavakká hidrolizálta, csak egyetlen aminosav maradt a termékben, az asp-NH_2, amelyhez a szénhidrát oldallánc kapcsolódik.

A *8. táblázat*ban a pronázos emésztés után nyert, egyetlen aminosavat tartalmazó glükopeptid szénhidrát összetételét mutatjuk be:

8. táblázat

*Az A2 és B7 antigének szénhidrát-oldalláncának összehasonlítása: a pronázos emésztés után nyert glükopeptidek szénhidrát összetétele (mól szénhidrát/mól aszparagin).**

Table VIII. Carbohydrate side chains in antigens A2 and B7. Carbohydrate components of glycopeptides obtained after digestion with pronase

Szénhidrát	A2	B7
Sziálsav	2—3	2—3
Mannóz	3,1	3,0
Fukóz	1,8	1,7
Galaktóz	4,1	4,0
Glukózamin	3,9	4,0

*Parham, P. és mtsai [25] után.

A szénhidrát oldalláncok molekulasúlya sziálsav nélkül 2200—2400; sziálsavval együtt, amelynek mennyisége változó, 2700—3200. Az oligoszacharid oldallánc mindkét molekulánál 15—16 szénhidrát egységből áll, az oldallánc galaktózamint nem tartalmaz (ez rendkívül érdekes!).

A parciális aminosav szekvencia analízishez szintén triptikus peptideket, mégpedig a szénhidrát tartalmú triptikus peptidet használták. Az A2 és B7 molekulák triptikus glükopeptidjeinek aminosav szekvenciáját összehasonlították (*9. táblázat*). Az A2 triptikus glükopeptid 15 db, a B7 triptikus glükopeptid pedig 25 aminosavból áll. A szekvencia 1—15-ig a két peptidben azonos; 2 helyen fordul elő kölcsönös ser-thr csere, tehát a szénhidrát kapcsolódási helyének környezetében a két molekula teljesen homológ szekvenciájú. A triptikus glükopeptid aminosav összetétele nem mutat hasonlóságot sem a glükophorinnal, sem a ribonukleázzal, sem az Ig konstans régiójával az asp-NH_2-X $\frac{\text{ser}}{\text{thr}}$ szekvencia részlettől eltekintve, amely minden asparagin γ-N-hez kötött szénhidrát kapcsolódásnál megtalálható.

Egybevetették a két szekvenciát mindkét molekula N-terminális szekvenciájával. Ha a triptikus glükopeptidek 9. aminosavához illesztették a két N-terminális fragmentum N-terminusát, akkor nagymértékű homológiát tapasztaltak. Feltűnő, hogy a gly-ser-his-ser szekvencia mindkét molekulában s mindkét fragmentumban megtalálható. A B7 triptikus glükopeptidben 17 aminosav közül 7 azonos helyzetű az N-terminális peptidek aminosavjaival.

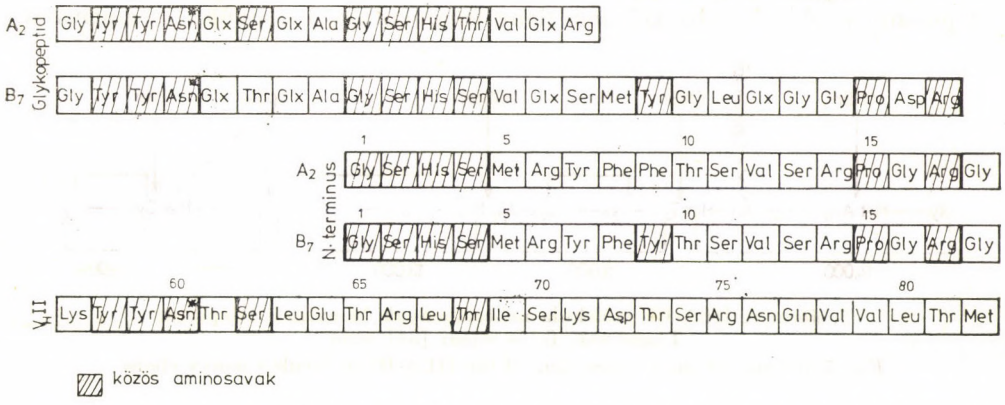
Az ismertetett vizsgálatok meggyőzően bizonyítják, hogy a különböző H-molekulákban, illetve ugyanazon molekula 2 különböző szakaszában ismétlődő homológ szekvenciák találhatók.

Összefoglalva az A2 és B7 molekulákra vonatkozó összehasonlító szerkezetvizsgálatok eredményeit, a következőket állapíthatjuk meg:

9. táblázat

*Aminosav szekvenciarészletek az A2 és B7 triptikus glükopeptidjében, az A2 és B7 N-terminusában, valamint az immunoglobulin nehézlánc variábilis régiójában***

Table IX. Fragments of the amino acid sequence in A2 and B7 tryptic glycopeptides, A2 and B7 N-terminals and in the variable region of the immunoglobulin* heavy chains



γ, mieloma Cor (II szubtípus) nehézláncának variábilis régiója = V_H II. A peptidfragmentum a glüzilálás helyén — Asn — illeszkedik a triptikus glükopeptidhez.

* Variable region of the heavy chain of — myeloma Cor:V_HII. The peptide fragment joins the tryptic glycopeptide at the site of glycosilation (Asn*).

** PARHAM és mtsai [25] adatai alapján.

1. A kétféle antigén-specifitás két önálló molekulához tartozik.

2. A két molekula szénhidrát oldalláncai szénhidrát összetétel szempontjából azonosak. A szénhidrát oldalláncnak nincs szerepe az antigén tulajdonság fenntartásában.

3. A glükopeptid kötés körüli aminosav szekvenciák azonosak.

4. Az aminosav összetétele mindkét molekulának azonos, de ez nem jelent teljes azonosságot a primér szerkezetben.

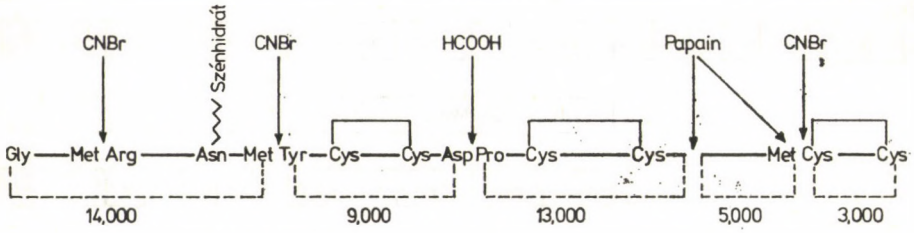
5. Mindkét molekula különböző fragmentumaiban találhatók homológ és találhatók különböző szekvenciák is. A két molekula fragmentumaiban észlelt eléggé kiterjedt szekvenciakülönbség nem korlátozódik a molekulák meghatározott részére, hanem eloszlik a polipeptid lánc mentén. Úgy tűnik, hogy nincs „variábilis" és „konstans" régió a polipeptid láncokban, hanem rövidebb homológ szekvenciák váltakoznak különböző szekvenciákkal.

Mint említettük, nem ismerjük egyetlen H-molekulának sem a teljes aminosav szekvenciáját, melynek ismeretében a térszerkezetét modellezni lehetne. Kialakult azonban az utóbbi időben egy olyan szerkezeti elképzelés, amely az immunoglobulinokkal való részleges hasonlóságra épül, s amelyet röviden ismertetünk.

A vizsgálatok a humán B7 molekula szerkezetével kapcsolatosak [34]. Szerzők tiszta, közel homogén, B7 specifitású fehérjét tanulmányoztak és papainnal szolubilizált nehézlánc fragmentumokkal, ill. detergenssel oldatba vitt nehézláncokkal dolgoztak. A molekulát kisebb fragmentumokra hasították hangyasavas kezeléssel, valamint bróm ciánnal, s a kapott termékeket

egymástól elválasztották. Az izolált kisebb fragmentumoknak meghatározták a molekulasúlyát, s parciális szekvencia analízist végeztek, valamint megállapították a polipeptidláncban a szénhidrát oldallánc kapcsolódási helyét, a diszulfid kötések számát és helyét (*5. ábra*).

E vizsgálatok eredményei röviden a következőkben foglalhatók össze: A papainnal oldatba vitt B7 nehézlánc fragmentum 3 nagyobb szegmensből



5. ábra. A HLA-B7 molekula nehézláncának sematikus felépítése
TERHORST, C. és mtsai [34] után

Fig. 5. Scheme of the construction of the HLA-B7 molecule's heavy chain

áll. Az első (molekulasúly: kb. 14 000) hordozza az eredeti polipeptid lánc N-terminusát és kb. 100 aminosavból épül fel. Az egyetlen szénhidrát oldallánc ehhez a részhez kapcsolódik, ebben a szegmensben diszulfid kötés nincs. Ennek N-terminális végén az első 25 aminosav szekvenciáját részben már korábban ismerték (lásd előbb). A triptikus glükopeptid, amelynek szekvenciáját szintén felderítették, szintén ebben a szegmensben van. A második szegmens (molekulasúly: kb. 9000) és a harmadik szegmens (molekulasúly: kb. 13 000) egy-egy diszulfid kötést tartalmaz. Az első és második fél-cisztin, illetve a harmadik és a negyedik fél-cisztin között kb. 60—60 aminosav helyezkedik el. A detergenssel oldatba vitt nehézlánc, a fentieken kívül még tartalmazza azt a láncrészletet, amelynek egy 5000 molekulasúlyú hidrofób szakasza a sejtmembránba van ágyazva és egy 3000 molekulasúlyú hidrofil szakasza a sejtbe benyúlik. A 3000 molekulasúlyú részen szintén van egy diszulfid kötés.

Hangyasavval a nehézlánc az N-terminustól számozott, harmadik fél-cisztin körül hasad. Szerzők a hasítás helye körül tanulmányozták az aminosav szekvenciát. A harmadik fél-cisztin körüli aminosav szekvencia nagyfokú hasonlóságot mutatott több immunglobulin nehézláncban a variábilis régiónak a fél-cisztin körüli aminosav szekvenciáival. A részleges homológia alapján feltételezhető, hogy a H-antigén molekulák az immunglobulinokhoz hasonló térszerkezettel rendelkeznek. A diszulfid kötések a lánc bizonyos részeit hurokban rögzítik s így a polipeptidlánc tekeredése (foldingja) hasonló lehet az immunglobulin molekulában fellépő, a jellegzetes szerkezetet adó „folding"-hoz. A hasonló térszerkezet a kétféle molekula biológiai funkciójára vonatkozólag is fontos következtetéssel járna.

A szekvenciában feltárt részleges homológia alapján feltételezhető, hogy az immunglobulin nehézláncok és a H-antigének nehézláncai valamikor közös „ősmolekulákból" származtak. Határozott következtetést azonban erre vonatkozólag még nem lehet levonni. Egyébként már előzőleg is voltak az immunglobulinokkal való rokonságra utaló jelek. A β_2-mikroglobulin

esetében pedig kétségtelenül bizonyított az, hogy szekvenciája hasonló az immunglobulin konstans „domainjeinek" szekvenciájához [7, 32].

Újabb és az eddigiekben érintett vizsgálatok szerint a H-molekula extracelluláris része két darab, diszulfid-hidakkal zárt hurkot alkot, valamint egy nem hurokba zárt kb. 100 aminosavból álló N-terminális szegmenst. Mindegyik hurokba zárt polipeptid szegmens kb. olyan hosszúságú, mint az immunglobulinok „domainjeinek" diszulfidokkal kialakult hurkai. A H-molekula extracelluláris részében mindkét diszulfid híd körüli aminosav szekvencia nagy homológiát mutat az immunglobulin nehézlánc variábilis régiójában a 95. aminosavmaradékhoz kapcsolódó, diszulfid híd körüli aminosav szekvenciával. A hurokba nem zárt, terminális szegmens aminosav szekvenciája is hasonló a hozzá megfelelő módon illesztett Ig nehézlánc variábilis régiójának aminosav szekvenciájához. Ezért feltételezik, hogy a H-molekula extracelluláris része legalább kettő, de inkább három, egymással kölcsönösen homológ „domain"-ből áll, s ezek jelentős homológiát mutatnak az Ig-vel. A „domainek" közül kettő ugyanúgy diszulfid kötéssel kialakított hurokban van, mint az Ig „domainjei". Érdekes azonban az a különbség, hogy a hasonló szekvencia részletek nem ugyanarra a helyére kerülnek a molekulának, mert az Ig-ben a homológ szekvenciák a „hurokba" kerülnek, míg a H-molekuláknál a hurkok között foglalnak helyet. A jelentős különbség azt is mutathatja, hogy a hasonlóság inkább látszólagos, mint reális.

A fáradságos és széles körű, a szerkezetre vonatkozó vizsgálatok ellenére egyik H-molekulánál sem sikerült idáig azonosítani azokat az aminosav szekvencia részleteket, amelyek közvetlenül felelősek volnának az alloantigén specifitásért. A jelenlegi helyzet alapján úgy tűnik, hogy ez a közeljövőben nem is sikerül. Megpróbálták azonban a molekulában fellelhető s a felderített homológ szekvenciák mellett a kiterjedten kimutatható szekvencia variációt kapcsolatba hozni a vázolt és újonnan felismert „domain"-szerű szerkezetekkel. Feltételezik, hogy a H-molekulák komplex (saját és közös antigén-specifitások) antigén tulajdonsága onnan származik, hogy a „domain"-ekben egymástól függetlenül jelentkeznek a szekvencia különbségek s nagyon valószínű, hogy az alloantigén aktivitással kapcsolatos szekvencia variációk a molekula több részén is kimutathatók lesznek.

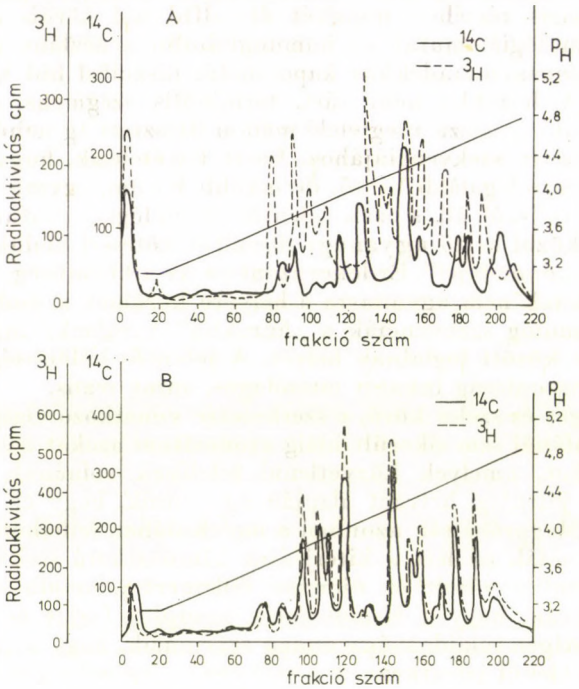
Bár a H-molekulák és az immunoglobulinok variábilis régiói között részleges homológia mutatható ki, illetve a β-2-mikroglobulin és az immunoglobulin konstans régiója közötti homológia bizonyított, jelenleg nincs semmi bizonyíték arra, hogy a limfociták általi antigén felismerés specifitását a H-molekula variábilis szekvenciáinak kellene tulajdonítani.

4. A H—2 antigének szerkezete

A H-antigének szerkezetére vonatkozó áttekintésünkben humán eredetű fehérjékkel végzett vizsgálatokra támaszkodtunk. A szerkezeti vizsgálatok azonban párhuzamosan haladnak humán és egér limfocita membránból nyert antigén fehérjékkel. Más állatfajok fehérjéit idáig ilyen szempontból nem nagyon tanulmányozták. Az egér és humán fehérjékkel végzett analitikai eredmények egymást kölcsönösen kiegészítik.

A kétféle eredetű H-fehérjék, a H—2, ill. a HLA antigének az összehasonlító szerkezeti vizsgálatok szerint nagymértékben hasonló, azonos szerkezeti elvek szerint felépülő, rokon molekuláknak tűnnek.

A H—2 antigének szerkezetével bővebben nem foglalkozunk, csak néhány lényegesebb kísérleti eredményt említünk meg. A H—2 antigének esetében is részletesen vizsgálták különböző egértörzsekből származó K és D alloantigének N-terminális, kb. 30 aminosavból álló fragmentumának aminosav szekvenciáját. Az allotípusokban levő különbségek jól tükröződnek a szekvenciában,



6. ábra. **H-2 géntermékek triptikus peptidjeinek összehasonlítása***

Fig. 6. **Comparison of tryptic peptides in H-2 gene products**

A: H-2K^b és H-2K^d

·····: ^{3}H-arg-jelzett H-2.31 triptikus peptid; egér: B10,D2 (H-2K^d)

——: ^{14}C-arg-jelzett H-2.33 triptikus peptid; egér: B10 (H-2K^b)

·····: ^{3}H-arg-labeled H-2.32 tryptic peptide Mouse: B10,D2 (H-2K^d)

——: ^{14}C-arg-labeled H-2.33 tryptic peptide Mouse: B10 (H-2K^b)

B: H-2K^k és H-2D^k

·····: ^{3}H-arg-jelzett H-2.32 triptikus peptid; egér: C3H (H-2K^k)

——: ^{14}C-arg-jelzett H-2.32 triptikus peptid: egér: AKR (H-2D^k)

·····: ^{3}H-arg-labeled H-2.32 tryptic peptide Mouse: C3H (H-2K^k)

——: ^{14}C-arg-labeled H-2.32 tryptic peptide Mouse: AKR (H-2D^k)

* Nathenson, S. G. és mtsai [24] után

egyes aminosavak kölcsönös felcserélődésében. Egy allél sorozaton belül 10 aminosav közül legalább egy különböző a 30 tagú peptid esetében. Ha az egyik locuson (K vagy D) mutagénnel mesterséges mutációt indukálnak, a mutáns állatból származó antigén molekula 30 aminosavból álló N-terminális

fragmentumában átlagban csak egy aminosav cserélődik ki, ami alapjában véve kis változásnak tűnik. Ennek ellenére az eredeti és a mutáns állatból származó limfociták az MLC-ben egymást stimulálják.

Az egérből származó H-molekulák triptikus peptidjeinek összehasonlítása is érdekes adatokat szolgáltat a szerkezettel kapcsolatban. Egyik erre vonatkozó vizsgálatban [24] pl. egybevetették az azonos génsorozatok különböző alléljei által meghatározott fehérje molekulák (pl. H-2K^b — H-2K^d), illetve azonos haplotípusú K és D gének alléljei által meghatározott (pl. H-2K^d — — H-2D^d) fehérjék triptikus peptidjeinek kromatográfiás profiljait.

Ilyen kísérleti eredményt mutatunk be a *6. ábrá*ban.

Az ábrából megállapítható, hogy egy gén különböző alléljeinek géntermékei (*6.A ábra*) jellegzetes, egymástól nagymértékben különböző molekulát képviselnek. Rendkívül érdekes azonban az, hogy egy génsorozat két különböző alléljének terméke között a hasonlóság sokkal kisebb, mint két különböző, de azonos genotípusú törzsből származó géntermék között (*6.B ábra*).

A H—2 antigénekre vonatkozó fenti eredmények jól beilleszthetők a HLA antigének szerkezetéről kialakult képbe.

A MHC (HLA, H—2) biológiai funkciója, H—2-, HLA-restrikció

E fejezet összeállításánál az irodalomjegyzékben található [3, 4, 11, 15, 17, 20, 21, 23, 29, 30, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43] forrásokat használtuk.

A szerológiailag definiált hisztokompatibilitási antigéneknek a biológiai funkcióját a graft-kidobásban viszonylag hamar felismerték. De gyanították, hogy az MHC-nek nem csak az a kizárólagos szerepe, hogy az allograft kilökését eredményező immunológiai folyamatot szabályozza. Később bebizonyosodott, hogy az MHC D régiójának, illetve I régiójának géntermékei fontos szerepet töltenek be a „kevert limfocita reakcióban", s ezt a reakciót a reagáló egyedek HLA típusa megszabja. Majd az is ismertté vált [20, 21], hogy a thymus eredetű (T-) és az AB-t termelő (B-) sejtperkurzorok közötti kölcsönhatásokat egérben a H—2 génkomplex „korlátozza", azaz „helper"-aktivitás *in vivo* csak akkor lép fel, ha a T- és B-sejteknek legalább egy H—2 antigén sorozatuk közös.

Az MHC általános biológiai szerepét és jelentőségét bizonyítják azok a felismerések [3, 11, 23, 30, 36, 39], amelyek szerint a citotoxikus T-killer sejtek aktivitása is H—2, illetve HLA „restrikció" (korlátozás) alatt áll. Ezek a kísérleti megfigyelések forradalmasították az immunológiai ellenőrzésről (surveillance) kialakult általános képet. A sejtek DNS-ében a bázisszekvenciát befolyásoló mutagén hatások közvetve megváltoztatják a sejtek felületét. A vírus vagy „daganat" által transzformált sejtet, vagy bármilyen káros mutációval járó idegen antigén által előidézett változást a sejtek felületén a keringő limfociták egy meghatározott populációja felismeri. E sejtek állandóan lekopogtatják a szervezet szöveteit és sejtjeit és ha egy „defektív" megváltozott sejttel találkoznak, akkor megindul a „megváltozott saját" sejt kiküszöbölése.

Az allograft kidobása és a megváltozott saját sejtek elleni védekezésnél azonban a felismerésben különbség van: a graft kidobásnál az idegen sejt

HLA vagy H—2 rendszerét ismeri fel a szervezet védekező rendszere (a T-killer sejt), míg a másikban a saját H—2, illetve HLA antigéneket hordozó sejteken a vírusra vagy más ágensre jellemző komponenst.

ZINKERNAGEL és DOHERTY [36—39] vizsgálatai (egereken) egyértelműen bizonyították, hogy a „pusztító" citotoxikus T-sejtek csak azokat a vírussal fertőzött sejteket ismerik fel és pusztítják el, amelyeknek a H—2 antigénjei közül legalább egy specifitás azonos a pusztító T-sejt H—2 antigénjével. Tehát nem kizárólag a vírus antigénje ellen irányul a T-killer sejtek aktivitása, hanem a H—2 gén komplex „korlátozza" (megszabja) a T-sejtek és a vírussal fertőzött sejtek közötti kölcsönhatást. A citotoxikus T-sejtnek a vírus antigént is és a saját H—2 antigénjét is fel kell ismernie ahhoz, hogy a vírussal fertőzött sejtet „kiküszöbölhesse".

A kísérlet röviden a következő: vírus ellen immunizáltak különböző H—2 típusú egereket; 7 nap után a lépsejtek citotoxikus aktivitását vizsgálták *in vitro*-teszttel meghatározott H—2 típusú, vírussal fertőzött egér fibroblasztokkal, mint célsejtekkel szemben. Csak azok az immun lépsejtek voltak hatásos „pusztító" sejtek, amelyeknek legalább egyik H—2 antigénjük azonos volt a célsejtekkel.

SCHRADER, EDELMANN és CUNNINGHAM [29] igazolták, hogy a H—2 restrikció ráksejtekkel, mint célsejtekkel kapcsolatban is fennáll.

Majd az is bebizonyosodott, hogy a „fő hisztokompatibilitási komplex" emberben is megszabja a citotoxikus T-sejtek aktivitását, vagyis a HLA restrikció embernél is bizonyítást nyert [11, 23]. Az ezt bizonyító egyik kísérletet röviden ismertetjük: influenza vírussal fertőztek — *in vitro* — perifériás limfocitákat, a vírus antigén jelenlétét a sejteken bizonyították. E sejteket stimulátor sejtként alkalmazták *in vitro* szenzitizálásnál, 5—8 napig 37 °C-on szenzitizáltak. Az indukált citotoxikus sejtet frissen preparált perifériás limfocitákon mint target sejteken vizsgáltak, melyeket szintén vírussal fertőztek. A vizsgálatok szerint a citotoxikus sejtek elsősorban azokat a vírussal fertőzött célsejteket pusztították el, amelyeknek közös antigén specifitásai voltak a citotoxikus sejtekkel (*10. táblázat*). Vagyis részleges HLA azonosság kell ahhoz, hogy a vírussal fertőzött célsejteket a citotoxikus sejtek elpusztítsák. Mennél nagyobb mértékű az azonosság a citotoxikus sejt és a target sejt haplotípusa között, a lízis mértéke annál kifejezettebb.

Az első vizsgálatokat és eredményeket számos hasonló követte s most már kétségtelenül bizonyított, hogy mind emberben, mind egérben és minden más vizsgált állatnál is, a „fő hisztokompatibilitási gén komplex" s ezen belül egyes meghatározott locusok általános biológiai funkciója az, hogy biztosítsa a szervezet védekező rendszere felett az „ellenőrzést". A védekezés elsősorban nem az idegen antigén, hanem az idegen antigén által megváltoztatott saját ellen irányul. A védekezésben a „megváltozott saját" struktúrák felismerése döntő szerepet játszik. Kérdéses azonban az, hogy a pusztító sejtek „duális" specifitását, vagyis azt a tulajdonságukat, hogy az idegen antigént és a saját antigénjeiket egyszerre kell felismerniük, milyen módon magyarázhatjuk, illetve milyen módon szerzik meg a kettős specifitást.

A duális specifitás magyarázatára két egymástól alapvetően különböző hipotézis van: egyik szerint a T-sejtnek egyetlen receptora van s ez a megváltoztatott, az idegen antigén által módosított saját H-antigént ismeri fel, a másik feltevés szerint a T-sejten két receptor van, egyikkel a saját hisztokompatibilitási antigént, a másikkal az idegen antigént érzékeli. Az iroda-

lomban széles körű vita van a kérdéssel kapcsolatban s a kérdésre jelenleg egyértelműen nem lehet válaszolni.

ZINKERNAGEL [37] régebbi, valamint SCHRADER, EDELMANN és CUNNINGHAM [29] vizsgálatai azt a feltevést támogatják, hogy a citotoxikus T-sejt egyetlen felismerő receptorral rendelkezik, amellyel az exogén antigén által módosított saját antigént érzékeli. A „hibrid" antigén a kétféle szer-

10. táblázat
*HLA restrikció**

Table X. HLA-restriction

	A vírussal fertőzött target sejtek lízise, %		
	J. D. 3,7,W2/2,7,W2	F. P. 3,7,W2/1,8,—	F. W. 1,8,—/1,8,W3
Citotoxikus sejtek			
C.W.(9,7,W2/9,7,W1)	43	30	5
F.W.(1,8—/1,8,W3)	6	16	23

Az antigének jelzése: HLA A, B, D antigének, számokkal.
* A. J., MCMICHAEL és mtsai [23] után.

kezetű molekula asszociációjával keletkezik a sejtmembránon, amire bizonyítékot az ún. limfocita sapka képződési kísérletek adnak [29]. A kísérletet érdekessége miatt röviden ismertetjük. Specifikus anti-H—2, valamint antivírus ellenanyagok előállítása után a kétféle ellenanyagot két különböző, fluoreszkáló festékkel jelezték. Majd az adott H—2 specifitású sejteket megfertőzték az adott vírussal, s a fertőzött sejteket először a specifikus anti-H—2 ellenanyaggal keverték össze. Kezdeti homogén felületi fluoreszcencia után a sejtek egyik pólusán a fluoreszkáló ellenanyag „sapka" formában rendeződött. Ezután a sejtekhez keverték az anti-vírus-, más színű festékkel konjugált ellenanyagot. A két különböző színű fluoreszcencia ugyanazon „sapkaszerű" képződményben volt a legintenzívebb.

ZINKERNAGEL [40, 41] rendkívül bonyolult újabb vizsgálatai azt a feltevést részesítik előnyben, amely szerint a pusztító T-sejteknek két, egymástól független receptoruk van: egyikkel a saját, a célsejttel közös antigén-specifitást érzékelik, a másikkal az exogén antigént.

A H-restrikcióra vonatkozó vizsgálatok közül nagy jelentőségűek azok, amelyek a restrikció specifitásának „kifejlődésére" vonatkoznak [4, 40—44]. Ezek szerint a T-sejtek saját antigént felismerő képessége, a restrikció specifitása az exogén antigén távollétében, a thymusban fejlődik ki annak a környezetnek a hatására, amelyben a T-sejt a prekurzor T-sejtekből differenciálódik. A thymus epithel sejtjeinek H—2 típusa szabja meg a különböző differenciálódó sejtek számára azt, hogy milyen saját H-antigént fognak majd felismerni, s ez független a citotoxikus effektor sejtek saját H—2 típusától. A bizonyító kísérleteket komplexitásuk miatt nem ismertethetjük.

Ha az egér H—2 rendszerére vonatkozó vizsgálatok emberi anyaggal is elvégezhetők s a fenti feltevés beigazolódik, akkor lehetővé válik az, hogy immundeficiens betegeket inkompatibilis thymus epitheliummal funkcioná-

lisan helyreállítsanak. A sejtek átvitele után a betegben funkcionálisan ép, differenciált T-sejtek keletkeznének. A helyreállítás sikere csak attól függ, hogy a donor és recipiens egyedeknek legyen legalább egy közös HLA—A, —B vagy —D antigénjük.

IRODALOM

1. Albert, E., Amos, D. B., Bodmer, W. F., Ceppelini, R., Dausset, J., Kissmeyer-Nielsen, F., Mayr, W., Payne, R., Rood, J. J. van, Terasaki, P. I., Trnka, Z. and Walford, R. L. (1978) Nomenclature for factors of the HLA system 1977. *Transplantation*, **25**, 272—275.
2. Amos, D. B. and Bach, F. H. (1968) Phenotypic expression of the major histocompatibility locus in man (HL—A): leucocyte antigens and mixed leucocyte culture reactivity. *J. Exp. Med.*, **128**, 623—634.
3. Bevan, M. (1975) The major histocompatibility complex determines susceptibility to cytotoxic T cells directed against minor histocompatibility antigens. *J. Exp. Med.*, **142**, 1349—1364.
4. Bevan, M. J. (1977) In a radiation chimera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature*, **269**, 417—418.
5. Bodmer, W. F., Bodmer, J., Adler, S., Payne, R., Bialek, J. (1966) Genetics of 4 and LA human leococyte groups. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **129**, 673
6. Cunningham, B. A. (1977) The structure and function of histocompatibility antigens. *Sci. Amer.*, **237**, 96—107.
7. Cunningham, B. A., Wang, J. L., Berggård, I. and Peterson, P. A. (1973) The complete amino acid sequence of β_2-microglobulin. *Biochemistry*, **12**, 4811—4822.
8. Cunningham, B. A., Henning, R., Schrader, J. W., Milner, R. M., Reske, K. and Edelman, G. M. (1976) Structure and biological activity of H-2 antigens. *In:* Katz, D. H. and Benacerraf, B. (eds.): *The role of products os the histocompatibility gene complex in immune responses.* Acad. Press., New York, 667—676.
9. Davies, D. A. L. and Hess, M. (1977) Gene products of the major histocompatibility complex: biology and chemistry. *In:* Marshof, J. W. (ed.): *Handbuch der allgemeinen Pathologie.* Springer Verlag, 39—103.
10. Dausset, J. and Nenna, A. (1952) Présence d'une leucoagglutinine dans le sérum d'un cas d'agranulocytose chronique. *C. R. Soc. Biol.*, **140**, 1534
11. Dickmeis, E., Soeberg, B. and Svejgaard, A. (1977) Human cell-mediated cytotoxicity against modified target cells is restricted by HLA. *Nature*, **270**, 526—528.
12. Dóbiás Gy. (1977) Az emberi szervátültetések immunbiológiai vonatkozásai. *Az Orvostudomány Aktuális Problémái*, **27**, 41—82.
13. Fachet J. (1978) Az immunválasz genetikai szabályozása. *A Biológia Aktuális Problémái*, **12**, 191—258.
14. Gill, T. J., Cramer, D. V. and Kunz, H. W. (1978) The major histocompatibility complex comparaison in the mouse, man and the rat. *Amer. J. Physiol.*, **90**, 737—777.
15. Gordon, R. D., Simpson, E. and Samelson, L. E. (1975) *In vitro* cell-mediated immune responses to the male specific (H-Y) antigen in mice. *J. Exp. Med.*, **142**, 1108—1120.
16. Howard, J. C. (1978) H-2 and HLA antigen structure. *Nature*, **271**, 607—608.
17. Howard, J. C. (1978) H-2 restriction, the thymus and the immune response. *Nature*, **272**, 11—13.
18. Jeanette, M. (1977) The main histocompatibility system in man. *In:* Marshof, J. W. (ed.): *Handbuch der allgemeinen Pathologie.* Springer Verlag, 1—38.
19. Jones ,L. and Barnstable, C. (1977) Function of the immune genes. *New Scientist*, **76**, 280—282.
20. Katz, D. H., Hamoaka, T. and Benacerraf, B. (1973) Cell interactions between histocompatible T and B lymphocytes. II. Failure of physiological co-operative interactions between T and B lymphocytes from allogeneic donor strains in humoral response to hapten-protein conjugates. *J. Exp. Med.*, **137**, 1405—1420.
21. Kindred, B. and Schreffler, D. C. (1972) H-2 dependence of co-operation between T and B cells *in vivo*. *J. Immunol.*, **109**, 940—943.
22. Kissmeyer-Nielsen, F. (1977) International histocompatibility testing workshop 1977. *Nature*, **270**, 664—665.
23. Michael, Mc., A. J., Ting, A., Zweerink, H. J. and Askonas, B. A. (1977) HLA restriction of cell-mediated lysis of influenza virus-infected human cells. *Nature*, **270**, 524—526.

24. Nathanson, S. G., Brown, J. K., Ewenstein, B. M., Rajan, T. V., Freed, J. H., Soares, D. W., Mole, L. E. and Scharff, M. D. (1976) Studies on the chemical basis of variability and the complex cellular expression of the H-2K and H-2D products. *In:* Katz, D. H., Benacerraf, B. (eds.): *The role of products of the histocompatibility gene complex in immune responses.* Acad. Press, New York. 647—664.
25. Parham, P., Alpert, Barbara, N., Orr, H. T. and Strominger, J. L. (1977) Carbohydrate Moiety of HLA antigens. Antigenic properties and amino acid sequences around the site of glycosylation. *J. Biol. Chem.*, **252,** 7555—7567.
26. Payne, R., Tripp, M., Weigle, J., Bodmer, W. and Bodmer, J. (1964) A new leucocyte isoantigen system in man. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **29,** 285
27. Rood, J. J. van, Leenwen, A. van, Termijtelen, A. and Keunung, J. J. (1976) The genetics of the major histocompatibility complex in man, HLA. *In:* Katz, D. H. and Beacerraf, B. (eds.): *The role of products of the histocompatibility gene complex in immune responses.* Acad. Press, New York. 31—58.
28. Schreffler, D. C., Meo, T. and David, Ch. S. (1976) Genetic resolution of the products and functions of I and S region genes of the mouse H-2 complex. *In:* Katz, D. H., Benacerraf, B. (eds.): *The role of products of the histocompatibility gene complex in immune responses.* Acad. Press, New York. 3—29.
29. Schrader, J. W., Cunningham, B. A. and Edelman, G. M. (1975) Functional interactions of viral and histocompatibility antigens at tumor cell surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72,** 5066—5070.
30. Shearer, G. M. (1974) Cell-mediated cytotoxicity to trinitrophenyl-modified syngeneic lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **4,** 527—533.
31. Silver, J. and Hood, L. (1976) Genetic and evolutionary implications of the partial amino acid sequences of H-2K and H-2D alloantigens. *In:* Katz, D H. and Benacerraf, B. (eds.): *The role of products of the histocompatibility gene complex in immune responses.* Acad. Press, New York. 677—689.
32. Solheim, B. G. and Thorsky, E. (1974) β-2-microglobulin is part of the HL-A molecule in the lymphocyte membrane. *Nature*, **249,** 36—38. ;
33. Strominger, J. L., Chess, L., Humphreys, R. E., Mann, D., Parham, D., Robb, R., Schlossman, S., Springler, T. and Terhorst, C. (1976) Isolation and structure of products of the human histocompatibility gene complex. *In:* Katz, D. H. and Benacerraf, B. (eds.): *The role of products of the histocompatibility gene complex in immune responses.* Acad. Press, New York. 621—643.
34. Terhorst, C., Robb, R., Jones, C. and Strominger, J. L. (1977) Further structural studies of the heavy chain of HLA antigens and its similarity to immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74,** 4002—4006.
35. Wigzell, H. (1965) Quantitative titration of mouse H-2 antibodies using ^{51}Cr-labelled target cells. *Transplantation*, **33,** 423—431.
36. Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. (1974) Restriction of *in vitro* T-cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a synegeneic or semiallogeneic system. *Nature*, **248,** 36—38.
37. Zinkernagel, R. M. (1974) Restriction by the H-2 gene complex of the transfer of cell--mediated immunity to Listeria monocytogenes. *Nature*, **251,** 230.
38. Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. (251) Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature*, **251,** 547—548.
39. Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. (1975) H-2 compatibility requirement for T-cell mediated lysis of target cells infected with lymphocytic chroriomeningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D. *J. Exp. Med.*, **141,** 1427—1436.
40. Zinkernagel, R. M., Klein, J. and Dennert, G. (1978) Cytotoxic T cells learn specificity for self H-2 during differentation in the thymus. *Nature*, **271,** 251—253.
41. Zinkernagel, R. M., Callahan, G. N., Althage, A., Cooper, S., Klein, D. A. and Klein, J. (1978) On the thymus in the differentation of „H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition? *J. Exp. Med.*, **147,** 882—896.
42. Zinkernagel, R. M., Callahan, G. N., Althage, A., Cooper, S., Streilein, J. W. and Klein, J. (1978) The lymphoreticular system in triggering virus plus self-specific cytotoxic T cells: evidence for T help. *J. Exp. Med.*, **147,** 899—911.
43. Zinkernagel, R. M., Althage, A., Cooper, S., Kreeb, G., Klein, P. A., Sefton, B. Flaherty, L., Stimpfling, J., Schreffler, D. and Klein, J. (1978) Ir-genes in H-2 regulate generation of anti-viral cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.*, **148,** 592—606.

BIOCHEMICAL ASPECTS OF THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX

Maria T.-Szabó
First Institute of Biochemistry, Semmelweis University
Medical School Budapest, Hungary

The biochemical aspects of the major histocompatibility complex (MHC) are reviewed on the basis of comprehensive and research reports selected from the vast literature available on this primarily biological topic, to furnish biochemists with basic information about the problems in which the concept of MCH is relevant.

The review consists of four parts. The introductory part deals with the general biological characteristics of MHC, and with nomenclatural problems. Part two informs about the genetic background and genetic aspects of MCH. The human HLA system is described with regard to the loci A, B and C, and their gene products, and to locus D and LD antigens. Certain hypothetical relationships between HLA antigens and some immune diseases are discussed. A brief description is presented of the murine H-2 system, of the loci K and D, and their respective gene products. A brief reference is also made to the regions I, S and G.

The chemical and biochemical characteristics of the gene products of MHC are described in part three, which also contains information on the general characteristics of the antigenic pattern, and on comparative structural studies of HLA-A2, HLA-B7 and H-2 antigen molecules. In part four the biological function of MHC, and restriction of the HLA and H-2 systems are reviewed on the basis of literary data.

Biológia, **26**, *1978*, *139—151*

SZÉRUMFAKTOROK ÉS PROLIFERÁCIÓS REGULÁTOROK SZINERGIZMUSA SEJTKULTÚRÁKBAN

BALÁZS ANDRÁS, FARKAS ALFRÉD, BLAZSEK ISTVÁN és KLUPP TIBOR
MTA Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézet, Budapest

Beérkezett: 1978. július 28-án

Kulcsszavak: endogén inhibitor, sejtkultúra, szérumfaktor, sejtproliferáció

Bevezetés

A proliferáció endogén regulátorainak (PER) *in vitro* vizsgálata során tapasztaltuk, hogy aktivitásuk eltérő módon érvényesül kémiailag definiált, illetve szérummal komplementált médiumban. A jelenséget több szerző észlelte, de csupán érintőlegesen vizsgálta.

A szérum egyes PER molekulák aktivitását *fokozza*, pl. a fibroblast növekedési faktorét (FGF) [11, 16] és egyéb szövettenyészetben ható ágensekét [13]. Más endogén molekulák aktivitását a szérum *csökkenti*, pl. az epidermális G_2-inhibitorét [9], a fibroblast chalonét [14, 15], limfocita gátlófaktorokét [2, 17, 24]. Az ALLEN és mtsai [1] által izolált thymus-frakció gátló hatása fetális borjúsavóban (FBS) dózis-függően érvényesült, humán szérumban hatástalan. A granulocita chalon antagonistáját leukapheresises szérumból állították elő [23].

A szérum-PER szinergizmust létrehozó faktorokat, stöchiometriájúkat, hatásmechanizmusukat szisztematikusan nem vizsgálták. Megismerésük lényeges, mert (a) magyarázhatja az *in vitro—in vivo* proliferációs kísérletek [10] eltéréseit és (b) befolyásolhatja a sejtkultúrákban észlelt specificitási vizsgálatok eredményeit [3].

A PER-szérumfaktor szinergizmus kvantitatív elemzésére a laboratóriumunkban izolált két semicrud extraktumot használtuk fel. A granulocita eredetű GCE oligospecifikus, G_1 támadáspontú, reverzibilis hatású proliferációs inhibitorokat tartalmaz [4, 5, 7]. A thymocytából izolált T_4-1 ugyancsak oligospecifikus, reverzibilisen gátló, $4—7 \cdot 10^4$ daltonos, termostabilis, tripszin-rezisztens, feltehetően savas fehérje-RNS komplex molekula. A normál sejteken túl mindkét extraktum gátolja a homológ transzplantábilis, ill. spontán akut leukémiák (patkány sAML, sALL és humán AML, ALL) proliferációját is [6].

Anyagok és módszerek

Kísérleteinkhez 84 normál és 10 sALL-ás hím Wistar patkány szerveit használtuk fel. A normál állatokat 40 g testsúly elérésekor, a sALL-s patkányokat a transzplantáció utáni 15. napon dekapitáltuk és csonvelőjüket, thymusukat és lépüket in vitro vizsgálatokhoz preparáltuk. A PHA-val történő stimulációhoz friss, defibrinált sertésvért használtunk.

Sejtkultúrák készítése: A patkányok bal femorális csontvelőjét, kötőszövetes elemeitől megtisztított thymusát, ill. lépét TC—199-es médiumban (OKI, Budapest) szuszpendáltuk. A defibrinált sertésvért 3%-os zselatinnal ülepítettük, Ficoll-Isopaque grádiensen (Pharmacia, Uppsala és Nyegaard and Co., Oslo) centrifugáltuk, a kapott 98% tisztaságú limfocitákat kétszer mostuk és 10 μg/ml PHA—P-vel (Difco Lab., Detroit) stimuláltuk. A TC-199 médiumot 0—20% fetális borjúsavóval (FBS; Gibco, Biocult, Glasgow), saját készítésű homológ sertéssavóval (HSS) és kevert humán AB savóval (KHS, OVSZ, Budapest) komplementáltuk. A csontvelő-kultúrák sejtszáma 3×10^6, a thymusé és lépé 5×10^6, a PHA stimulált limfocitáké 2×10^6 volt mililiterenként; meghatározásuk Picoscale automata részecskeszámlálóval (Medicor, Budapest) történt. A szuszpenziós kultúrákat 4—38 óráig 37 °C hőmérsékletű termosztátban inkubáltuk.

A hatóanyagok előállítása: A granulocitákból és limfocitákból izolált GCE, ill. T_4-1 frakciókat a korábbiakkal egyező módon [6] preparáltuk. Röviden: a heparinozott lóvért spontán szedimentáltuk, a vörösvértesteket 0,85 %-os NH_4Cl-lal hemolizáltuk, a granulocitákat homogenizáltuk, 105 000 g-vel centrifugáltuk és liofilizált felülúszóját (GCE) 300 μg/ml koncentrációban alkalmaztuk. A T_4-1 preparálása borjú thymus deszt. vizes homogenizátumából történt, melyet 43 000 g-vel centrifugáltunk, a felülúszót 42 %-os etanollal precipitáltuk, majd szupernatánsát dializáltuk, liofilizáltuk, és Sephadex G—75-ön frakcionáltuk. A V_0 térfogatnál levált T_4-1-et liofilizálva $1—8 \times 10^2$ μg/ml koncentrációban használtuk fel. Fehérjetartalmukat HARTREE szerint határoztuk meg.

A szarvasmarha pankreászból előállított inzulint (Sigma, St. Louis) 1—100-, a propranololt (Imperial Chem. Ind., Macclesfield) 0,001—30,0-, a hidrokortizont (Δ^4 pregnen-11β, 17α, 21-triol-3,20-dione; Sigma, St. Louis) 0,01—50 μg/ml koncentrációban alkalmaztuk.

Radiokémiai eljárás: A sejtkultúrák proliferációját, az előzőkhöz hasonlóan [7] a ^{3}H-TdR-nek savoldhatatlan DNS-be történő beépülésével regisztráltuk. A normál thymocyta-, csontvelő-, lép- és sALL-ás lép-szuszpenziók esetében a tenyésztés 3—4., 7—8., ill. 11—12. órájában, PHA-stimulált limfocitáknál a 18—20., 24—26., 30—38. órában ^{3}H-TdR pulzusjelzést alkalmaztunk (1—2 μCi/ml; spec.akt.: 19,5 Ci/mM, UWVR, Prága). A radiokémiai feldolgozás a korábbiakban leírt módon CHOU és mtsai módszerével történt; a sejtek radioaktivitását Packard Tri Carb folyadékszcintillációs spektrométerrel határoztuk meg. A görbéken feltüntetett mérőpontok 6—10 paralel meghatározás középértékei ($\bar{x}$), melyhez esetenként a S.E. és szignifikancia (p) értékeket is megadtuk.

Kísérleti eredmények

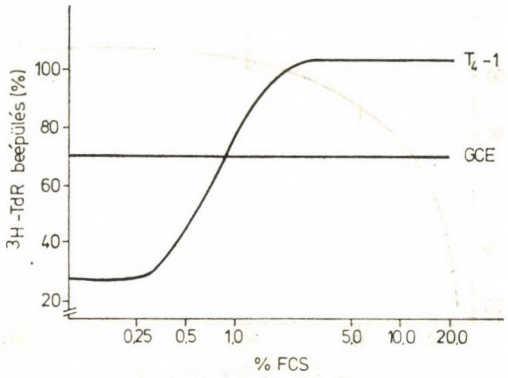
A vizsgált granuloid és limfoid extraktumok gátló hatása eltérő módon érvényesült a szérummal (FBS, HSS, KHS) komplementált médiumokban.

A GCE inhibitorainak aktivitását (*1. ábra*) 0,25—20,0 % FBS hozzáadása nem módosítja. A T_4-1 300 μg/ml-es koncentrációban szérummentes TC-199 médiumban a ^{3}H-TdR savoldhatatlan DNS-be történő beépülését 72,3 %-kal csökkenti. 0,3—3,0 % FBS a gátló hatást dózisfüggően antagonizálja. A szérumkoncentráció további, 20 %-ig történő növelése a kontrollal azonos szintű sejtproliferációt (= 100 %) nem módosítja.

Az inhibitor-mentes, FBS-el kiegészített kontroll kultúrák dózis-hatásgörbéi (*2. ábra*) azt mutatják, hogy a GCE target csontvelősejteknek ^{3}H-TdR beépítését a szérum hozzáadása alig módosítja. Ezzel szemben a T_4-1 target thymocyták proliferációját már 0,25—1,0 % FBS is jelentősen megemeli.

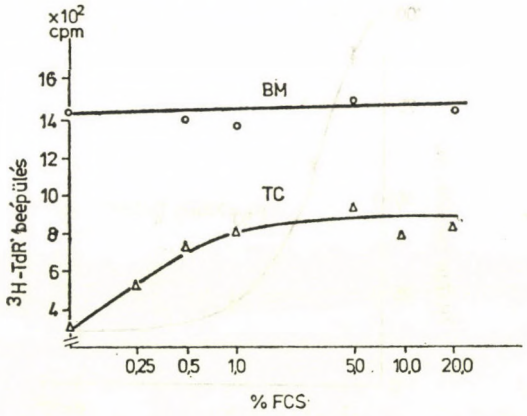
Megvizsgáltuk, hogy a szérumfaktor milyen *időfüggésben* antagonizálja a T_4-1 endogén inhibitort. Kitűnt (*3. ábra*), hogy a FBS csak előzetes vagy egyidejű hozzáadás esetén függeszti fel *teljesen* a gátló hatást. A T_4-1 bevitele után 12 perccel az antagonizálás már csak 50%-os, 60 perc után megszűnik a neutralizáció, de oly módon, hogy a T_4-1 gátlás érvényesülése mellett a szérumfaktor stimuláló hatását továbbra is kifejti.

A kvantitatív viszonyok megállapítása céljából elemeztük a gátló hatás dózisfüggését konstans szérum-szint mellett (*4. ábra*). 100—800 μg/ml T_4-1



1. ábra. Granuloid (GCE) és limfoid (T_4-1) eredetű proliferációs inhibitorok aktivitása a szérumkoncentráció függvényében

Fig. 1. Activity of granulocyte-derived (GCE) and lymphocyte-derived (T_4-1) proliferation inhibitors versus serum concentration



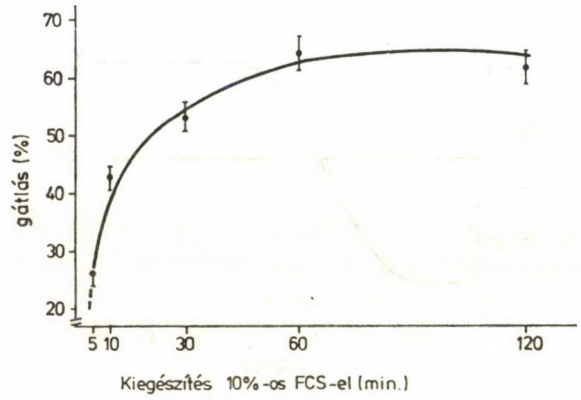
2. ábra. Különböző koncentrációjú FBS hatása csontvelő (○) és thymocyta (△) szuszpenziós kultúrák ^{3}H-TdR beépítésére

Fig. 2. Effect of different FCS-concentrations on ^{3}H-TdR incorporation in bone marrow (○) and thymocyte (△) suspension cultures

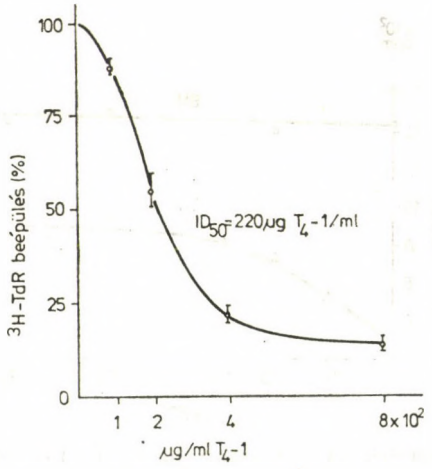
1 % FBS jelenlétében a ^{3}H-TdR-beépülést fokozatosan csökkenti; az $ID_{50} = 220$ μg T_4-1/ml. A szérum, illetve inhibitor dózis-hatás görbéi alapján a sztöchiometrikus viszonyok grafikusan ábrázolhatók (*5. ábra*). A számítások alapján az $ID_{50} = 22$, az $ID_0 = 12$ μg T_4-1/μl FBS.

Kérdéses volt, hogy a gátlás szérumdependenciája más limfocita rendszereken is érvényesül-e. Ebből a célból PHA-stimulált sertésvér nyiroksejtek ^{3}H-TdR beépülését vizsgáltuk 95 % TC-199 és 5 % FBS-t, ill. HSS-t tartalmazó médiumban. 2—2 órás pulzusjelzéssel mérve a kontroll tenyészetek DNS szintézise a stimuláció utáni 18—38^h intervallumban közelítően lineárisan nő (*6. ábra*).

A T_4-1 ebben a rendszerben szérum jelenlétében is kifejti blasztogenezist gátló aktivitását (FBS > HSS). Mégis, a szérum antagonizáció itt

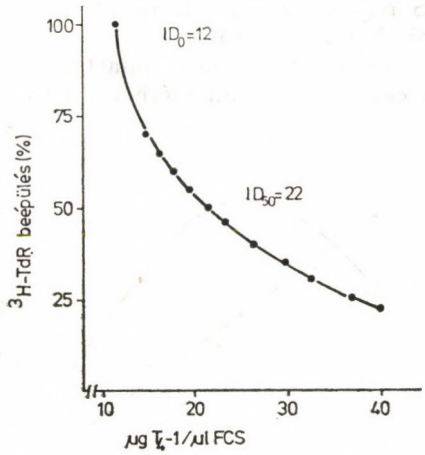


3. ábra. A T_4-1 inhibitor aktivitásának időfüggése az FBS-sel történő komplementálás során
Fig. 3. Time-dependence of T_4-1 inhibitor activity during completion with FCS

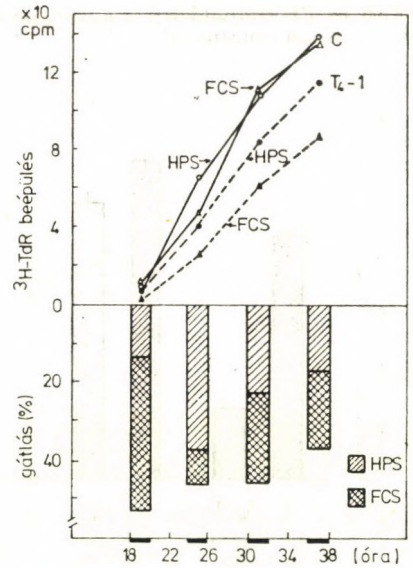


4. ábra. A T_4-1 inhibitor dózis-hatásgörbéje 1 % FBS jelenlétében
Fig. 4. Dose-response curve for the T_4-1 inhibitor in the presence of 1 % FCS

is érvényesül (7. *ábra*). 5 % FBS jelenlétében 300 μg/ml T_4-1 a 22—24 ^{h}-ban mérve 62,9 %-kal csökkenti a PHA-stimulált limfociták ^{3}H-TdR savoldhatatlan DNS-be való épülését. Ennél alacsonyabb szérumkoncentráció kevésbé, magasabb erősebben antagonizál (1% FBS jelenlétében a T_4-1 gátlás 88,2 %, 20 % FBS tartalomnál 46,0 %). Az antagonizáló hatás tehát PHA stimulá-



5. ábra. **A szérum-faktor (FBS) és proliferációs inhibitor (T_4-1) sztöchiometriája**
Fig. 5. **Stoichiometric relationship of the serum factor (FCS) with the proliferation inhibitor (T_4-1)**

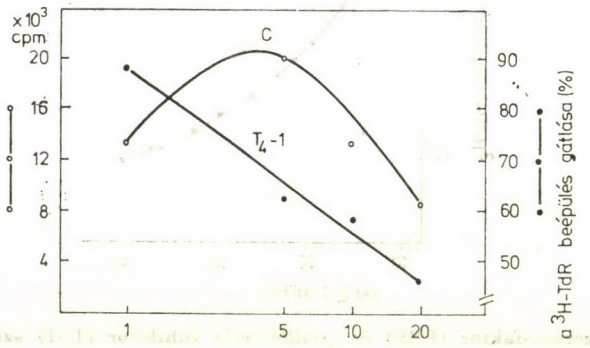


6. ábra. **PHA-stimulált limfociták ^{3}H-TdR beépítésének gátlása T_4-1 hatására 5 % FBS, ill. HSS jelenlétében. 120 perces pulzusjelzések az inkubáció 18—38. órájában**
Fig. 6. **Inhibitory effect of T_4-1 on ^{3}H-TdR incorporation by PHA-stimulated lymphocytes in the presence of 5 % FCS or HPS. 120-min pulse label at 18—38 hr of incubation**

ciónál is lineárisan érvényesül, de nem teljes. Tisztázni kívántuk, hogy ennek oka a target sejt minőségében, az inkubáció időtartamának eltéréseiben vagy más faktorban kereshető.

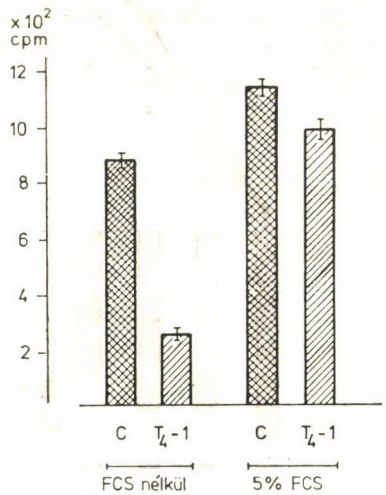
A thymocitákon és vér limfocitákon kívül a csontvelő (*8. ábra*), normál lép és sALL-ás lép sejtjei ugyancsak szenzitívek az egyébként szelektív hatású T_4-1 inhibitorra. A fenti rendszereken létrehozott proliferációs gátlásokat azonban >10 % FBS teljesen antagonizálja. A korreláció tehát feltehetően nem függ a target sejtek minőségétől.

Mivel a hosszú preszintetikus fázis miatt a PHA-stimulált limfociták DNS-szintézis gátlása csak $>16^h$ után mérhető, a thymocyta szuszpenziókat



7. ábra. PHA-stimulált limfociták ^{3}H-TdR beépítése az inkubáció 22—24. órájában, a szérum koncentráció függvényeként (C = Kontroll)

Fig. 7. Incorporation of ^{3}H-TdR by PHA-stimulated lymphocytes at 22—24 hr of incubation, versus serum concentration (C = Control)



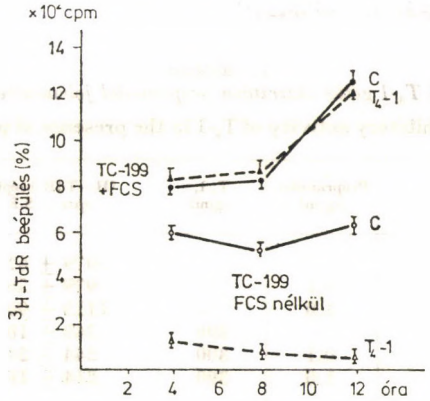
8. ábra. A T_4-1 gátlóhatása TC-199 médiumban, ill. 5 % FCS-sel kiegészített közegben patkány csontvelősejtek ^{3}H-TdR beépítésére

Fig. 8. Inhibition by T_4-1 of myelocytic ^{3}H-TdR incorporation in TC-199 medium with and without 5 % FCS

viszont a 3—4[h]-ban végzett pulzusjelzéssel teszteltük, megvizsgáltuk, hogy az antagonizálás különbségeit nem az idő függvényeként végbemenő inhibitor-szérumfaktor disszociáció okozza-e. Ebből a célból a szuszpendált thymocytákat FBS jelenlétében és anélkül tovább tenyésztettük és a 7—8., valamint a 11—12. órában mértük ^{3}H-TdR beépülésük változásait. Kiderült (*9. ábra*), hogy szérummentes közegben a T_4-1 gátlás $>12^h$-n át tart, és azt 5 % FBS végig antagonizálja.

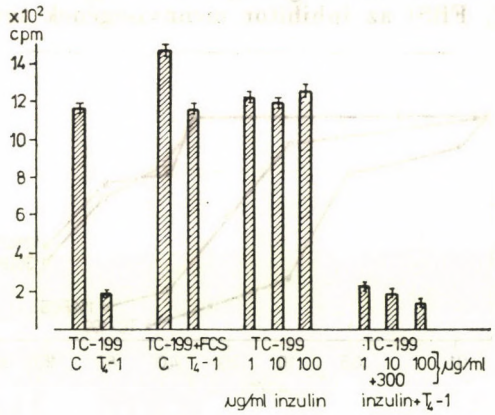
A továbbiakban a szérumfaktor kémiai-biológiai *paramétereinek és hatásmechanizmusának* ismeretéhez gyűjtöttünk adatokat.

Kimutattuk, hogy az antagonizáló faktort a borjú- és sertésszérumon kívül kevert humán AB savó is tartalmazza. Nem azonos az inzulinnal,



9. ábra. A proliferációs gátlás és szérumdependencia időtartama kémiailag definiált, ill. FBS-sel komplementált médiumban tenyésztett thymocytákon

Fig. 9. **Duration of proliferation inhibition, i.e. serum dependence on thymocyte cultures in chemically defined and in FCS-completed growth media**



10. ábra. Thymocyta szuszpenzió ^{3}H-TdR beépülésének változása T_4-1, ill. inzulin hatására szérummentes és FBS-sel kiegészített médiumban

Fig. 10. **Alterations of thymocytic ^{3}H-TdR incorporation by T_4-1 and insulin in media with and without FCS**

amely a vizsgált rövid idejű rendszerben (3—4.^{h}-ban alkalmazott ^{3}H-TdR pulzusjelzés) 1—100 μg/ml koncentrációban nem módosította a thymocyták proliferációját (*10. ábra*), és nem kompenzálta a 300 μg/ml T_4-1 okozta 84,3 %-os gátlóhatást. A faktor termostabilis, mert 56 °C-on 30 perces hőkezelés után teljesen, 100 °C-on 1 órán át forralva nagyrészt (89,4 %) megőrizte aktivitását. A FBS-t 1×10^4 áteresztőképességű Visking membránnal kimerítő dialízisnek vetettük alá; a retentát teljes mértékben megőrizte neutralizáló kapacitását, a dializátum viszont hatástalanná vált. Valószínűsítettük, hogy a szérum nem a β-adrenerg receptorok közvetítésével antagonizál. A receptorokat ugyanis 0,1—1,0 μg/ml propranololllal blokkoltuk, s ez a koncentráció, amely önmagában nem módosítja szignifikánsan a thymocyták proliferációját, nem függesztette fel a T_4-1 gátlást, és nem módosította a szérumfaktor antagonizáló hatását (*1. táblázat*).

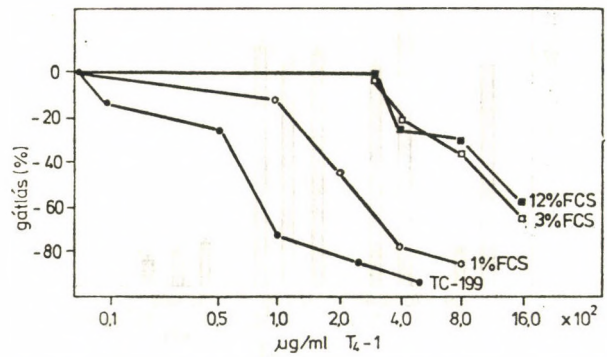
1. táblázat
A T_4-1 gátló-aktivitása propranolol jelenlétében

Table 1. Inhibitory activity of T_4-1 in the presence of propranolol

Kezelés	Propranolol, μg/ml	T_4-1, μg/ml	^{3}H—TdR beépülés, cpm ± S.E.	Gátlás, %
Kontroll	—	—	1079 ± 62	—
Propranolol	0,1	—	979 ± 56	9*
Propranolol	1,0	—	1113 ± 90	—
T_4-1	—	300	348 ± 18	68
Propr. + T_4-1	0,1	300	244 ± 24	75
Propr. + T_4-1	1,0	300	214 ± 18	78

* $p > 0,2$

A szérumfaktor-inhibitor antagonizmus természetére és hatásmechanizmusára vonatkozóan újabb adatokat nyújtottak a magas T_4-1 koncentrációkkal végzett kísérletek. Megvizsgáltuk, hogy a szérum telítési koncentrációjánál (3% FBS) az inhibitor mennyiségének további növelése fel-



11. ábra. A szérumfaktor és inhibitor kompetíciójának érvényesülése thymocytákon. ^{3}H-TdR pulzusjelzés az inkubáció 3—4. órájában

Fig. 11. Expression of serum factor — inhibitor competition in thymocytes. ^{3}H-TdR pulse label at 3—4 hr of incubation

oldja-e a neutralizációs effektust. 0,8, ill. 1,6 mg/ml T_4-1 dózisokkal a ^{3}H-TdR beépülés újra gátolhatónak bizonyult. Ez a szuperponált, dózisfüggő gátló-aktivitás azonban már nem ellensúlyozható a szérumkoncentráció további növelésével (*11. ábra*).

A kvantitatív viszonyok összegezéséből kitűnik, hogy a szérumfaktor stimuláló és neutralizáló hatása nem párhuzamosan érvényesül. A szérum már 0,25—0,5 %-os koncentrációban is 40—60 %-ban stimulálja a thymocyták DNS szintézisét. Az inhibitort antagonizáló hatás ilyenkor még nem, vagy alig érvényesül. A FBS koncentráció további, 2—3 %-ig történő emelése a ^{3}H-TdR beépülést már alig fokozza, a közepes ($2—3 \times 10^2$ μg/ml) T_4-1 dózisok neutralizációja mégis itt éri el csúcspontját: az inhibitor-szérumfaktor kompetícióban utóbbi válik dominánssá. Ennél magasabb FBS komplementáció a ^{3}H-TdR beépülését már nem növeli; a serkentés limitált. Az inhibitor magasabb dózisainak ($4—16 \times 10^2$ μg/ml) gátló-aktivitása viszont ismét fokozatosan érvényesül: a kompetícióban az inhibitor szorítja ki a szérumfaktort.

Szteroid hormonnal végzett kísérletünk is azt bizonyítja, hogy a T_4-1-szérumfaktor kapcsolat nem egyszerű ál-antagonizmus. Kimutattuk, hogy szérummentes közegben a hidrokortizon és a T_4-1 proliferációt gátló hatása addicionálódik (*2. táblázat*). (Sőt, a felvett izobola enyhe potencírozásra utal.) TC-199-es médiumot 10 % FBS-sel komplementálva az addíció megszűnt. A hidrokortizon ugyanis megőrizte gátló aktivitását, a T_4-1-et viszont a szérumfaktor antagonizálta.

2. táblázat

A hidrokortizon (HC) és T_4-1 additív hatásának antagonizációja a szérumfaktor jelenlétében

Table 2. **Antagonistic action of the serum factor on the additive effects of hydrocortison (HC) and T_4-1**

Kezelés	FBS %	HC μg/ml	T_4-1 μg/ml	^{3}H-TdR beépülés cpm ± S.E.	Gátlás %
Kontroll—1	—	—	—	1664 ± 81	—
HC	—	1,0	—	983 ± 35	41
T_4-1	—	—	300	1197 ± 71	29
HC + T_4-1	—	1,0	300	407 ± 10	76*
Kontroll—2	10	—	—	1864 ± 122	—
HC	10	1,0	—	1114 ± 30	40
T_4-1	10	—	300	2423 ± 74	—
HC + T_4-1	10	1,0	300	1285 ± 31	31**

* Additív hatás (enyhe potencírozás)
** Addíció antagonizálva

Megvitatás

Vizsgálataink megerősítik azokat a korábbi szórványos észleléseket [23, 15, 9, 24, 2, 17], hogy az endogén inhibitorok két csoportra, szérum dependens és independens faktorokra különíthetők. A kettő között intermedierek figyelhetők meg.

A granuloid inhibitorok (GCE) gátló-aktivitását — mint kimutattuk — homeosztázisban a szérum nem módosítja. A thymocytákból izolált oligospecifikus inhibitor (T_4-1) viszont a szérum-koncentrációtól függően fejti ki hatását.

A dependencia elvileg kémiai vagy biológiai, utóbbi esetben valódi vagy ál-antagonizmus lehet. A szérumban egy sor potenciálisan antagonizáló faktort mutattak ki. Ezek kémiailag definiált, vagy csak részben azonosított vegyületek. Legismertebb csoportjuk a növekedési faktorok (GF) közé sorolt endokrin eredetű 4—14 $\times 10^3$ mólsúlyú polipeptidek. Ilyen pl. az inzulin, a NSILA (non suppressible insulin-like activity), a somatomedin-A, -B és -C vagy az MSA (multiplication stimulating activity). (Összefoglalásuk: [13, 11].) Mások magasabb mólsúlyú fehérjék vagy proteidek: globulinok, albuminok, erythropoetin, CSF (colony stimulating factor) stb. [21, 22, 19, 20]. A két csoport közti átmenetet képez az α-makroglobulinból és inzulinból összetett, FBS-ből izolált S_1-fehérje [12]. Számos nem fehérje természetű vegyület: biogén aminok, anabolikus szteroidok, néhány prosztaglandin, nukleotida és terpén is szerepelhet stimulatív szérum-komponensként [18]. Triviális tényezők, pl. a Ca^{++} koncentráció emelkedése (>1,8 mM) is fokozhatja a növekedési rátát és a diploid monolayer sejtek telítési sűrűségét [25, 8]. Természetesen az endogén inhibitorok antagonistája nemcsak stimuláló faktor lehet, hanem bármely inaktiváló, neutralizáló vagy dekomponáló hatóanyag, ill. fizikokémiai tényező.

Az endogén inhibitorok szérum-antagonizmusát csupán néhány esetben észlelték. A granulocita „antichalont" (~ 3×10^4 mólsúly) leukopheresises szérumból izolálta Rytömaa és Kiviniemi [23]. Az epidermális G_2 gátlófaktor szérumantagonistáját Elgjo és Edgehill [9] írta le: termolabilis (60 °C, 20′), a G_1 inhibitor aktivitását alig módosítja. Részletesen vizsgálták a 3—5 $\times 10^4$ mólsúlyú fibroblaszt-chalon antagonistáját [14, 15]. A fibroblaszt antichalonnak nevezett szérum-mitogén a log-fázisban növő WI—38 és GWF fibroblasztok növekedési rátáját fokozó stimuláns. 1,2 $\times 10^5$ molekulasúlyú, két 6 $\times 10^4$ alegységből összetett, 5,2—5,4 izoelektromos pontú, tripszin- és neuraminidáz-szenzitív, 56 °C-on 30 percig hőrezisztens szialoprotein. A FBS fehérjéinek csupán 0,5 %-a, amely 1,2 % sziálsavat, 3,4 % szénhidrátot is tartalmaz. Az inhibitorral nem kötődik, mert előzetes inkubáció után Amicon XM 50 molekulaszűrővel újra izolálható.

Houck [14] feltételezte, hogy limfocita populációk esetében hasonló antagonizáló faktor nem működik, mivel „these cells are constantly bathed with plasma". Houck és mtsai elsősorban PHA-stimulált limfocitákkal dolgoztak; ezen a rendszeren Allen és mtsai [1] sem tapasztalták a FBS-dependenciát. Utóbbi szerzők által izolált thymus-eredetű inhibitor (F_2—F_6) viszont inaktiválódott humán szérum jelenlétében, amit annak alacsony aminoxidáz aktivitásával magyaráznak.

Magunk PHA-stimulált sertésvér eredetű limfocitákkal dolgozva, ugyancsak azt tapasztaltuk, hogy a T_4-1 gátlás FBS és HSS jelenlétében is érvényesül. Mégis, 1—20 % FBS koncentrációsort alkalmazva, ebben a rendszerben is kimutatható a részleges, maximálisan 60 %-os szérumfaktor-antagonizmus.

Teljes, 100 %-os szérumdependenciát észleltünk azonban a T_4-1 inhibitornak rövid idejű (4—12^h) thymocyta-, csontvelő-, normál- és sALL-ás lépsejt-kulturákra gyakorolt hatásának vizsgálata során. Ugyanezt tapasz-

taltuk az etanollal és $(NH_4)_2SO_4$-gyel végzett lépcsőzetes precipitáció útján előállított CE—T_4 d_1 P_2, ill. T_4 d_1 P_2 limfoid gátlófaktorok alkalmazásakor [Blazsek és mtsai, még nem közölt adatok]. Különböző módon preparált nyiroksejtre ható fiziológiás vagy toxikus inhibitorok szérumantagonizmusára Stjernholm és mtsai [24], Aoyama és mtsai [2], továbbá Kiger [17] is utaltak.

Kérdés, hogy az általunk biológiailag jellemzett szérumfaktor azonos-e valamelyik ismert stimulánssal vagy inaktiváló ágenssel?

Direkt bizonyítékát adtuk, hogy az adott rendszerben az inzulin még farmakológiás dózisokban (10—100 μg/ml) sem tölt be ilyen funkciót. A szérumfaktor nem lehet azonos a granulocita antichalonnal [23] sem, mert a normál FBS a GCE-t nem antagonizálja. Az epidermális G_2 inhibitor szérum-inaktivátora termolabilis [9], a mi T_4-1 antagonistánk termostabilis.

Egyéb paraméterei közül kiemelhetjük, hogy a szoros időfüggés a T_4-1 gyors, irreverzibilis hatására utal. Szubakut limfoid leukémiás target sejtek esetén ez az időtartam $<$ 90 percnek bizonyult [6]. Noha a szérumfaktor előzetes adása felfüggeszti az inhibitor gátló aktivitását, fordított esetben a gátlás és szérum-stimuláció egyaránt létrejön.

Kérdéses, hogy a stimuláló és a gátlást-antagonizáló hatás ugyanarra a faktorra vezethető-e vissza? Az a tény, hogy *a)* a stimuláció és antagonizálás nem párhuzamosan emelkedik, *b)* hogy a szérumot 60 perc elteltével adva a T_4-1 gátlás is érvényesül, de a szérumfaktor is stimulálja a thymocyták ^{3}H-TdR beépítését, továbbá, hogy *c)* az antagonizáló hatás csontvelősejteken is érvényesül, amelyek DNS szintézisét a szérum alig fokozza, kérdésessé teszi a monofaktoriális magyarázatot. Ugyanakkor sem dialízissel, sem termális denaturációval nem választható szét a kétféle effektus.

A limfocita gátlófaktor és szérum-antagonistájának sztöchiometrikus egyensúlya és kompetíciója a sejtszaporodás érzékeny regulációját biztosítja. A továbbiakban a szérumfaktor kémiai paramétereinek és *in vivo* hatékonyságának vizsgálatával jellemezzük pontosabban ezt a biológiai funkciót.

Összefoglalás

Kimutattuk, hogy a sejtszaporodás endogén inhibitorai eltérően fejtik ki gátló aktivitásukat kémiailag definiált, illetve szérummal komplementált médiumban. A granulocita eredetű extraktum (GCE) szérum independens, a thymocytából izolált T_4-1 frakciót 0,3—20,0 % FBS dózisfüggően antagonizálja. Az inhibitor sztöchiometrikus egyensúlyban áll a szérumfaktorral: $ID_{50} = 22{,}0$, $ID_0 = 12{,}0$ μg T_4-1/μl FBS. A neutralizáló hatás időfüggő; csak akkor manifesztálódik, ha a komplementálás $<$ 90 perc alatt történik. Bizonyított, hogy a faktor nem azonos az inzulinnal. A termostabilis (56 °C, 30 perc és részben 100 °C, 60 perc) és nem dializálható antagonistát a FBS-en kívül homológ sertéssavó és kevert humán AB szérum is tartalmazza. Thymocyta-, lép- és csontvelő-szuszpenziós kultúrákban a neutralizáció tartós ($> 12^h$) és teljes, PHA stimulált limfocita tenyészetekben a gátló hatás felfüggesztése ugyancsak dózisfüggően érvényesül, de csak részleges (max. 60 %). A szérum telítettségi szintjén az inhibitor további koncentráció-növelése ismét gátolja a proliferációt. Feltehetően a szérumfaktor és inhibitor nem kémiailag, oldatban kötődik, hanem közöttük kompetitív biológiai antagonizmus áll fenn. A kötő-

hely nem β-adrenerg receptor, mert a T_4-1 gátlóaktivitása 10^{-8}—10^{-7} M propranolol jelenlétében is érvényesül.

A szérumfaktor-inhibitor antagonizmus biológiai funkciója a sejtproliferáció megfelelő szinten tartása és érzékeny regulációja.

*

Szerzők köszönetüket fejezik ki Csáky Lászlónak a radiokémiai meghatározások elvégzéséért, Gál Ferencnek a sALL-ás állatok rendelkezésre bocsátásáért, továbbá Barabás Kornéliának, Windisch Katalinnak és Fitos Józsefnek kitűnő technikai közreműködésükért.

IRODALOM

1. Allen, J. C., Smith, C. J., Curry, M. C. and Gaugas, J. M. (1977) Identification of a thymic inhibitor („chalone") of lymphocyte transformation as a spermine complex. *Nature*, **267**, 623—625.
2. Aoyama, T., Kihara, K. and Nishiguchi, K. (1975) Dual effects of thymic substance(s) on growth of cultured mammalian cells. *Exp. Cell. Res.*, **93**, 427—437.
3. Balázs, A. and Blazsek, I. (1979) Control of cell proliferation by endogenous inhibitors. A monograph. Akadémiai Kiadó, Budapest.
4. Balázs, A., Blazsek, I., Holczinger, L., Gaál, D., és Csáky, L. (1975) A sejt-proliferácót szabályozó endogén faktorok izolálása granulocitákból és limfocitákból. *Biológia*, **23**, 13—23.
5. Balázs, A., Fazekas, I., Bukulya, B., Blazsek, I. and Rappay, Gy. (1972) An intracellular factor (DCI) controlling differentiation and cell division. *Mech. Age. Dev.*, **1**, 175—182 .
6. Balázs, A., Gál, F., Klupp, T. and Blazsek, I. (1978) *In vitro* sensitivity of transplantable leukaemias to endogenous granuloid (GCE, GI-2) and lymphoid (T_4, T_4-1) inhibitors of proliferation. *Oncology*, **35**, 8—14.
7. Balázs, A., Klupp, T., Zsila, G. and Blazsek, I. (1977) Modulative effect of endogenous granuloid inhibitors on cell proliferation. *Mech. Age. Dev.* **6**, 207—218.
8. Dulbecco, R. and Elkington, J. (1975) Induction of growth in resting fibroblastic cell cultures by Ca^{++}. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 1584—1588.
9. Elgjo, K. and Edgehill, W. (1973) Epidermal growth inhibitors (chalones) in dermis and serum. *Virchows Arch. Abt. B.*, **13**, 14—23.
10. Garcia-Giralt, E., Diaz-Rubio, E. and Rappaport, H. (1975) Evaluation of the specificity of a lymphoid chalone. *Cell Tissue Kinet.*, **8**, 589—592.
11. Gospodarowicz, D. and Moran, J. S. (1976) Growth factors in mammalian cell culture. *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 531—558.
12. Hoffman, R., Ristow, H. J., Veser, J. and Frank, W. (1973) Properties of two growth-stimulating proteins isolated from fetal calf serum. *Exp. Cell. Res.*, **85**, 275—280.
13. Holley, R. W. (1975) Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature*, **258**, 487—490.
14. Houck, J. C. (ed.) (1976) *Chalones*. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam—New York.
15. Houck, J. C., Sharma, V. K. and Cheng, R. F. (1973) Fibroblast chalone and serum mitogen (anti-chalone). *Nature New Biol.*, **246**, 111—113.
16. Kamely, D. and Rudland, P. S. (1976) Induction of DNA synthesis and cell division in human diploid skin fibroblasts by fibroblast growth factor. *Exp. Cell. Res.*, **97**, 120—126.
17. Kiger, N. (1977) Személyes közlés.
18. Konyshev, V. A. (1976) Chemical nature and systematization of substances regulating animal tissue growth. *Intern. Rev. Cyt.* **47**, 195—224.
19. Lozzio, B. B., Lozzio, C. B., Bamberger, E. G. and Lair, S. V. (1975) Regulators of cell division: endogenous mitotic inhibitors of mammalian cells. *Intern. Rev. Cytol.*, **42**, 1—47.
20. Metcalf, D. (1977) *Hemopoietic colonies*. Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.

21. MICHL, J. (1961) Metablism of cells in tissue culture in vitro. I. The influence of serum protein fractions on the growth of normal and neoplastic cell. *Exp. Cell. Res.*, **23**, 324—334.
22. PAUL, D., LIPTON, A. and KLUNGER, I. (1971) Serum factor requirements of normal and simian virus 40-transformed 3T3 mouse fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**, 645—648.
23. RYTÖMAA, T. and KIVINIEMI, K. (1968) Control of granulocyte production. *Cell Tissue Kinet.* **1**. 329—350.
24. STJERNHOLM, R. L., LASETER, V., EZÉKIEL, E. and BURNS, C. P. (1974) The effect of human serum fractions on lymphocytes *in vitro*. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **15**, 25a—26a.
25. WHITFIELD, J. F., MCMANUS, J. P., BOYTON, A. L., GILLAN, D. J. and ISAACS, R. J. (1974) Concanavalin A and the inhibition of thymic lymphoblast DNA synthesis and proliferation by a calcium-dependent increase in cyclic GMP level. *J. Cell. Physiol.*, **84**, 445—458.

SYNERGISM OF SERUM FACTORS AND PROLIFERATION REGULATORS IN CELL CULTURES

A. Balázs, A. Farkas, I. Blazsek and T. Klupp
Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences,
Budapest, Hungary

The endogenous inhibitors of cellular multiplication have been shown to act differently n chemically defined and serum-completed media. The granulocyte derived extract (GCE) is serum independent, whereas a dose-dependent antagonistic action developed against the thymocyte-derived fraction T_4-1 in the dose range of 0.3—20.0 % FCS. The inhibitor maintained a stoichiometric equilibrium with the serum factor (ID_{50} = 22.0; ID_0 = 12.0 μg T_4-1/μl FCS). The neutralizing action was timedependent; it appeared only if completion took less than 90 min. Evidence has been presented of the non-identity of the factor with insulin. The thermostable (at 56 °C for 30 min and partly at 100 °C for 60 min) and non-dialysable antagonist occurs in addition to FCS also in homologous pig serum and in human AB serum pools. The neutralizing effect was durable (12-hr) and complete in suspensions culture of thymocytes, spleen and bone marrow cells; in PHA-stimulated lymphocyte cultures there was a dose-dependent, partial (maximum 60 %) depression of the inhibitory action. On saturation of the medium with serum, the concentration increase of the inhibitor no longer caused depression of cell proliferation. The interaction of the serum factor with the inhibitor seems to be due not so much to a chemical binding in the solution, as to biological antagonism. The binding site is obviously not a β-adrenergic receptor, for T_4-1 develops its inhibitory action also in the presence of 10^{-8}—10^{-7} propranolol.

The biological function of the serum factor-inhibitor antagonism is obviously the maintenance of cell proliferation at a given level and its sensitive regulation.

Biológia, **26**, 1978, *153—165*

EGEREK SPERMATOCITÁINAK SUGÁRÉRZÉKENYSÉGE A MEIOTIKUS PROFÁZIS KÜLÖNBÖZŐ STÁDIUMAIBAN

SZEMERE GYÖRGY ÉS ZSIBRITA ÁGNES
Szegedi Orvostudományi Egyetem Orvosi Biológiai Intézete, Szeged

Beérkezett: 1978. október 20-án

Kulcsszavak: meiozis, spermatocita, sugárérzékenység.

Bevezetés

Az utóbbi években számos vizsgálatot végeztek annak megállapítására, hogy az egerek spermatogoniumainak röntgenbesugárzása milyen választ vált ki a kromoszóma-elváltozások vonatkozásában, illetve azok meiotikus átvitelében, valamint az utódokban. Ezek a vizsgálatok részben a besugárzott spermatogoniumokból származó elsődleges spermatociták vizsgálatára terjedtek ki a diakinézis metafázis I-ben [1, 12, 16, 17, 27, 28], részben a besugárzott hímek utódai semi-sterilitásának genetikai vizsgálatára [19, 26].

Lényegesen kevesebb információval rendelkezünk maguknak a primer spermatocitáknak a sugárérzékenységével kapcsolatban, bár ismeretes, hogy — más fajokhoz hasonlóan — az egerek meiotikus profázisa rendkívül sugárérzékeny mind az aberrációk létrehozása, mind a sejtpusztító hatás tekintetében [2, 6, 22, 23]. A genetikai vizsgálat, még kis dózisok esetében is, valószínűleg a spermatociták érzékenységének csak minimális becslését teszi lehetővé, mivel a besugárzott spermatociták termékeinek nagy része nem fejlődik életképes spermiummá [2, 22]. Sokkal reálisabb becsléshez vezethet ezért a profázis különböző stádiumaiban besugárzott spermatociták citológiai vizsgálata.

Az egerek primer spermatocitáinak sugárérzékenységére vonatkozó bizonyos adatok rendelkezésünkre állnak az aberrációk kiváltása tekintetében. OAKBERG és DIMINNO [23] például szövettani metszeteken tanulmányozta a megelőző meiotikus profázisban alkalmazott röntgensugárzás hatását az anafázis I- és II-ben, sőt WENNSTRÖM [31] közölt adatokat, melyekben lényegesen áttekinthetőbb módon kenetekben tanulmányozta a diakinézisben (metafázis I) a profázisban levő spermatociták, illetve a spermatogóniumok besugárzásának hatását. Mivel megfelelő technikák állnak rendelkezésre a meiotikus sejtek tanulmányozására, nemcsak a metafázis I-ben, de a SZEMERE és CHANDLEY [30] által bevezetett módosított centromera-festés révén a metafázis II-ben is, érdemesnek látszott megvizsgálni a spermatociták érzékenységét a besugárzás okozta aberráció-kiváltásban a sejtek diakinézisben (metafazis I-ben, illetve a metafázis II-ben) történt átvizsgálása útján.

Anyag és módszer

A kísérlethez nem szorosan beltenyésztett egereket használtunk, amelyek a kísérlet idején 6—10 hetesek voltak. A meiozis I vizsgálatához 100-, illetve 200 rad egésztest-besugárzást kaptak az egerek plasztik dobozban, a meta-

fázis II vizsgálatát 200 rad besugárzás után végeztük. A 200 rad egésztest-besugárzást a következő paraméterek határozták meg: 200 kV feszültség, 20 mA áramerősség, 1mm Cu szűrő, 50 cm fókusztávolság, 2′ 32″ besugárzási idő. Besugározatlan egerek szolgáltak kontrollként. A kísérleteket két megismételt folyamat után értékeltük.

A besugárzás után az egereket a következő időpontokban öltük meg a nyaki gerinc diszlokációjával: 6 óra, 21 óra, 5 nap, 9½ nap, 10 nap és 11 nap. A hat különböző időpontot annak megfelelően választottuk meg, hogy a besugárzás után a sejtek a diakinézis/metafázis I-ben, illetve a metafázis II-ben legyenek: a diakinézis/metafázis I-ben (6 óra), a diploténben (21 óra), a középső pachyténben (5 nap), a zygoténben (9½ nap), a leptoténben (10 nap), illetve a prae-leptoténben (11 nap) történt besugárzás után. (A meiotikus osztódás ezen „menetrendje" KOFMAN—ALFARO és CHANDLEY [13] munkájából származik, akik a spermatogenezis lefolyását ^{3}H-thymidinnel jelölve vizsgálták.) Feltételeztük, hogy az alkalmazott sugárdózis ezeket az osztódási időszakokat nem változtatja meg alapvetően. A keneteket a következő módon készítjük [5, 7, 9, 30]:

1. A hím egeret nyaki diszlokációval megöljük, heréit kivesszük, s azonnal fiziológiás sóoldatba helyezzük.
2. A tokjától megfosztott herét 1%-os Na-citrátba áttesszük, kb. 15 percen át ebben az oldatban hipotonizálunk.
3. A vizsgálati anyagot gondosan felaprózzuk, 40 mp-ig ülepedni hagyjuk, majd a felső sejtdús réteget pipettával leszívjuk, és centrifugacsőbe áttesszük.
4. 5 percig centrifugáljuk, 800—1000 fordulatszámmal, a felülúszót leöntjük.
5. Metanol:jégecet 3:1 arányú keverékével fixálunk, majd az anyagot 40 percre hűtőszekrénybe helyezzük.
6. Centrifugálunk és fixálunk az előbbiek szerint háromszor egymás után.
7. Az utolsó centrifugálás után, ha a felülúszót leöntöttük, néhány csepp friss fixálót teszünk a csövekbe, és az üledéket óvatosan fölrázzuk.
8. A szuszpenziót tárgylemezre kicsöppentjük.

Minden egérből 100 sejtet analizáltunk diakinézis/metafázis I-re és ugyancsak 100 sejtet metafázis II-re minden egyes besugárzás-megölés közötti időtartamra (kivéve a metafázis II vizsgálatokat, melyek során az előzetes tapasztalatok alapján csak a 6, illetve 21 órás időszakokat vizsgáltuk), így összesen besugárzási időszakonként 200 sejtet analizáltunk és ugyanennyit a kontroll egerekből. Természetesen csak a jól szétterült, teljesnek látszó metafázisokat vizsgáltuk, s a kromatid és izokromatid töréseket, a szabad fragmentumokat, a multivalenseket és az univalenseket kerestük, beleértve az X és Y kromoszóma kapcsolódásának elmaradását. A metafázis II esetében figyelmünket a strukturális elváltozásokra, így az egyenlőtlen hosszúságú dyad-karokra és az esetlegesen előforduló szex-kromoszóma/autoszóma átrendeződésekre fordítottuk.

Eredmények

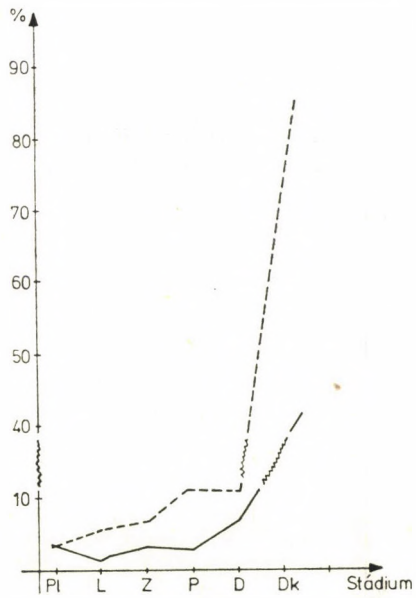
Minden besugárzott profázisra kapott eredményeinket az *1. táblázat*ban foglaltuk össze.

1. táblázat

A diakinézisben megfigyelt elváltozások gyakorisága a korábbi profázis állapotokban besugárzott spermatocitákban

Table 1. Frequency of alterations occurring during diakinesis in spermatocytes exposed to X-irradiation during preceding stages of meiotic division

Stádium	Dózis (rad)	Sejtek száma	Abnormis %	Abnormis % Oakberg és DiMinno	Aberráció 100 sejtre				Nem kapcsolódó XY-os sejtek %-a	Autoszomális univalensek %-a
					Kr. törés	Izokr. törés	Fragm.	Multivalens		
Pre-leptotén	100	200	17,5	21	3,5	1,5	3,0	2,5	4,0	3,0
	200	200	27,0	26	3,5	5,0	4,5	8,0	2,0	4,0
Leptotén	100	200	18,5	13	1,5	4,0	2,0	3,5	4,5	3,0
	200	200	35,5	20	5,5	6,5	4,5	20,0	3,0	6,0
Zigotén	100	200	23,5	28	3,5	3,0	3,0	6,5	4,5	3,0
	200	200	37,5	29	7,0	8,0	6,5	21,0	2,5	2,5
Pachytén	100	180	22,5	25	3,0	4,0	2,5	5,8	6,7	2,5
	200	200	31,0	41	12,0	13,0	11,0	16,5	3,0	3,5
Diplotén	100	200	24,5	22	7,0	6,5	4,0	6,0	1,5	4,0
	200	200	46,5	36	8,5	20,5	11,5	20,0	1,0	7,0
Diakinézis	100	200	45,5	32	40,5	8,0	6,0	10,0	2,0	2,5
	200	200	79,5	49	75,5	32,0	20,0	21,0	3,0	6,0
Kontroll	—	200	11,0	7,5	1,0	1,0	1,0	0	4,0	4,0



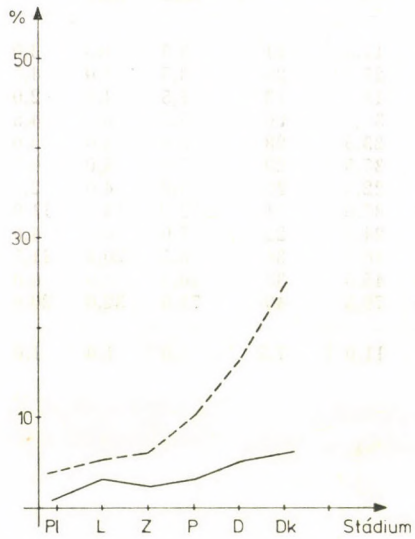
1. ábra. Kromatid törés

——— 100 rad egésztest-besugárzást kapott csoport. — — — — 200 rad egésztest-besugárzást kapott csoport

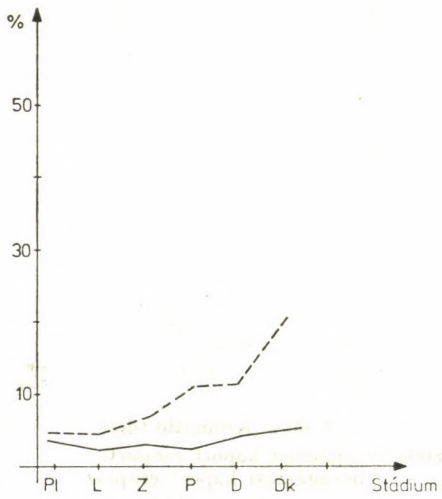
Fig. 1. Chromatid break

——— Group exposed to 100 rad whole body irradiation. — — — — Group exposed to 200 rad whole body irradiaton

Általánosságban, az abnormis sejtek aránya kétféle dózis esetén, valamint a kontroll állatokban nem tér el lényegesen az OAKBERG és DIMINNO [23] által közöltektől az „abnormitás" eltérő kritériumai ellenére sem. Az aberráció előidézése szempontjából a legérzékenyebb periódusnak a diakinézis/metafázis I bizonyult, amelyben a sejtek csaknem 50 %-a volt abnormis 100 rad besugárzás után, és csaknem 80 %-a 200 r-es besugárzást követően. Az adatok

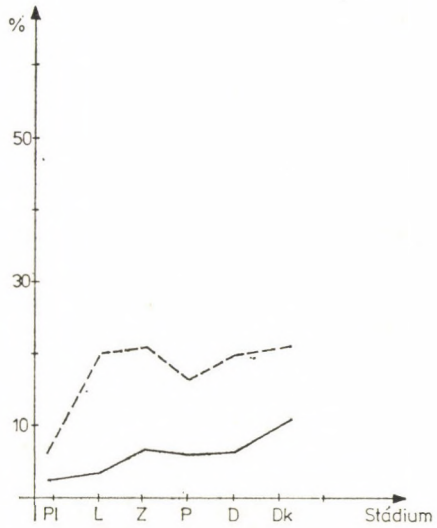


2. ábra. Izokromatid törés
Fig. 2. Iso-chromatid break

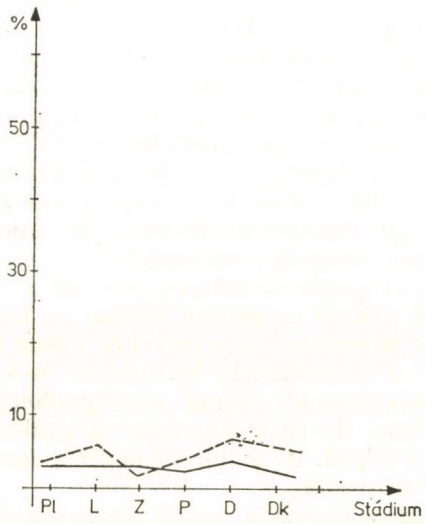


3. ábra. Fragmentum
Fig. 3. Fragment

további elemzése során kiderült, hogy a diakinézisben az érzékenység magas szintje a kromatid és izokromatid törések jelentős kezdeti indukciójának következménye. A kromatid törések szintje a pre-leptotén és egyéb profázis állapotok alacsony szintjéről emelkedett magas szintre (*1. ábra*), míg az izokromatid törések (*2. ábra*) és a fragmentumok esetére sokkal fokozatosabb emelkedés volt jellemző (*3. ábra*) a pre-leptoténtől a közbeeső állomásokon át a diakinézisig. Ezzel szemben a multivalensek indukciójára nézve (*4. ábra*)



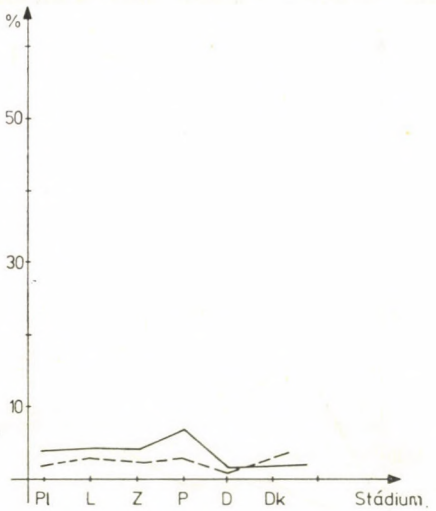
4. ábra. Multivalens asszociáció
Fig. 4. Multivalent association



5. ábra. Autoszomális univalensek
Fig. 5. Autosomal univalents

a leptoténtől a diakinézisig nagyjában egyforma volt az érzékenység, s csak a pre-leptoténben volt némi csökkenés. Sem az autoszomális univalensek, sem a nem kapcsolódó XY kromoszómák esetében nem találtunk lényeges eltérést a kontrollhoz viszonyítva (*5.* és *6. ábra*).

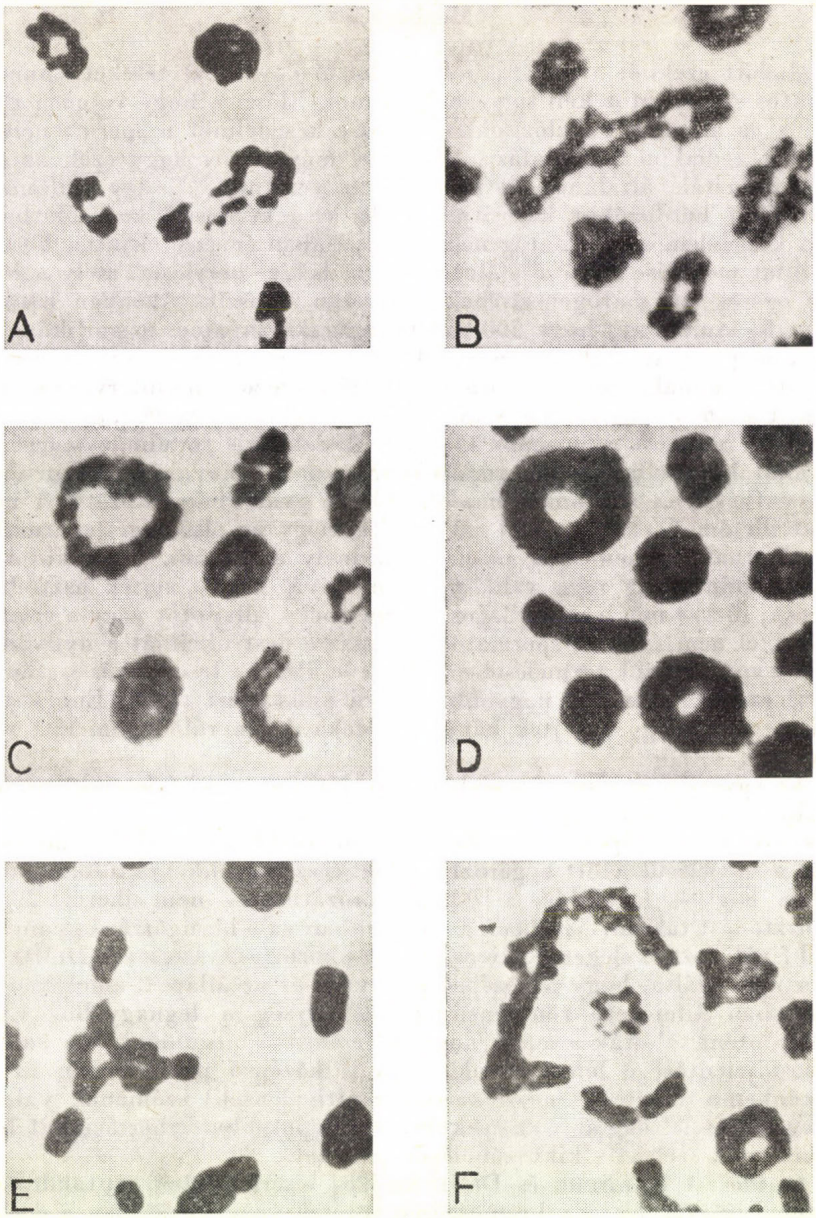
A multivalens konfigurációkat külön elemeztük. A multivalens asszociációt tartalmazó sejtek 84 %-ában lehetett 18 normális bivalenst találni (beleértve az XY bivalenst is) és egy multivalenst két autoszóma pár között. Ezt követte gyakoriságban (6,8 %) a 16 bivalenst és 2 multivalenst tartalmazó típus, illetve (4,3 %) a 17 bivalenst és egy 3 kromoszómát magába foglaló multivalens asszociációt tartalmazó sejt. A sejtek 3,2 %-ában olyan multivalenseket lehetett találni, melyek az X kromoszóma és egy autoszóma közötti kicserélődést tartalmaztak, és 1,1 % tartalmazott Y/autoszóma multivalenst. Meglepő módon, némely ivari kromoszóma/autoszóma átrendeződés olyan stádiumokban jelentkezett, mikor a szex-kromoszóma bivalens a szex-vezikulumba van lezárva (pl. leptoten-pachyten), s így csak korlátozott lehetőség van arra, hogy egy autoszómával érintkezzék.



6. ábra. Nem kapcsolódó XY
Fig. 6. Non-joining XY

A multivalens konfigurációk néhány példáját a *7. ábra* tartalmazza. Az átrendeződések közül soknak a pontos leírása — bonyolultságuknak megfelelően — egyszerűen lehetetlen, de a gyűrű és a lánc konfigurációk egyaránt előfordultak. Néhány, a diakinézisben besugárzott és 6 órával később vizsgált sejtben „pszeudomultivalensek" voltak megfigyelhetők két bivalens összeragadása következtében, de ezek könnyen megkülönböztethetők a valódi multivalens konfigurációktól. A többi időpontban besugárzott állapotokban ez a ragadósság egyébként ritka.

Az univalenseket tartalmazó sejtek gyakoriságát (akár autoszomális, akár XY univalensekről van szó) az *1. táblázat* tünteti fel, de ezek esetében nincs szignifikáns eltérés a besugárzás hatására.



7. ábra. Multivalens asszociációk.
A) Lánc trivalens elsőrendű spermatocitában *B)* Lánc quadrivalens *C)* Gyűrű quadrivalens *D)* Két gyűrű quadrivalens ugyanabban a spermatocitában *E)* Lánc hexavalens asszociáció *F)* Octavalens asszociáció

Fig. 7. Multivalent associations.
A) Chain trivalent in primary spermatocyte. *B)* Chain quadrivalent. *C)* Ring quadrivalent. *D)* Two ring quadrivalents in the same spermatocyte. *E)* Chain hexavalent association. *F)* Octavalent association.

Megbeszélés

Mielőtt ezekből az adatokból megfelelő következtetéseket vonnánk le, két fontos szempontot kell figyelembe venni. Először, hogy vajon a röntgensugárzás az alkalmazott dózisokban okoz-e késedelmet a spermatociták fejlődésében a diakinézis/metafázis I-ben, és másodszor, hogy ezek az adagok a spermatociták általános destrukciójához vezetnek-e, vagy különösen az aberrációkat hordozókat károsítják-e. Az első kérdéssel kapcsolatban bármilyen késedelem a spermatogenezis lefolyásában érvényteleníti a besugárzás és az állat megölése közötti időintervallum helyes becslését, mely a besugárzatlan egerek spermatogenezisének ismeretén alapszik. Azonban EDWARS és SIRLIN [8] kimutatta, hogy 200 rad besugárzásnak nincs szignifikáns hatása a zigotén-spermatociták spermiumokká történő érésének sebességére, s ez bizonyítéka annak, hogy az általunk meghatározott időintervallumok érvényesek. Ugyanezt erősíti meg SEGA és SOTOMAYOR [29] észlelése, akik a röntgensugár által indukált programon kívüli DNS-szintézis tanulmányozása közben nem találtak összefüggést a normális DNS-szintézist zavaró UDS (unscheduled DNA synthesis) és a kromoszóma-aberrációk gyakorisága között. A második kérdést illetően OAKBERG [22] azt találta, hogy az elsődleges spermatociták károsodhatnak a meiotikus profázis bármely szakában, de a károsodások legtöbbje mindaddig nem válik nyilvánvalóvá, míg a sejtek osztódni nem kezdenek, illetve míg a másodlagos spermatocita állapotot vagy a spermatida állapotot el nem érik. A spermatociták összes destrukcióját a nyilvánvalóan életképes spermiumok termelésében kifejezve, 100 rad besugárzás esetén enyhe, 200 rad esetén valamivel nagyobb arányú csökkenést talált. Ennek ellenére nem ismeretes, hogy a sejtek hány százaléka degenerálódik mielőtt elérné a diakinézist.

Az egyetlen stádium, melyben úgy látszott a kísérleteinkben, hogy a meiotikus osztódások számának csökkenését okozta, a középső pachytén volt, vagyis azokban az egerekben lehetett némi csökkenést találni, melyeket öt nappal a megölésük előtt sugároztunk be, s ez a csökkenés abban jutott kifejezésre, hogy — legalábbis a 100 rad sorozatban — nem sikerült 200 meiotikus osztódást találni. Az ebben a stádiumban való besugárzás ugyancsak sok rosszul fixálódott és degeneratív osztódást okozott. OAKBERG és DIMINNO [23] szintén úgy találta, hogy a középső pachytén az az állapot, amelyben a sejtpusztításban kifejezett röntgensugár-érzékenység a legnagyobb. Ugyanők a pre-leptoténtalálták a másik nagyon érzékeny stádiumnak, s a saját adatainkban jelentősége lehet annak, hogy a középső pachytenben és a pre-leptoténben a reciprok transzlokációk (multivalensek) számának valamelyes csökkenését észleltük, ami az ezekben az állapotokban aberrációkat hordozó spermatociták szelektív kiküszöbölésére utalhat.

Az idézett OAKBERG és DIMINNO [23] kísérleteikben azt találták, hogy a röntgensugárzás okozta kromoszóma törések vonatkozásában a diakinézis/ /metafázis I profázisa a legérzékenyebb stádium, míg a legrezisztensebb a leptotén és a pre-leptotén. Azonban, ha az anafázisban egyszerűen a „normális", illetve „abnormis" sejteket keressük, akkor nincs arra mód, hogy megtudjuk, vajon ez a nyilvánvaló érzékenységcsökkenés az eredetileg okozott károsodás csökkenésére vagy a restitúció (reparáció) fokozatos növekedésére vezethető-e vissza, mely a besugárzás után eltelt időt követi. Kísérleteinkben az az eredmény, hogy a leptoténtől a diakinézisig a profázis minden stádiumában nagy-

jában egyforma mennyiségű multivalenst lehetett találni, arra mutathat, hogy a kezdeti károsodási szint, melyet egy adott sugáradag okoz, nagyjában azonos minden stádiumban. A besugárzott diakinézis és a besugárzott pre-leptotén között a kromatid és izokromatid törések csökkenő száma azután inkább a növekvő restitúció, illetve reparáció, mint a csökkenő érzékenység irányába mutat.

Az érzékenység közel azonos szintje a transzlokációk indukciójában a profázis minden stádiumában meglepő és váratlan. A nem homológ kromoszómák közötti kicserélődés az eredetileg okozott törések számától függ, ami a sugáradag növelésével növekszik [3, 15], és ugyancsak összefüggést tételeznek fel más tényezőkkel, mint a kromoszómák térbeli kapcsolataival a magon belül, valamint a nukleolusz-organizátorban megnyilvánuló különbözőségekkel [10] is. Bár a spermatocita magjában fontos változások történnek a meiotikus profázis folyamán, melyek magukba foglalják a mag átmérőjének növekedését, a kromoszómák párosodását és kontrakcióját, ahogyan a sejt eléri az első meiotikus metafázist, a multivalensek indukciójában, illetve az arra való érzékenységben nem lehet változást találni. Ezek az adatok nincsenek összhangban MITRA [20] közleményével, mely szerint a *Lilium* mikrosporocitáiban, melyeket 60 rad besugárzásnak tett ki a profázisban és az eredményt a diploténben vizsgálta, s nagyfokú transzlokáció-indukciót talált a pre-leptoténben besugárzott sejtekben, kisebbet a leptoténben és semmiféle indukciót nem tudott kimutatni a zigoténben és a pachyténben besugárzott sejtek esetében. Ugyanakkor saját eredményeink azt mutatják, hogy a pre-leptotén az az állapot, amiben a reciprok kicserélődések *legkisebb* gyakoriságával kell számolni, bár — mint fentebb említettük — ezek a számok látszólagosan alacsonyak lehetnek az aberrációkat hordozó sejtekkel szemben működő szelekciós hatás miatt.

Mint említettük kétféle sugáradag mellett összesen 280 multivalens konfigurációt találtunk. Ezek közül kilenc (3,2 %) tartalmazta az X és három (1,1%) az Y kromoszómát. Eszerint az egerek primer spermatocitáiban megtaláltuk a X és Y/autoszóma átrendeződések citológiai bizonyítékát. Ezzel szemben SEARLE és mtsai [27] nem találtak egyetlen ivari kromoszóma/autoszóma átrendeződést sem 2000, diakinézisben vizsgált, besugárzott spermatogoniumokból származó reciprok transzlokációs esetben. Annak az oka, hogy ilyent nem sikerült találniuk az lehet, hogy a spermatogoniális osztódások alatt kiküszöbölődnek, vagy hogy csak ritkán indukálódnak. Az ilyen átrendeződések ritka voltának további bizonyítéka, hogy LYON és MEREDITH [18] egyetlen X/autoszóma transzlokációt sem talált besugárzott hím egerek 38, transzlokációt hordozó nőstény utódjában, valamint, hogy Y/autoszóma transzlokációról még sohasem számoltak be.

Éppen ezért saját eredményünk, ami az ivari kromoszóma/autoszóma átrendeződések lehetőségének bizonyítéka, nagy jelentőségű, ha bizonyos fokig váratlan is. Mivel ugyanis az X és az Y kromoszóma az elsődleges spermatocitákban a meiotikus profázis legnagyobb részében elkülönítetten helyezkedik el a szex-vezikulumban, meglepő, hogy mégis részt vehet egyáltalán az autoszómákkal való transzlokációban. Mindenesetre éppen az előbbi tény magyarázza, hogy az ilyen átrendeződések gyakorisága a várakozáson aluli szinten van. Ha a spermatocitákban minden bivalens egyforma lehetőséggel rendelkeznék arra — függetlenül a méretétől —, hogy multivalens konfigurációban részt vegyen, akkor 190 ilyen lehetséges pár volna elképzelhető, melyek közül

19 lenne X/autoszóma, illetve Y/autoszóma, vagyis 10 %. Ezért az általunk talált transzlokációk között elméletileg 28-nak kellett volna ivari kromoszóma/autoszóma transzlokációnak lenni, ugyanakkor a megfigyelt érték 12 volt, ami az X és az Y kromoszóma között 9:3 arányban oszlott meg. Ha annak lehetősége, hogy egy bivalens részt vegyen a transzlokációban, arányos lenne a méretével, akkor az arányok némileg módosulnának. Az újabban kifejlesztett és pontos identifikációt lehetővé tevő ASG technikával [4] mitotikus kromoszómákon végzett mérések alapján ismeretes, hogy az X kromoszóma mintegy háromszorosa az Y kromoszómának, s hogy együttesen az X és az Y kromoszóma a genom teljes hosszának 8,3 %-át teszi ki. Ha a mitotikus kromoszómák méretét durván extrapoláljuk a meiotikus bivalensekre, akkor a méret alapján a megfigyelt transzlokációink 8,3 %-ának, vagyis 23,4-nek kellett volna X vagy Y kromoszómát tartalmazni. Az ivari kromoszóma/autoszóma átrendeződések megfigyelt és várt arányának különbsége az 5 %-os szinten statisztikailag szignifikáns.

Az ivari kromoszómák és az autoszómák között akkor történhet kicserélődés, ha a szex-vezikulum károsodik, vagy eltűnik, s így lehetővé válik az ivari kromoszómák és az autoszómák érintkezése. A másik lehetőség az, hogy az X, illetve Y kromoszómában okozott törések, melyek akkor indukálódtak, míg ezek a kromoszómák a szex-vezikulumban voltak, kicserélődésre képes állapotban maradnak a diploténig, illetve diakinézisig, mikoris vagy restitúció, vagy a károsodott autoszómákkal való kicserélődés történik. A korai meiotikus profázis alatt az XY bivalens kondenzált állapota a törések reparációját meggátolhatja mindaddig, míg a bivelens kevésbé kondenzálttá válik, miután a szex-vezikulumot elhagyta, melyhez hasonló szituációt talált Muller [21] *Drosophila* és Failla [11] az *Arbacia* spermiumai fejének szorosra tömött kromoszómáiban. Ezekben a fajokban ismeretes, hogy az átrendeződések és a törések reparációja mindaddig késik, míg a hím előmag be nem lép a petébe a termékenyítéskor.

Végül egy kísérletsorozatban Kofman-Alfaro és Chandley [14] kimutatták, hogy az egérben a meiotikus profázis különböző stádiumainak különbözik a röntgensugárzás által kiváltott „nem-programozott" DNS szintézisre vonatkozó érzékenysége. Ez a jelenség az emlős sejtekben „reparatív replikáció" [24] néven ismeretes. Nagyon érdekelt bennünket, hogy lehet-e találni összefüggést a programon kívüli DNS szintézis szintje és az aberrációk indukciójának stádiumérzékenysége között, ami megoldhatná azt a kérdést, hogy a kromoszómatörések reparációjában a programon kívüli DNS-szintézisnek szerepe van-e. Wolf és Scott [32], valamint Schaeffer és mtsai [25] vizsgálataiból kitűnik, hogy a két folyamat nem identikus, így nem volt meglepő, hogy kísérleteinkben azt találtuk, hogy az a stádium, amely a programon kívüli DNS szintézis legmagasabb szintjét mutatta röntgen- és UV-besugárzás után (vagyis a késői zigotén és korai pachytén), a kromoszóma aberrációt indukáló hatás tekintetében nem jelentett különbséget a profázis más stádiumaival szemben.

Összefoglalás

Hat különböző időpontban történt 100, illetve 200 rad egésztest-besugárzás után — a meiotikus osztódás menetrendjének ismeretében — vizsgáltuk a pre-leptotén, a leptotén, a zigotén, a pachytén, a diplotén, illetve a diakinézis stádiumok röntgensugár-érzékenységét egerek spermiogenezisében.

Megállapítottuk, hogy a két sugárdózis hatása között a korai meiotikus szakaszokban kisebb, a későbbiekben nagyobb különbségek vannak a kromoszóma-átrendeződések indukciója tekintetében.

A kiváltott kromatid törések szintje meredeken, az izokromatid töréseké fokozatosan emelkedik a meiózis előrehaladtával. A multivalens asszociációk nagyjában egyforma szinten indukálhatók a meiózis egész lefolyása alatt, míg az autoszomális univalensek és a szex-kromoszóma univalensek (nem kapcsolódó XY) előfordulása lényegében nem különbözik a kontroll csoporttól.

A multivalens asszociációk között figyelmet érdemelnek azok, melyek autoszóma és szex-kromoszóma közötti kicserélődést tartalmaznak. Ezek olyan stádiumokban is keletkezhetnek a vizsgálatok tanúsága szerint, mikor a szex-kromoszómák a szex-vezikulumba vannak bezárva, így csak korlátozott lehetőség van arra, hogy autoszómával érintkezzenek.

A multivalens asszociációk számaránya a különböző stádiumokban nem változik lényegesen, a kromatid, illetve izokromatid töréseknek a diakinézistől a leptoten felé történő csökkenése viszont inkább az időarányos restitúcióval, semmint a különböző méretű károsodással magyarázható.

IRODALOM

1. Ashwood-Smith, M. J., Evans, E. P. and Searle, A. G. (1965) The effect of hypothermia on the induction of chromosomal mutations by acute X-irradiation of mice. *Mutation Res.*, **2**, 544—555.
2. Bateman, A. J. (1958) Mutagenic sensitivity of maturing germ cells in the male mouse. *Heredity*, **12**, 213—232.
3. Brewen, J. G., Payne, H. S. and Adler, I. D. (1977) X-ray induced chromosome aberrations in mouse dictyaate oocytes. II. Fractionation and dose rate effects. *Genetics*, **87**, 699—708.
4. Buckland, R. A., Evans, H. J. and Sumner, A. T. (1971) Identifying mouse chromosomes with the ASG technique. *Exp. Cell Res.*, **69**, 231—235.
5. Carr, D. H. and Walker, J. E. (1961) Carbol fuchsin as a stain for mammalian chromosomes. *Stain. Technol.*, **36**, 233—236.
6. Chambers, J. B. and Chapman, A. B. (1977) Genetic effects of acute spermatogonial X-irradaiation of the laboratory rat. *Genetics*, **85**, 309—317.
7. Clendenin, T. M. (1969) Intraperitoneal colchicine and hypotonic KCl for enhancement of abundance and quality of meiotic chromosome spreads from hamster testes. *Stain Technol.*, **44**, 63—69.
8. Edwards, R. G. and Sirlin, J. L. (1958) The effect of 200 r of X-rays on the rate of spermatogenesis and spermiogenesis in the mouse. *Exp. Cell Res.*, **15**, 522—528.
9. Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964) An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics*, **3**, 289—294.

10. Evans, H. J. and Sparrow, A. H. (1961) Nuclear factors affecting radiosensitivity. II. Dependence on nuclear and chromosome structure and organization. *Fund. Aspects of Radiosensitivity Brookhaven Symp. in Biol.*, **14**, 101—127.
11. Failla, P. M. (1962) Recovery from radiation-induced delay of cleavages in gametes of *Arbacia punctuata*. *Science*, **138**, 1341—1342.
12. Ford, C. E., Searle, A. G., Evans, E. P. and West, B. J. (1969) Differential transmission of translocations induced in spermatogonia of mice by irradiation. *Cytogenetics*, **8**, 447—470.
13. Kofman-Alfaro, S. and Chandley, A. C. (1970) Meiosis in the male mouse. An autoradiographic investigation. *Chromosoma*, **31**, 404—420.
14. Kofman-Alfaro, S. and Chandley, A. C. (1971) Radiation initiated DNA synthesis in spermatogenetic cells of the mouse. *Exp. Cell Res.*, **69**, 33—34.
15. Lea, D. E. (1956) *Actions of radiations on living cells*. Cambridge University Press, Cambridge.
16. Leonard, A. and Deknudt, Gh. (1967) Relation between the X-ray dose and the rate of chromosome rearrangements in spermatogonia in mice. *Radiat. Res.*, **32**, 35—41.
17. Leonard, A. and Deknudt, Gh. (1968) Chromosome rearrangements after low X-ray doses given to spermatogonia of mice. *Canad. J. Genet. Cytol.*, **10**, 119—124.
18. Lyon, M. F. and Meredith, R. (1966) Autosomal translocations causing male sterility and viable aneuploidy in the mouse. *Cytogenetics*, **5**, 335—354.
19. Lyon, M. F., Phillips, R. J. S. and Searle, A. G. (1964) The overall rates of dominant and recessive lethals and visible mutations induced by spermatogonial X-irradiation of mice. *Genet. Res.*, 448—467.
20. Mitra, S. (1958) Effects of X-rays on chromosomes of *Lilium longiflorum* during meiosis. *Genetics*, **43**, 771—789.
21. Muller, H. J. (1940) Analysis of the process of structural change in chromosomes of *Drosophila*. *J. Genet.*, **40**, 1—66.
22. Oakberg, E. F. (1955) Sensitivity and time of degeneration of spermatogenic cells irradiated in various stages of maturation in mice. *Radiat. Res.*, **2**, 369—391.
23. Oakberg E. F. and DiMinno, R. L. (1960) X-ray sensitivity of primary spermatocytes of the mouse. *Int. J. Radiat. Biol.*, **2**, 196—209.
24. Painter, R. B. and Cleaver, J. E. (1969) Repair replication, unscheduled DNA synthesis, and the repair of mammalian DNA. *Radiat. Res.*, **37**, 451—466.
25. Schaeffer, J., Vincent, R. A. and Merz, T. (1971) Chromosomal rejoining in the absence of unscheduled synthesis. *Mutation Res.*, **11**, 256—257.
26. Searle, A. G. (1964) Genetic effects of spermatogonial X-irradiation on productivity of F_1 female mice. *Mutation Res.*, **1**, 99—108.
27. Searle, A. G., Evans, E. P., Ford, C. E. and West, B. J. (1968) Studies on the induction of translocations in mouse spermatogonia. *Mutation Res.*, **6**, 427—436.
28. Searle, A. G., Evans, E. P. and West, B. J. (1969) Studies on the induction of translocations in mouse spermatogonia. II. Effects of fast neutron irradiation. *Mutation Res.*, **7**, 235—240.
29. Sega, G. A., Sotomayor, R. E. and Owens, J. G. (1978) A study of unscheduled DNA synthesis induced by X-rays in the germ cells of male mice. *Mutation Res.*, **49**, 239—257.
30. Szemere, G. and Chandley, A. C. (1976) A simple staining method for the analysis of meiotic metaphase II. divisions in the male mouse. *Stain Technol.*, **51**, 64—66.
31. Wennström, T. (1971) Effect of ionizing radiation on the chromosomes in meiotic and mitotic cell. *Soc. Sci. Fenn.*, **45**, 5—60.
32. Wolff, S. and Scott, D. (1969) Repair of radiation-induced damage to chromosomes. *Exp. Cell Res.*, **55**, 9—16.

X-RAY SENSITIVITY OF MURINE SPERMATOCYTES DURING THE DIFFERENT STAGES OF MEIOTIC DIVISION

G. Szemere and *Ágnes Zsibrita*
Institute of Medical Biology, University Medical School,
Szeged, Hungary

The pre-leptotenic, leptotenic, zygotenic pachytenic and diakinetic stages of murine spermatogenesis were examined for X-ray sensitivity after whole body irradiation of male mice with 100 and 200 r in six different time periods corresponding with the stages of meiotic division.

The chromosomal rearrangements induced at the two levels of exposure differed little in the initial stages, but notably in the later ones.

The level of chromatid breaks increased abruptly, while that of iso-chromatid breaks gradually as the meiotic division proceeded. Multivalent associations could be induced at a roughly constant level during the entire course of meiosis. Autosomal univalent and sex-chromosomal univalent (non-joining XY) incidence did not notably differ from the control.

Among the multivalent associations those containing sex-chromosome/autosome rearrangements deserve special mention. These may also arise in those stages in which the sex-chromosomes are enclosed in the sex vesicle, i. e. when they are practically prevented from adjoining to an autosome.

The proportion of multivalent associations did not notably change from stage to stage. The decreasing incidence of chromatid or iso-chromatid breaks from the diakinetic towards the leptotenic stage may have been due to a time-related restitution rather than to different degrees of injury.

Biológia, **26**, 1978, *167—173*

SZEX-ÁTFORDÍTÁSI KÍSÉRLETEK PARADICSOMHALON
(Macropodus opercularis L.*)*

SZÉKELY SÁNDOR, BERCSÉNYI MIKLÓS* ÉS CSÁNYI VILMOS
Eötvös Lóránd Tudományegyetem Magatartásgenetikai Osztály, Göd és
*Temperáltvizű Halszaporító Gazdaság, Százhalombatta

Beérkezett: 1978. október 10.

Kulcsszavak: szex-átfordítás, paradicsomhal, szex-determináció, tesztonteron

Bevezetés

A szex-átfordítás, a hím vagy női ivartermékek genetikai nemtől független előállítása tág manipulációs lehetőségeket nyújt az alkalmazott genetikában. Módszerként szolgálhat a szex öröklésmenetének eldöntéséhez, és segítségével monoszex populációk is viszonylag egyszerű módon létrehozhatók.

A genetikai szex-determináció a gerincesek között a halak osztályában (Pisces) a legváltozatosabb és egyben a leglabilisabb is. Szinkron és konszekutív hermafroditáktól kezdve XX—XY, WZ—ZZ, sőt WY—YY rendszerű (hím és női heterogámia ugyanazon fajon belül; *Xiphophorus maculatus*, ahol Z = Y) szexmeghatározás is előfordul. Mindezek gyakran autoszómális szexmeghatározó faktorokkal egészülnek ki [1, 15]. Spontán szexátfordulásról is több halfaj esetében jelentek meg közlemények [4, 15].

Mesterséges úton többféle lehetőség adódik a szex-átfordításra. Az egyik, a már kifejlett gonádok eltávolítása; melyet a gonád-primordiumból kiinduló, de az ellenkező nemre jellemző ivarszervek kifejlődése követhet. Ezt a technikát először NOBLE alkalmazta *Betta splendens*en [10].

A szex-átfordítás egy másik lehetősége az, hogy fejletlen állapotban, amikor az egyedek neme fiziológiailag még nem dőlt el, nemi hormonokat juttatnak a szervezetbe. Ezzel az ivarszervek kifejlődése az egyik vagy másik irányba eltolható. Ilyen módszerrel sikerült teljes (fertilis) átalakítást elérni guppi *(Poecilia reticulata)*, aranyhal *(Carassius auratus)*, továbbá *Orizias latipes* és *Tilapia mossambica* esetében [2, 3, 14, 16].

A kísérleteinkben használt kínai paradicsomhal *(Macropodus opercularis*, L., Belontiidae, Anabantoidei) több szempontból alkalmas alany szex-átfordítási kísérletekhez. Labirint-kopoltyús lévén hosszabb ideig tartó műtét is elvégezhető száraz környezetben, levegőn; gonádjainak elhelyezkedése pedig, — a hasüreg hátsó részében — viszonylag egyszerű műtéti procedúrát tesz lehetővé. A szexdifferenciáció előtti hormonális beavatkozásra is megfelelő lehetőség adódik: az ivarszervkezdemény csak a kikelést követő 20—25. napon kezd petefészekké vagy herévé differenciálódni [13]. Idősebb nőstényeken, néhány esetben spontán szex-átfordulást is megfigyeltek [12].

Vizsgálataink közvetlen célja, egyrészt fiatal korban a tesztoszteron kezelés leghatékonyabb, kritikus periódusának megkeresése; másrészt felnőtt állatok szex-átfordítása műtéti úton mindkét irányba.

Anyag és módszer

A kísérleteinkhez felhasznált paradicsomhalak laboratóriumunk beltenyésztett törzseiből származnak. A beltenyésztés testvér-testvér párosítással történik, az itt alkalmazott törzsek esetében több mint tíz generáció óta.

Hormonkezelés

A szexdifferenciációt, illetve a szexuális maturációt megelőző hormonális beavatkozásra metiltesztoszteron készítményt (Pfaltz and Bauer Inc.) használtunk. Az állatok táplálékába keverten juttattuk a szervezetbe 10, 100, illetve 500 μg/g táplálék koncentrációban.* A táplálék minősége az alanyok életkorától függően változott; a kikelés utáni egyhetes periódusban főtt tojássárgájában, 1 hónapos korig szárított Tetra Ovin, majd Tetra Growth Food készítményben adtuk a hormont, ad libitum. Az állatok artémiát, később tubifexet is kaptak kiegészítő tápanyagként a hiánybetegségek megelőzésére.

A hormonkezelésekhez az Y törzs egyetlen szülőpártól származó populációját (kb. 300 egyedet) használtunk. A kikelésük utáni első két hónap során kaptak hormontartalmú eleséget, különböző időszakokban. A kontroll, ill. az éppen nem kezelt csoportokat azonos minőségű, de hormont nem tartalmazó táplálékkal etettük. Az állatokat a kezelésnek megfelelő csoportokban külön akváriumokban tartottuk, 25$\pm$2 °C-on, 12 órás éj-nappal ciklusban. A szexmeghatározás 4 hónapos korban történt, a gonádok fénymikroszkópos vizsgálatával.

Gonád-eltávolítás

Operáció előtt az állatokat tripaflavinos fertőtlenítő és triacin-metánszulfonát (MS 222; Ayerst), altatót tartalmazó oldatba tettük. A hasfalat az egyik oldalon, az ivarnyílás fölött megnyitva, a gonádokat eltávolítottuk. Nőstények esetében az ivarszerv helyére antibiotikummal átitatott spongosztán-darabot tettünk (Spongostan Standard, Ferrosan), és bevarrás után a sebet Histoacryllal (B. Braun Melsungen) zártuk. Műtét után az állatok fertőtlenített vizű akváriumokba kerültek. A mortalitás kb. 20 %-os volt.

Gonád-eltávolítást 10 hím és 10 nőstény állaton végeztünk (V$\times$S hibrid), 8 hónapos korban. A műtétet követő 1 hónapban a petefészekirtott halak 100 μg/g metiltesztoszteront, a hereirtottak 100 μg/g östradiolt (Merck) tartalmazó táplálékot kaptak. Két külön csoportban, 40 l-es akváriumokban tartottuk a műtött állatokat.

6 hónappal a műtét után megkíséreltük a petefészekirtott állatokat nőstényekkel (S és L törzs), a hereirtottakat pedig hímekkel (X törzs) pároztatni. Az utódaik nemét hat hetes korban detektáltuk. A sikeres (fertilis) szex-átfordulást nem mutató állatokon fénymikroszkóppal ellenőriztük a gonádregeneráció eredményét.

* Tesztoszteron származékok összehasonlító vizsgálatáról és a szervezetbe juttatás különböző módszereiről YAMAMOTO ad áttekintést [15].

Eredmények és megvitatás

Kísérleteinkben a metiltesztoszteron-kezelés elsődleges hatásaként, a hímekre jellemző morfológiai és magatartásbeli jegyek — az alkalmazott dózistól függően — még jóval az ivarérés előtt jelentkeztek. Ez az androgénekre sok fajnál leírt jelenség [6, 7], esetünkben biztosítékul szolgál arra, hogy a hormon felszívódását ellenőrizzük. (Androgén-inhibitorokkal jellegzetesen ellentétes hatás érhető el [11].)

1. táblázat

Szexarány-változások metiltesztoszteron kezelés (MT) hatására, különböző kezelési időtartam és hormonkoncentrációkat alkalmazva a kikelést követő első két hónap során. (Zárójelben a hímek százalékos arányát tüntettük fel.)

Table I. Alterations in the sex ratio of paradise fish (Macropodus opercularis) fry under the influence of methyltestosteron (MT) treatment at different concentrations and for different periods of time between days 1 and 62 after hatching. (The figures in brackets show the percentual proportion of males.)

Kontroll 19 : 15 (56 %)

Kezelés (a kikelést követően)	10 μg/g MT hím : nőstény (db)	100 μg/g MT hím : nőstény (db)	500 μg/g MT hím : nőstény (db)
1—33. nap	6 : 5 (55 %)	9 : 9 (50 %)	
33—43. nap		11 : 4 (73 %)	10 : 4 (71 %)
33—62. nap		11 : 3 (79 %)*	1 : 18 (5 %)
1—62. nap	11 : 7 (61 %)	1 : 17 (6 %)	0 : 2 (0 %)

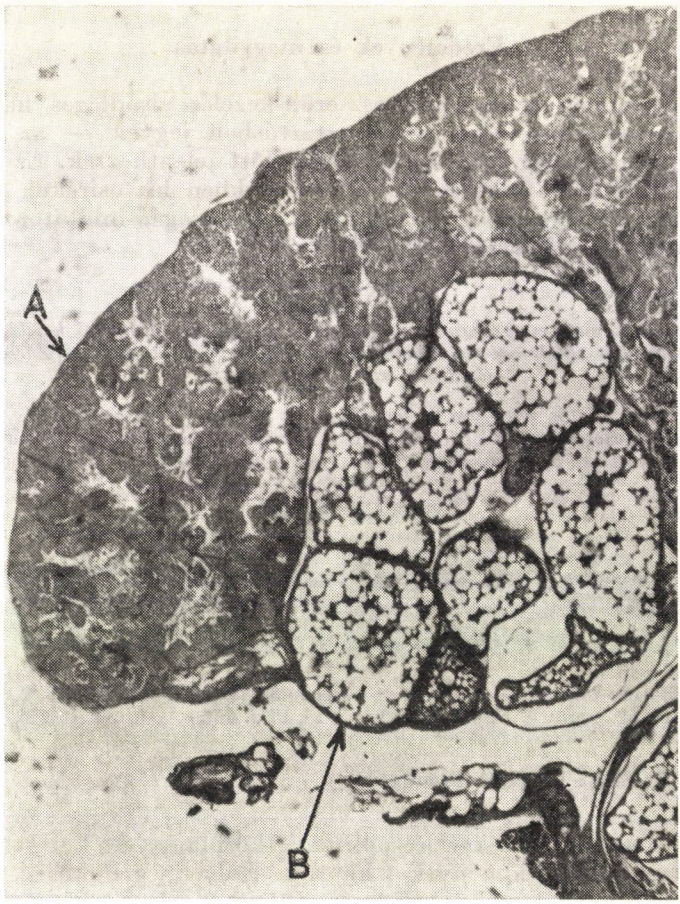
*Továbbá két hermafrodita.

A metiltesztoszteron-kezelés optimális körülményeit keresve az *1. táblázat*ban összefoglalt eredményeket kaptuk. Noha meglehetősen tág kezelési idő és hormon-koncentráció tartományokban dolgoztunk, nem találtunk olyan paramétereket, amelyeknél a szex-átfordulás száz százalékos lett volna (hím-monoszex populáció). Hímek felé történő szex-arány eltolódást azonban sikerült létrehozni. A leghatékonyabb kezelési periódus a kikelés utáni 33—43. nap közé esik; az optimális dózis 100 μg/g. Nagyobb hormondózisoknál a nőstények irányába történt szexarány eltolódásokat a más fajokon is tapasztalt paradox feminizációval magyarázhatjuk [9]. Szélsőségesen nagy kezelési időtartam és hormonkoncentráció egybeesésekor a mortalitás jelentősen emelkedik.

Az androgén-kezelés hatásaként néhány esetben hermafrodita gonád-képződményeket is találhattunk (*1. kép*), hasonlóan JALABERT és mtsai pisztrángon kapott eredményeihez [5].

Sikeres szex-átfordulást értünk el a gonád-eltávolítások segítségével. A petefészekirtást túlélő 9 állat közül háromban here regenerálódott, míg a hereirtást túlélők egyikében petefészek (*2. táblázat*). Ezek az arányok hasonlóak LOWE és LARKIN *Betta splendens*en kapott eredményeihez (ahol petefészek-eltávolítást követően 42 %-ban here, 23 %-ban petefészek regenerálódott) [8].

A három maszkulinizálódott nőstény közül kettő, valamint a nősténnyé átalakult hím fertilisnek bizonyult. Utódnemzedékeik szexarányának vizs-



1. kép. Korai hormonkezelés hatására kialakult hermafrodita gonád-képződmény (100 μg MT/g táplálék; a kikelés utáni 33—62. nap időtartamban adagolva). *A)* Hereképződmény, *B)* ovárium

Fig. 1. Hermaphroditic gonad developed in consequence of early hormonal treatment with 100 μg MT in one g feed between days 33 and 62 after hatching. *A)* Testicular structure; *B)* ovarial structure

2. táblázat
Gonád regeneráció, a gonád-eltávolítás után hat hónappal

Table II. Regeneration of the gonads six months after gonadectomy

	Petefészekirtott állatok (db)	Hereirtott állatok (db)
Műtöttek	10	10
Túlélők	9	7
Hereképződés	3	4
Petefészekképződés	3	1
Indifferens kötőszövet	3	2
Sikeres (fertilis) szex-átfordulás	2	1

3. táblázat
Szexarányok a szex-átfordított egyedek utódnemzedékeiben

Table III. Sex ratios in the offspring groups of fertile sex-reversed Macropodus opercularis fish

Keresztezés		Az utódok szexaránya	
hím	nőstény	hímek (db)	nőstények (db)
Pi_1	$\times L_1$	0 :	52
Pi_1	$\times L_1$ (ismétlés)	0 :	149
Pi_1	$\times L_2$	1 :	32
Pi_1	$\times S_1$	2 :	52
Pi_2	$\times L_1$	0 :	21
Pi_2	$\times L_2$	0 :	25
X_1	$\times Hi_1$	31 :	13

(Pi-vel jelöltük a fertilis hímmé alakult petefészekirtott és *Hi*-vel a nősténnyé változott állatokat; az *S*, *L*, *X*, beltenyésztett törzseink jelei. Az indexként feltüntetett szám az egy törzshöz tartozó egyedek megkülönböztetését szolgálja.)

(*Pi* designates the fertile female-to-male, *Hi* the fertile male-to-female reversions produced by gonadectomy; *S*, *L* and *X* are the symbols for the inbred fish strains used; the index figures are affixed for individual distinction)

gálata arra is lehetőséget adott, hogy alanyaink genetikai szexdeterminációra következtessünk (*3. táblázat*). A keresztezések eredményeiből első közelítésben egyszerűbb, hím heterogamétás szexdeterminációra következtethetnénk (az YY letalitását feltételezve). A Pi_1 x L_2 és a Pi_1 x S_1 keresztezésekben előforduló hímek azonban cáfolják ezt a lehetőséget. Egyéb, nem közölt adatainkkal együtt, ezek az esetek több-faktoros szexdeterminációra rendszerre utalnak, melynek bizonyítása további vizsgálatokat igényel.* SCHWIER hasonló következtetésre jutott egy közeli rokonfajnál, a *Macropodus concolor*nál [13].

Lehetségesnek tartjuk, hogy egy poligénes szexmeghatározó mechanizmus a magyarázata annak, hogy a hormonkezeléses kísérleteink nem vezettek száz százalékos eredményre. Elképzelhető, hogy a szexdifferenciáció során bizonyos szex—gén-kombinációkkal rendelkező egyedek kevésbé fogékonyak az androgén hatásokra. Hasonlóképp feltételezhető egy ilyen hatás a műtéti úton történő szex-átfordítás esetében is, bár itt a sikerességet a műtéti technika is erősen befolyásolhatja.

Az átszexálás fenti technikái tág variációs lehetőségeket kínálnak a *Macropodus opercularis* szexuális magatartásának vizsgálatában. További munkáinkban a szexuális magatartás-elemeknek a szex-átfordulás folyamán történő módosulásait, továbbá hormonhatásokkal való összefüggését kívánjuk vizsgálni.

* Pl. az Y jelzésű beltenyésztett törzsnél négy, azonos körülmények között ikrázott testvérpár utódnemzedékeiben 33, 55, 56 és 76 % volt a hímek aránya.

Összefoglalás

A szex fenotípus átfordításának lehetőségeit vizsgáltuk korai hormonális kezeléssel, illetve kifejlett ivarszervek műtéti eltávolításával *Macropodus opercularison*. Megállapítottuk, hogy az egyéb halfajokon kapott eredményekhez hasonlóan, a szex-átfordítás a *Macropodus opercularis* esetében is lehetséges. A metiltesztoszteron-kezelés leghatékonyabb periódusát a kikelés utáni 33—43. nap közti időszakra állapítottuk meg; optimális hormonkoncentrációnak a 100 μg/g táplálék mutatkozott. Gonád-eltávolítással fertilis szex-átfordított egyedeket sikerült létrehoznunk, hím és nőstény esetében is. Az átszexált és kontroll állatok keresztezési eredményei arra utalnak, hogy a *Macropodus opercularis* szex-determinációja poligénes rendszerű.

IRODALOM

1. Bull, J. J. and Charnov, E. L. (1977) Changes in the heterogametic mechanism of sex determination. *Heredity*, **39**, 1—14.
2. Clemens, H. P. and Inslee, T. (1968) The production of unisexual broods by *Tilapia mossambica* sex-reversed with methyl testosterone. *Transactions of the American Fisheries Society*, **97**, 18—21.
3. Dzwillo, M. (1962) Über künstliche Erzeugung funktioneller Männchen weiblichen Genotyps bei *Lebistes reticulatus*. *Biol. Zentralbl.*, **81**, 575—584.
4. Huang, C. C., Lo, C. F. and Chang, K. H. (1974) Sex reversal in one sparid fish, *Chrysophrys major* (Perciformes, Sparidae). *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica*, **13**, 55—60.
5. Jalabert, B., Billard, R. and Chevassus, B. (1975) Preliminary experiments on sex control in trout: Production of sterile fishes and simultaneous self-fertilizable hermaphrodites. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **15**, 19—28.
6. Liley, N. R. (1970) Hormones and reproductive behaviour in Fishes. *In:* Hoar, W. S. and Randall, D. J. (ed.): *Fish Physiology*. Academic Press, New York and London Vol. 2., 72—113.
7. Liley, N. R. and Wishlow, W. (1974) The interaction of endocrine and experimental factors in the regulation of sexual behaviour in the female guppy *Poecilia reticulata*. *Behaviour*, **48**, 185—214.
8. Lowe, T. P. and Larkin, J. R. (1975) Sex reversal in *Betta splendens* Regan with emphasis on the problem of sex determination. *J. Exp. Zool.*, **191**, 25—32.
9. Nakamura, M. (1975) Dosage-dependent changes in the effect of oral administration of methyltestosterone on gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*. *Bull. of Faculty of Fisheries Hokkaido Univ.*, **26**, 99—108.
10. Noble, G. K. and Kumpf, K. F. R. (1937) Sex reversal in the fighting fish, *Betta splendens*. *Anat. Record*, **70**, 97.
11. Rouse, E. F., Coppenger, C. J. and Barnes, P. R. (1977) The effect of an androgen inhibitor on behavior and testicular morphology in the stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Hormones and Behavior*, **9**, 8—18.
12. Schmidt H. (1930) Geschlechtsumwandlungen bei Labyrinthfischen. *Ibid.*, September, 161—163. Ref.: Breder, C. M. and Rosen, D. E. *Modes of Reproduction in Fishes*. Nat. Hist. Press, New York (1966).
13. Schwier, H. (1939) Geschlechtsbestimmung und differenzierung bei *Macropodus opercularis, concolor chinensis* und deren Artbastarden. *Z. Induktive Abstammungs Vererbungslehre*, **77**, 291—335.
14. Yamamoto, T. (1959) A further study of induction of functional sex reversal in genotipic males of the medaka *(Oryzias latipes)* and progenies of sex reversals. *Genetics*, **44**, 739—757.
15. Yamamoto, T. (1969) Sex differentiation. *In:* Hoar, W. S. and Randall, D. J. (eds.): *Fish Physiology*, Vol. III., 117—175. Academic Press, New York and London.
16. Yamamoto, T. and Kajishima, T. (1969) Sex-hormonic induction of reversal of sex differentiation in the goldfish and evidence for its male heterogamety. *J. Exp. Zool.*. **168**, 215—222.

SEX REVERSAL EXPERIMENTS IN PARADISE FISH
(*Macropodus opercularis* L.)

S. Székely, M. Bercsényi and V. Csányi*
Department of Behavior Genetics, L. Eötvös University, Göd, Hungary and
*Warmwater Fish Hatchery, Százhalombatta, Hungary

The possibilities of phenotypic sex reversal by early hormonal treatment of young animals or gonadectomy followed by hormonal treatment in adult *Macropodus opercularis* were examined. It was found as in the case of other fish species that the sex reversal of paradise fish was possible.

An androgen sensitive period was found between 33—43 days after hatching. The optimal dosage of the androgen was 100 μg/g food. Both sex phenotype can be reversed by gonadectomy followed by the appropriate hormon treatment in the adult fish. The sex ratio in the progeny of the sex reversed individuals hints polygenic sex determination mechanism in *Macropodus opercularis*.

Biológia, 26, *1978*, *175—194*

A SZÍVMŰKÖDÉST SZABÁLYOZÓ NEURONHÁLÓZAT *ACHATINA FULICA* FÉRUSSAC (GASTROPODA, MOLLUSCA) KÖZPONTI IDEGRENDSZERÉBEN

S.-RÓZSA KATALIN
MTA Biológiai Kutatóintézete, Tihany

Beérkezett: 1975. május 2-án

Kulcsszavak: Gastropoda, szívműködés szabályozás, identifikált neuron hálózat, analóg sejtek mintázata, elektrotónusosan kapcsolt sejtek.

Bevezetés

Az afrikai óriás csiga (*Achatina fulica* Férussac) laboratóriumi viszonyok között könnyen tenyészthető és hasonlóan más Gastropoda fajokhoz, jól identifikálható neuronokkal rendelkezik. E fajt TAKEUCHI és mtsai [17, 18] transzmitterek és aminósavak hatásmechanizmusának vizsgálatára használták. CHASE és GOODMAN [2] pedig az *Achatina* jobb parietalis ganglionjában elhelyezkedő neuroszekréciós sejtcsoport tulajdonságait tanulmányozták és analógiába állították az *Aplysia* abdominális ganglionjának neuroszekréciós sejtjeivel. Nincsenek viszont adatok az *Achatina* központi idegrendszerében azonosítható neuronok egymás közti kapcsolatáról, valamint a perifériás szabályozásban való részvételükről.

Más Gastropodák közül az *Aplysia californica* abdominális ganglionjában [9, 11], *Helix pomatián* pedig a viscerális és jobb parietális ganglionban [12—15] tárták fel a szívműködés szabályozását ellátó neuronhálózatot. Jelen vizsgálataink célja az *Achantina* szívének és cardio-renális rendszerének szabályozását végző központi neuronok identifikálása és összevetése volt más Gastropoda fajokon nyert adatokkal.

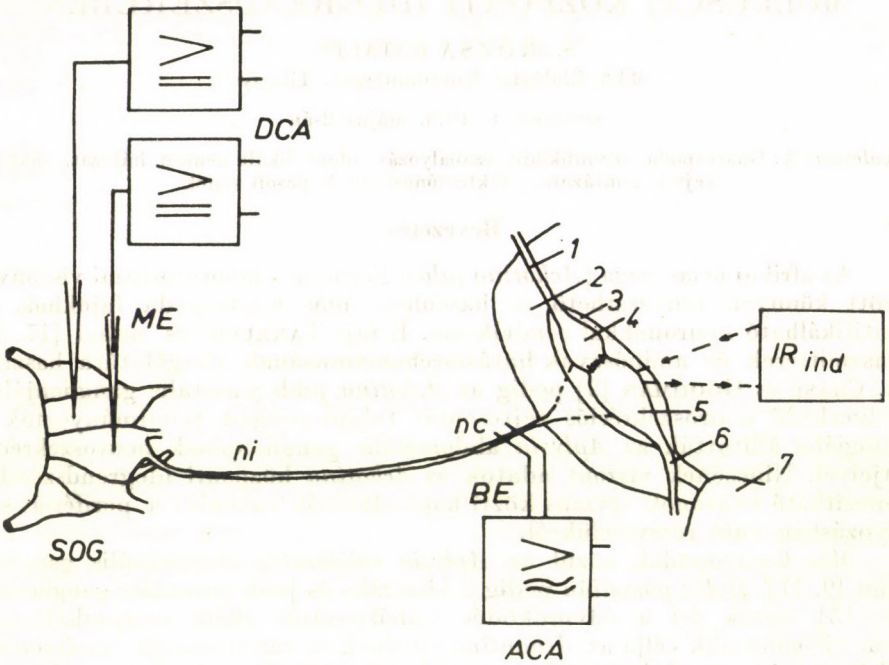
Vizsgálataink kiterjedtek annak tisztázására is, hogy a szív szabályozását homológ sejtek végzik-e az egyes fajokban, illetve, hogy Gastropodákon belül előfordulnak-e az adott faj rendszertani helyzetétől függő variációk.

Anyag és módszer

Vizsgálatainkat laboratóriumban (30 °C) tenyésztett *Achatina fulica* Férussac ivarérett egyedein végeztük. Kísérleteinkben a központi idegrendszert, szívet, illetve az ahhoz csatlakozó pericardiumot, véredényeket, vesét, májat, valamint a kettőt összekötő n. intestinálist tartalmazó preparátumot használtunk (*1. ábra*). A készítményt központi idegrendszerre leírt fiziológiás oldatban helyeztük el [16]. A ganglionok felszíni sejtjeinek tájékozódó jellegű identifikálását a kötőszöveti hártya eltávolítása és 0,1 %-os metilén-kékkel történő festés után végeztük.

Vizsgálataink során a szív kontraktilis aktivitását és az esetenként kiválasztott két központi neuron intracelluláris, valamint a szívideg extracelluláris aktivitását egyidejűleg regisztráltuk. A szív kontrakciók regisztrálása foto-optikus módszerrel történt [20]. Az intesztinális idegről bipoláris Ag/AgCl elektródákkal extracelluláris aktivitást vezettünk el, s ennek frekvencia-

változását kísértük nyomon a szív ingerlésére, ill. a szóma-aktivitással korreláló extracelluláris jeleket felhasználtuk szenzoros és motoros neuronok elkülönítésére. A központi idegrendszer sejtjeinek nyugalmi (MP)- és akciós (AP)-potenciálját 2,5 M KCl-dal töltött mikroelektródákkal vezettük el, a jelek erősítése és elvezetése nagy bemenő ellenállású, negatív kapacitású erősítővel



1. ábra. Agy-szív készítmény és a kísérleti elrendezést bemutató séma.
ACA, DCA — erősítők, IR_{ind} — szív kontrakció regisztrálás, ME — mikroelektródák, BE — bipoláris elektróda, SOG — garat alatti ideggyűrű, ni — n. intestinális, 1 — véna pulmonális, 2 — máj, 3 — pericardium, 4 — pitvar, 5 — kamra, 6 — aorta, 7 — vese

Fig. 1. Brain-heart preparation and the experimental setap.
ACA, DCA — amplifiers; IR_{ind} — registration of heart contractions, ME — microelectrodes, BE — bipolar electrode, SOG — suboesophageal ganglia, ni. — intestinal nerve; 1 — pulmonal vein, 2 — liver, 3 — pericardium, 4 — auricle, 5 — ventricle, 6 — aorta, 7 — kidney

történt [19]. A kísérletekben Tektronix oszcilloszkópot és négycsatornás GOULD BRUSH-440 kiírót használtunk.

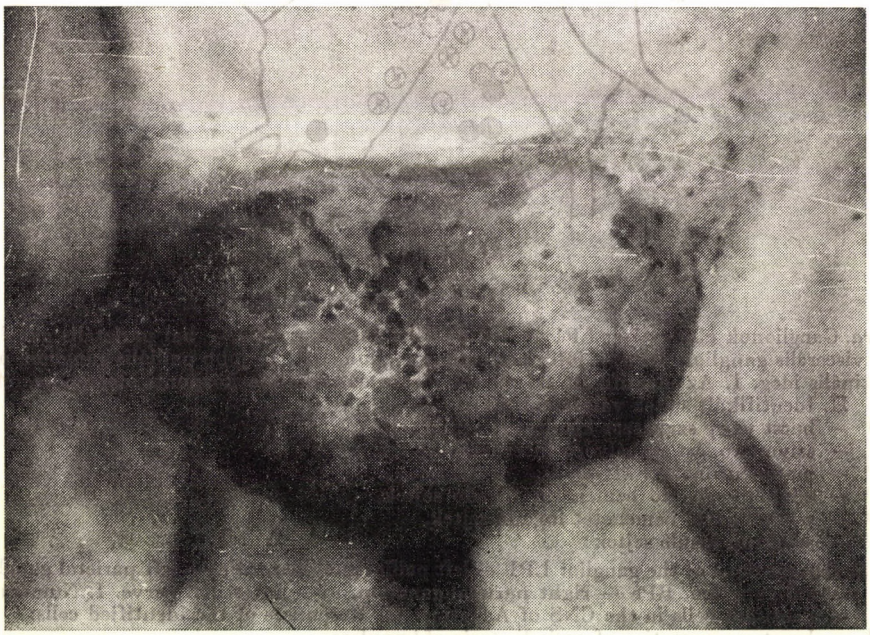
Minden központi sejt reakcióját többfajta perifériás mező (szív, pericardium, véredények, vese, máj) taktilis ingerlésekor vizsgáltuk. Egyes esetekben kémiai ingerként 5-hidroxitriptamint (5HT) alkalmaztunk. A sejtek visszahatását a szívműködésre a sejtmembrán hiper- vagy depolarizálásával ellenőriztük. A posztszinaptikus potenciálok jellegét a membránpotenciál változtatásával elemeztük. A vizsgálatokat szobahőmérsékleten (22—26 °C) végeztük.

Eredmények

1. Achatina központi idegrendszerének vizuálisan identifikálható sejtjei

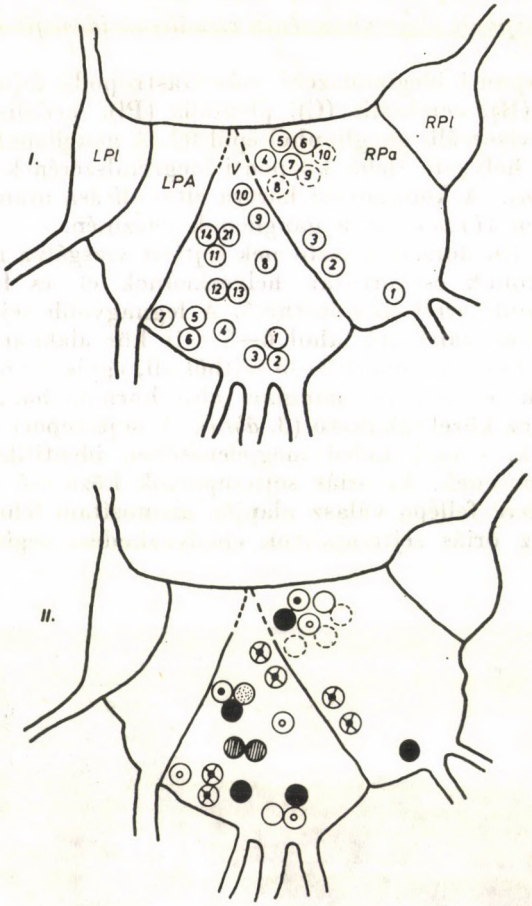
Achatina központi idegrendszere más Gastropoda fajokhoz hasonlóan a páros bukkális (B), cerebrális (C), pleurális (Pl), pedális (P), parietalis (Pa) és a páratlan viscerális ganglionból épül fel. A ganglionok elhelyezkedése és a kilépő idegek helyzete *Helix* központi idegrendszerének elrendeződésére emlékeztet (*2. ábra*). A kötőszöveti hártya eltávolítása után a sejtek enyhe világossárga színben tűnnek elő a ganglionok felszínén.

A gangliongyűrű dorzális felszínének sejtjeit vizsgálva megállapítottuk, hogy az óriásneuronok csoportosan helyezkednek el, és legalább három csoportosulás könnyűszerrel elkülöníthető. A legnagyobb sejtcsoport a jobb parietális ganglionban található, ahol 6—7 sejt kör alakban helyezkedik el (*3. ábra*). A másik két sejtcsoport 3—3 sejtből áll, egyik a viscerális ganglion felső részén, másik a viscerális ganglion alsó harmadában, az intestinális ideg eredési helyéhez közel található (*3. ábra*). A sejtcsoportosulásokon kívül eső sejtek kisebbek, s ezek külső megjelenésében identifikálásra alkalmas jellegzetességek nincsenek. Az óriás sejtcsoportok közé eső apróbb sejteket azonban az ingerlésre fellépő válasz alapján azonosítani lehetett, s ismételt megtalálásukhoz az óriás sejtcsoportok elhelyezkedése segítséget nyújtott.



2. ábra. Achatina fulica Fer. központi idegrendszerében a garat alatti ganglionok megjelenése 0,1 % metilén-kékkel történt festés után

Fig. 2. Suboesophageal ganglia in the CNS of *Achatina fulica* Fer. after staining with 0,1 %, methylene blue



3. ábra. Ganglionok elnevezése: LPl — bal palliális ganglion, LPa — bal parietális ganglion, V — viscerális ganglion, RPa — jobb parietális ganglion, RPl — jobb palliális ganglion, ni — intestinális ideg. I. Az identifikált sejtek számozása az *Achatina* központi idegrendszerében. II. Identifikált sejtek válaszreakciói:

- ● — burst vagy szakaszos kisülést generáló sejtek,
- ◍ — szívműködést szabályozó interneuron,
- ◍ — motoneuronok,
- ◎ — szívből serkentő bemenetet fogadó sejtek,
- ◉ — szívből gátló bemenetet fogadó sejtek,
- ⊗ — szinkron kisülő sejtek

Fig. 3. Designations of the ganglia: LPl — left pallial ganglion, LPa — left parietal ganglion, V — visceral ganglion, RPa — right parietal ganglion, ni — intestinal nerve. I. Numeration of identified cells in the CNS of Achatina. II. Responses of the identified cells:

- ● — burst or generation of periodic train of impulses,
- ◍ — heart regulating interneuron,
- ◍ — motoneurons,
- ◎ — cells receiving excitatory input from the heart
- ◉ — cells receiving inhibitory input from the heart,
- ⊗ — synchronously firing cells

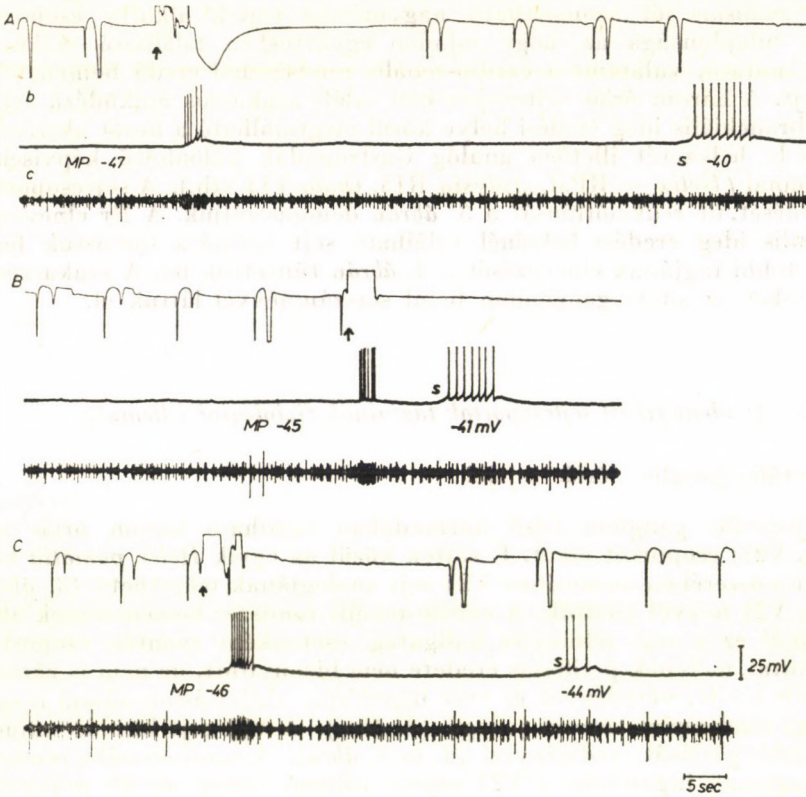
A vizuálisan jól azonosítható nagyméretű sejtek alkotta csoportok jellegzetes tulajdonsága az, hogy minden együttesben található szakaszos működést mutató, valamint a cardio-renális rendszerből eredő bemenetekre reagáló sejt. A három óriás sejtcsoportban talált szakaszos működésű sejtek mellett a branchiális ideg eredési helye körül megtalálható a burst aktivitású sejt is, mely helyzetét illetően analóg Gastropodák különböző képviselőin leírt neuronnal (*Helix* — RPal, *Aplysia* R15, *Otala* V11 stb.). A sejtcsoportok elhelyezkedését, ill. reakciótípusát a *3. ábrán* demonstráljuk. A Br elnevezést a branchiális ideg eredési helyénél található sejt számára tartottuk fenn. A csoport többi tagjának elnevezését a *3. ábrán* tüntettük fel. A szakaszosan tüzelő sejteket az adott ganglionon belül sorszámnévvel láttuk el.

2. Az identifikált sejtcsoportok tagjainak fiziológiai jellemzői

a) A viscerális ganglion óriás sejtjei

A viscerális ganglion felső harmadában található három óriás sejt (V11, V14, V21) csoportot alkot. E sejtek közül az egyik *Helix pomatia* központi idegrendszerében azonosított V21 sejt analógjának tekinthető (*3. ábra*), ezért itt is V21 névvel jelöltük. A cardio-renális rendszer bemeneteinek aktiválása nélkül ez a sejt többnyire hallgatag, esetenként spontán csoportos-kisülést mutat, melynek perifériás eredete nem bizonyított, de nem is zárható ki. Ez a sejt a szív, véredények és vese ingerlésére aktivitásfokozással reagál, s aktivitása rendszerint sorozat jellegű (*4. ábra*). A V21 sejt kisülése mindig a szívműködés gátlását eredményezi (*4.* és *5. ábra*). A cardio-renális rendszer bármely tagjának ingerlésére a V21 sejten változó számú akciós potenciált tartalmazó sorozat-kisülés regisztrálható, de az AP szám nincs összefüggésben a szívműködés gátlásának időtartamával (*4.* és *5. ábra*). A pitvar, a kamra, az aorta és a vese ingerlését követő sorozat-kisülést hosszabb-rövidebb idő után egy spontán generált kisülés-sorozat követte, mely ugyancsak kiváltotta a szívműködés gátlását. A perifériás ingerléssel kiváltott sorozat-kisülés és a spontán kisülés-sor közötti intervallum legrövidebb a kamra ingerlésekor volt (*4B. ábra*), hosszabb volt a vese ingerlést követően (*5B. ábra*), de különösen a pitvar ingerlése után (*4A. ábra*), ahol csaknem kétszeresére nőtt a spontán kisülés megjelenésének ideje a kamra ingerléshez viszonyítva. A máj ingerlésekor a V21 sejtben nem volt kiváltott sorozat-kisülés megfigyelhető, de spontán kisülés-sor ez esetben is megjelent és létrehozta a szívműködés gátlását (*5A. ábra*). A V21 sejt spontán kisülése 40—44 mV membránpotenciál értéknél figyelhető meg, a kiváltott sorozat-kisülés pedig 43—47 mV membránpotenciál tartományban jelenik meg (*4.* és *5. ábra*). A spontán kisülés-sorban az akciós potenciálok száma a membránpotenciál aktuális értékétől függ, mivel ez a legalacsonyabb MP értéknél a legmagasabb, s az MP érték növekedésével csökkent (*4. ábra*). E mellett azonban a kiváltott és spontán kisülés-sor között eltelt idő is befolyásolhatja spontán tüzelésben az AP számát (*4.* és *5. ábra*).

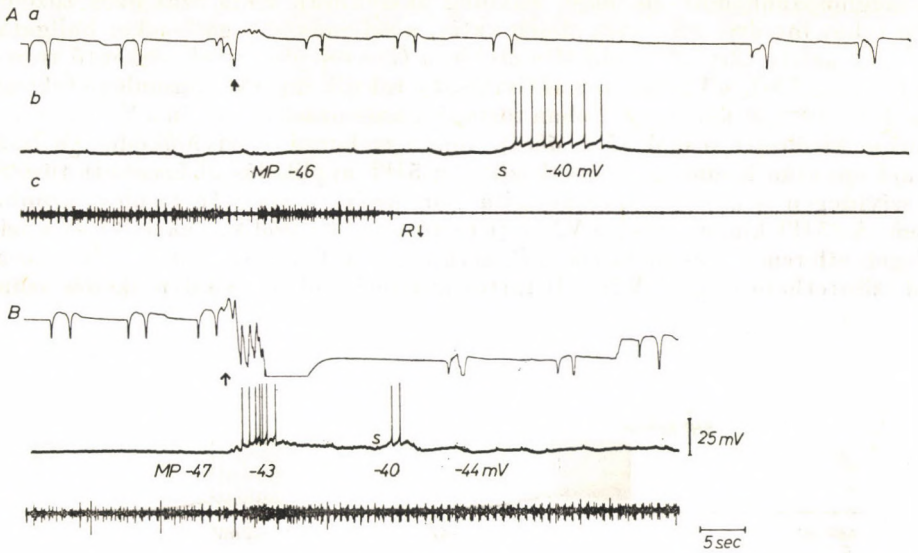
A V21 sejt sorozat-kisüléséhez a szívidegen efferens jel tartozik. A szívideg aktivitásában a V21 sejt sorozat-mintázata a kiváltott válasz esetén felismerhető (*4.* és *5. ábra*), de a spontán kisülés-sor alatt ez nem mindig szembetűnő.



4. ábra. Achatina viscerális ganglionjában a V21 sejt aktivitásának befolyásolása különböző bemenetek ingerlésekor. A — pitvar ingerlése, B — kamra ingerlése, C — az aorta ingerlése. Itt és minden további ábrán: a — szív kontrakciók, b — a V21 sejt intracelluláris aktivitása, c — a szívideg extracelluláris aktivitása, s — spontán kisülés-sor, MP — membrán potenciál

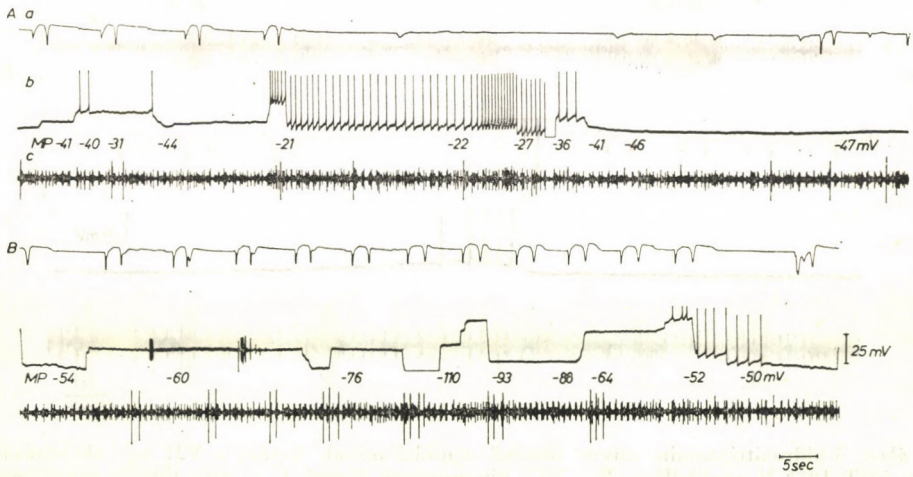
Fig. 4. Influence of various stimulatory inputs on the activity of the V21 cell in the visceral ganglion of *Achatina*. A — stimulation of the auricle, B — stimulation of the ventricle, C — stimulation of the aorta. In this Figure and all subsequent ones, a - heart contractions, b - intracellular activity of the V21 cell, c - extracellular activity of the cardiac nerve, s - train of spontaneous impulses, MP - membrane potential

A V21 sejt depolarizálása a szívműködés gátlását eredményezi (*6A. ábra*), míg hiperpolarizálása a szívverés frekvenciáját megnöveli (*6B. ábra*). A *6B. ábrán* látható, hogy a V21 sejt hiperpolarizálása idején az egyik szakaszos működésű sejt aktiválódik, ami a szívideg aktivitásában a legnagyobb amplitúdójú kisüléseknek felel meg. Ez a sejt kettőzött vagy esetenként 3—4 akciós potenciálból álló kisülés-sorokat produkál. A viscerális ganglion ezen szakaszos működésű sejtje reciprok gátló viszonyban van a V21 sejttel. Amikor ugyanis a V21 sejt hallgatag, ez a sejt szabályos csoport-intervallummal tüzel (*6. ábra*), ha viszont a V21 sejtet depolarizálással tüzelésre késztetjük, ennek a sejtnek a kisülése megszűnik és csak a szív leállásának befejeztével indul újra, de a kisülés-csoportok közti intervallum még az első kisülések után



5. ábra. V21 sejt aktivitásának változása *Achatinában* a máj (A) és vese (B) ingerlésekor. R — szívideg fiziológiás oldatba süllyesztve

Fig. 5. Alterations of V21 activity in *Achantina* on stimulation of the liver (A) and kidney (B). R — heart nerve immersed in physiological saline

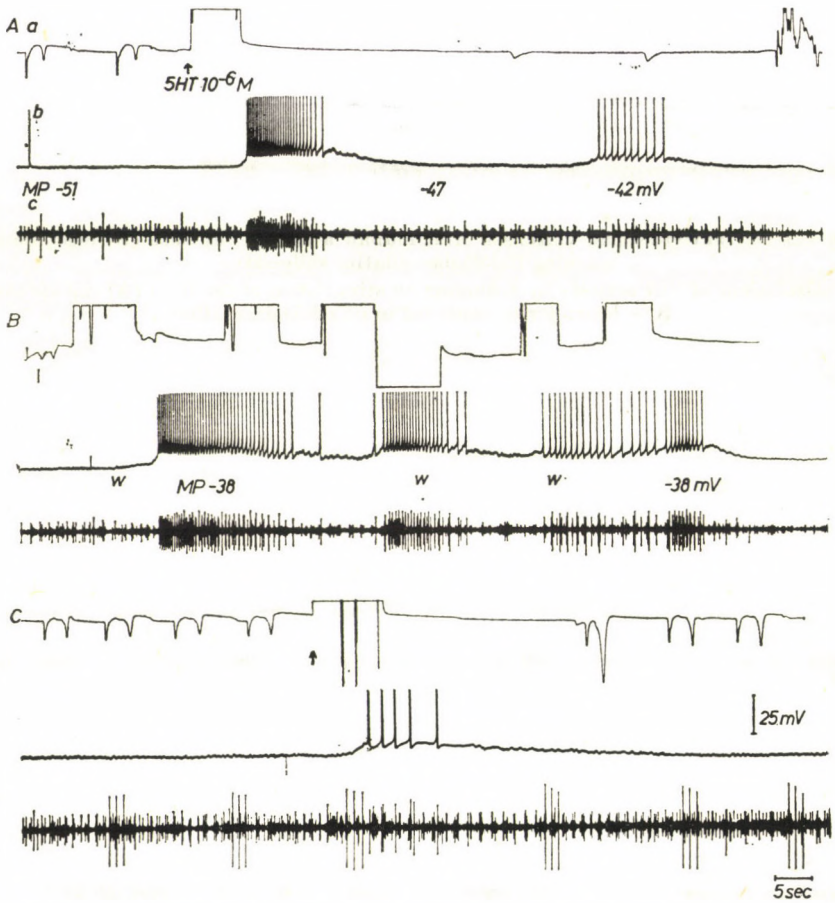


6. ábra. A V21 sejt szóma-membránján de- és hyperpolarizálásra bekövetkező változás a szívműködésben

Fig. 6. Alteration of cardiac function in consequence of de- and hyperpolarisation of the V21 cell's somatic membrane

is meghosszabbodott (*6. ábra*, szívideg aktivitása). Ez a szakaszos tüzelésű sejt tehát intenzív szívverés idején aktív, a szívműködés gátlásakor hallgatag.

A szívre történő applikálás esetén a Gastropoda szivek serkentő transzmittere, az 5HT, a V21 neuron aktivitását a taktilis ingerhez hasonlóan fokozza. Az 5HT 10^{-6} M koncentrációban történő alkalmazása kezdetén a V21 sejt csoportos kisüléssel reagál (*7A. ábra*), ami létrehozza a szívműködés gátlását, majd spontán kisülés-sor következik. Az 5HT applikálással kiváltott tüzelést a szívidegen is azonosítható aktivitás-sor kíséri, a spontán kisülést azonban nem. Az 5HT kimosásakor a V21 sejt tartósan aktiválódik, s aktivitását a szívidegen efferens jelzéssor kíséri (*7B. ábra*). Az 5HT hatása csak hosszas mosással szüntethető meg. A V21 sejt tartós működése idején a szívműködés szüne-

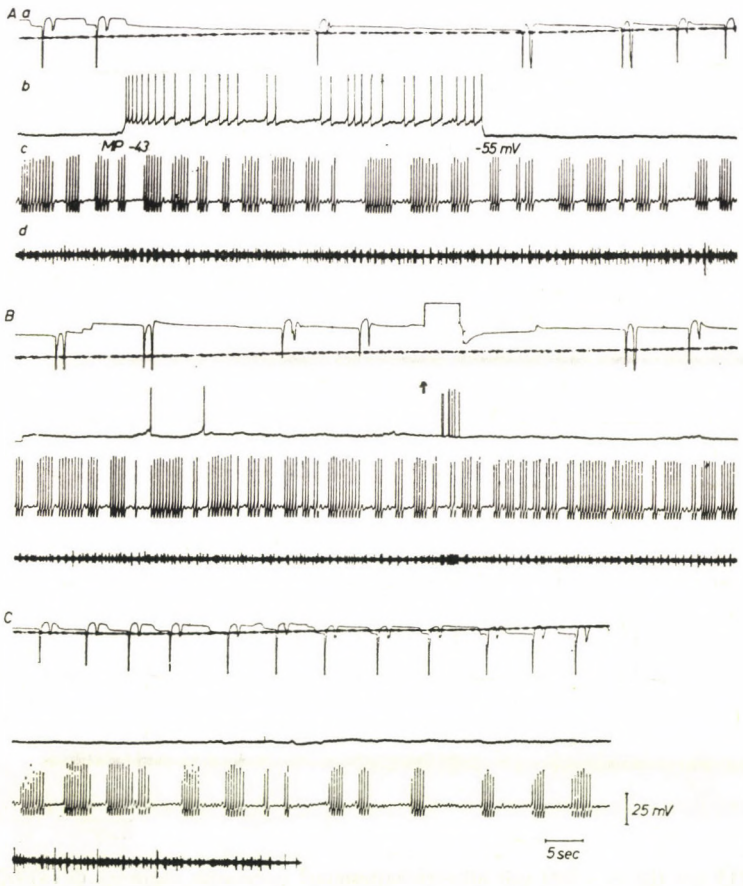


7. ábra. 5-hidroxitriptamin szívre történő applikálásának hatása a V21 sejt aktivitására. A — 5HT 10^{-6} M applikálása. B — 5HT kimosásának fázisai, C — szív taktilis ingerlésének hatása a V21 sejtre az 5HT kimosása után, W — kimosás

Fig. 7. Effect of the cardiac application of 5-hydroxytryptamine on activity of the V21 cell. A — application of 5HT 10^{-6}M. B — stages of 5 HT removal by washing, C — Effect of tactile heart srimulation on the V21 cell after the removal of 5HT, W — washing process

tel. Az 5HT kimosása után a szív taktilis ingerlésére újra a kontrollhoz hasonló kisülés sorozat lép fel a V21 sejten, s a szívverés rövid idejű gátlása is kontrollhoz hasonló fokú (*7C. ábra*). Kémiai inger alkalmazásakor a V21 sejten nagyobb számban jelennek meg posztszinaptikus potenciálok, melyek taktilis ingerléskor csak elvétve figyelhetők meg.

A viscerális ganglion V11, V14, V21 sejtek által alkotott csoportjai közül az egyik neuron változó AP-t tartalmazó csoport-kisüléseket generál. Ez a sejt a V21 neuron mellett található és a V11 elnevezést kapta (*3. ábra*). Ez a mintázat feltehetően nem endogén eredetű, mert a kisülés-sorok szabálytalanok, a csúcspotenciálok száma eltérő, és a csoportok között gátló és serkentő posztszinaptikus potenciálok egyaránt megtalálhatók (*8. ábra*). A V21 és V11 sejt aktivitása között nincs kapcsolat, mivel a V21 depolarizálása nincs hatással a

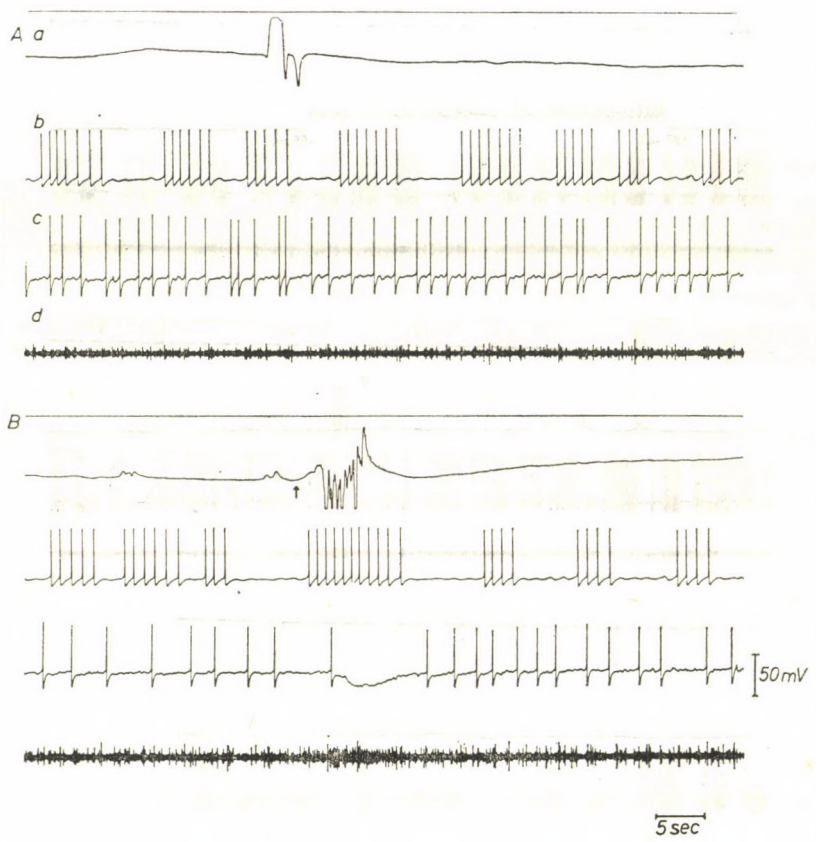


8. ábra. A V21 sejt (b) és a mellette levő sejt aktivitásának (V11) (c) változása a V21 szóma-membránjának depolarizálásakor (A) és a szív taktilis ingerlésére (B). C — a két sejt viselkedése aktivált bemenet hiányában

Fig. 8. Activity alterations of V21 and the adjoining cell (V11) in response to depolarisation of the V21 somatic membrane (A) and to tactile stimulation of the heart (B). C — behaviour of the two cells in absence of the activated inputs

V11 sejt mintázatára (*8A. ábra*). A demonstrált esetben a szív ingerlésére a V11 sejt mintázata nem változik, de a kisülés-sorokon belül a csúcspotenciálok száma csökken (*8B. ábra*) a kisülés-sorok intervallumának egyidejű csökkenésével. Magasabb frekvenciával működő szivek esetén a V11 sejten kisülés-sorokban az AP szám magasabb (*8C. ábra*). Ez a reakció azonban nem állandó; más esetekben a sejt ellentétesen viselkedett, ezért e változások feltehetően interneuron működésével is kapcsolatba hozhatók.

A viscerális ganglion felső harmadában levő óriás sejtek közül a harmadik (V14) a szív ingerlésére aktivitáscsökkenéssel reagál (*9B. ábra*). A szív ingerlésekor a csoport szakaszosan tüzelő tagja (V11) is növeli a kisülés-sorokon belül az AP-k számát (*9B. ábra*). Gyengébb ingerléskor vagy a cardio-renális rendszer más bemenetének aktiválására egyik sejt sem reagált (*9A. ábra*).

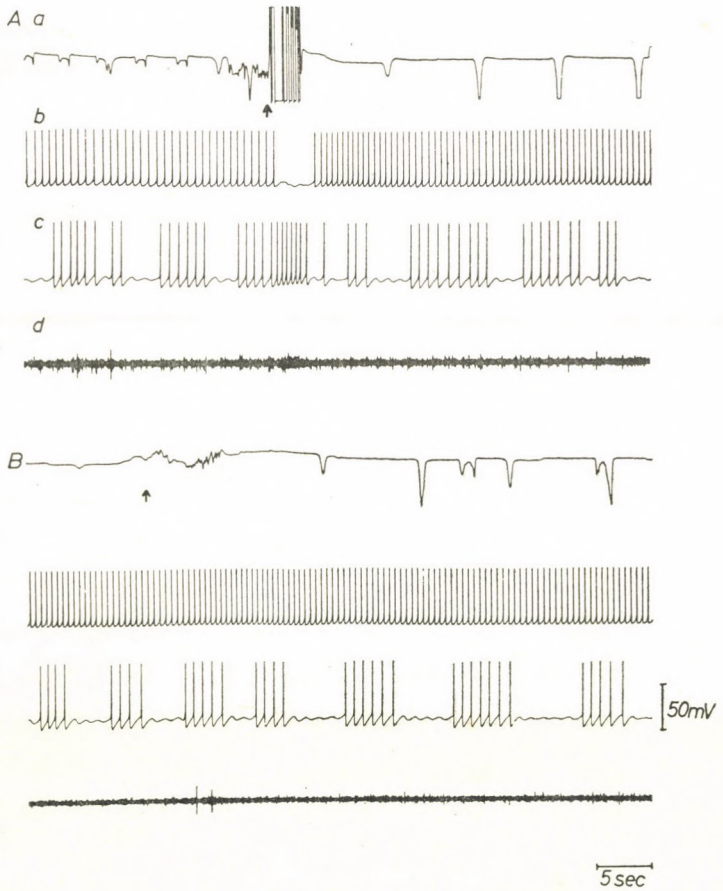


9. ábra. A V11 sejt (b) és a V21 sejt alkotta sejtcsoport harmadik tagjának (V14) (c) reakciója a szív ingerlésére. A — kontroll, B — a szív taktilis ingerlése

Fig. 9. Response of the third component (V14) of the V11+V21+V14 cell group to heart stimulation. A — control, B — tactile stimulation of the heart

b) A viscerális ganglion további identifikált sejtjei

A viscerális ganglion dorzális felszínén az intestinális ideg eredési helyéhez közel három kisebb sejtből (V1, V2, V3) álló csoportosulás különíthető el (*3. ábra*). Ezek közül kettő a szívből bemenetet kap. E csoport egyik tagja ugyancsak szakaszos kisüléseket produkál, s ez a V1 sejt elnevezést kapta. A szív ingerlésére a csoport V2 nevű tagja serkentéssel reagál, és egyidejűleg a V1 sejten is megnő a kisülés sorokban a csúcspotenciálok száma (*10. ábra*). A csoport harmadik tagja nem kap bemenetet a szívből (V3). A *10A. ábra* a viscerális ganglion egy olyan sejtjét mutatja, mely a szív ingerlésekor gátló bemenetet kap (V5), s ez időben egybeesik a V1 sejt kisülésének felszaporodásával. Sem a V1 sejt, sem a gátlódó V5 sejt nem reagált azonban a véredények (*10B. ábra*) vagy a cardio-renális rendszer más receptor mezőinek ingerlésére.



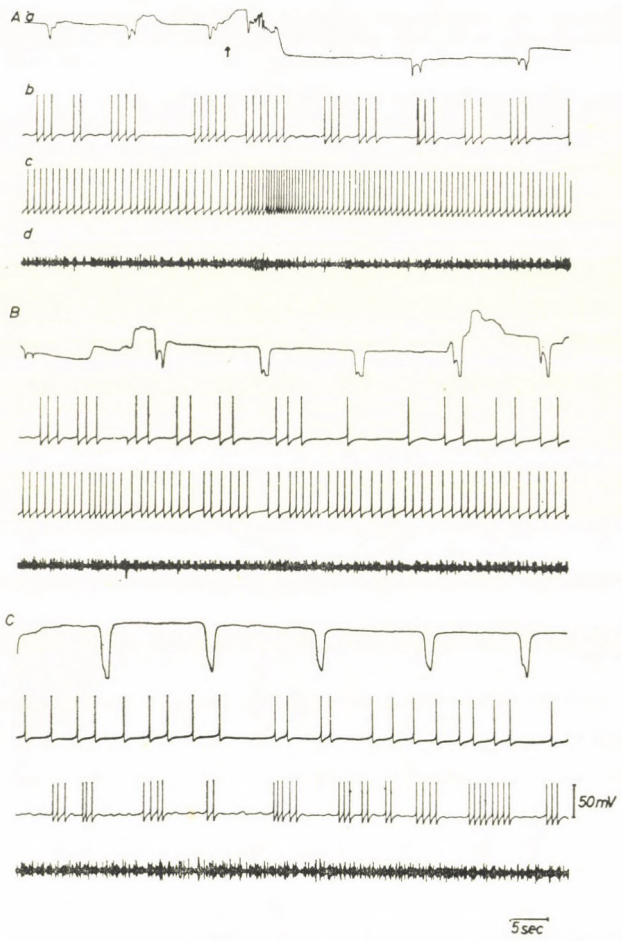
10. ábra. A viscerális ganglionban az instestinális ideg eredési helye körüli szakaszosan működő (V1) (b) és a mellette levő sejt (V2) (c) viselkedése a kamra (A) és véna (B) ingerlésére

Fig. 10. Response of the periodically firing visceral ganglion cell (V1) and of the adjoining cell (V2) to stimulation of the ventricle (A) and vein (B)

A V5 sejtnek van egy szimmetrikusan szervezett sejtpárja is (V6) a viscerális ganglionban.

A viscerális ganglion két sejtje (V9, V10) serkentő bemenetet kap a cardio-renális rendszerből (*3. ábra*), s ez nem mutat korrelációt más identifikált sejtek mintázatával. E két sejt bemenete identikus.

A viscerális ganglionban két gátló hatású sejtet is találtunk (*3. ábra*), melyek *Helix pomatia* központi idegrendszerében identifikált két gátló motoneuron [13, 14] analógjának tekinthetők, s ezek itt is a V12 és V13 elnevezést kapták (*3. ábra*).

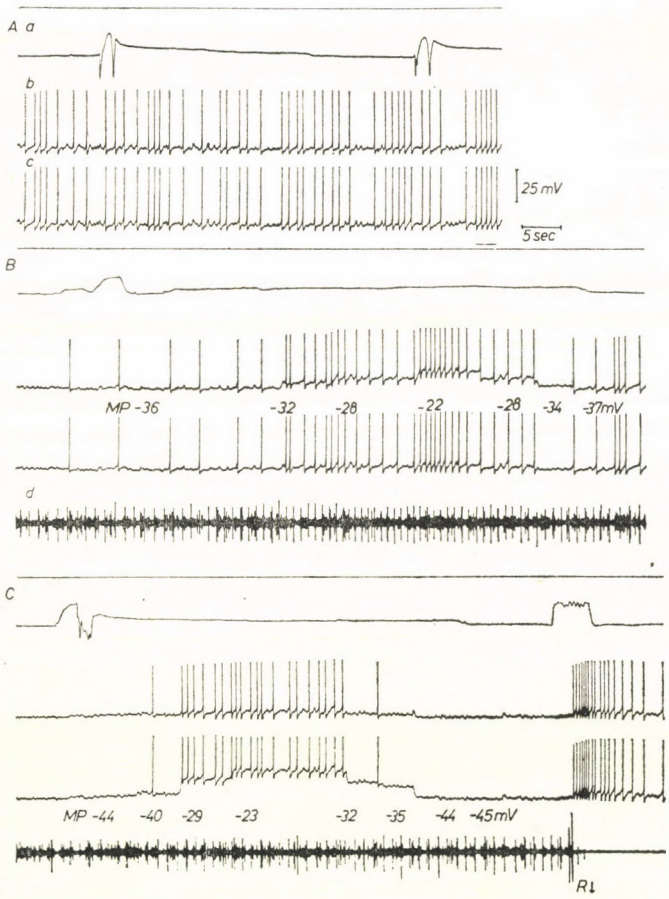


11. ábra. A jobb parietális ganglion óriás sejtcsoportjának szakaszosan tüzelő sejtje (RPa4) (b) és a mellette elhelyezkedő sejt (RPa7) (c) reakciója a szív ingerlésére (A), majd a sejtek mintázatának változása (B,C). Magyarázatot lásd a szövegben.

Fig. 11. Response of the right parietal ganglion's periodically firing cell (RPa4) and of the adjoining cell (RPa7) to cardiac stimulation, and subsequent alteration of the cell patterns (B, C). For explanation see the text.

2. *A jobb parietális ganglion identifikált sejtjei*

A jobb parietális ganglion dorzális felszínén a felső harmadban 5—7 sejtből álló óriássejt-csoport található (*3. ábra*). Ebben a sejtcsoportosulásban is találtunk szakaszos tüzelésű sejtet, s ez az RPa4 neuron. Az RPa4 sejt a szív ingerlésére a kisülés-sor AP-számának növekedésével reagál, s a sejtcsoport másik tagján (RPa7) is frekvenciafokozódó hatás észlelhető (*11. ábra*). A serkentéssel reagáló sejt pacemaker típusú sejtnek tűnik (*11A. ábra*). Azonban e két sejt mintázata kísérlet közben változik. A kezdetben szakaszos mintázatot generáló sejt aktivitása fokozatosan pacemaker típusúvá, míg a pacemaker sejt aktivitása szakaszos típusúvá válik (*11B.* és *C. ábra*), s így a két sejt mintegy mintázatot cserél. Hasonló jelenséget, bár ritkábban, a viscerális ganglion V1 és V4 sejtpárosán is meg lehetett figyelni.



12. ábra. A viscerális ganglion felső harmadában a V21 sejt fölött elhelyezkedő elektromosan kapcsolt sejtek (V9 és V10)

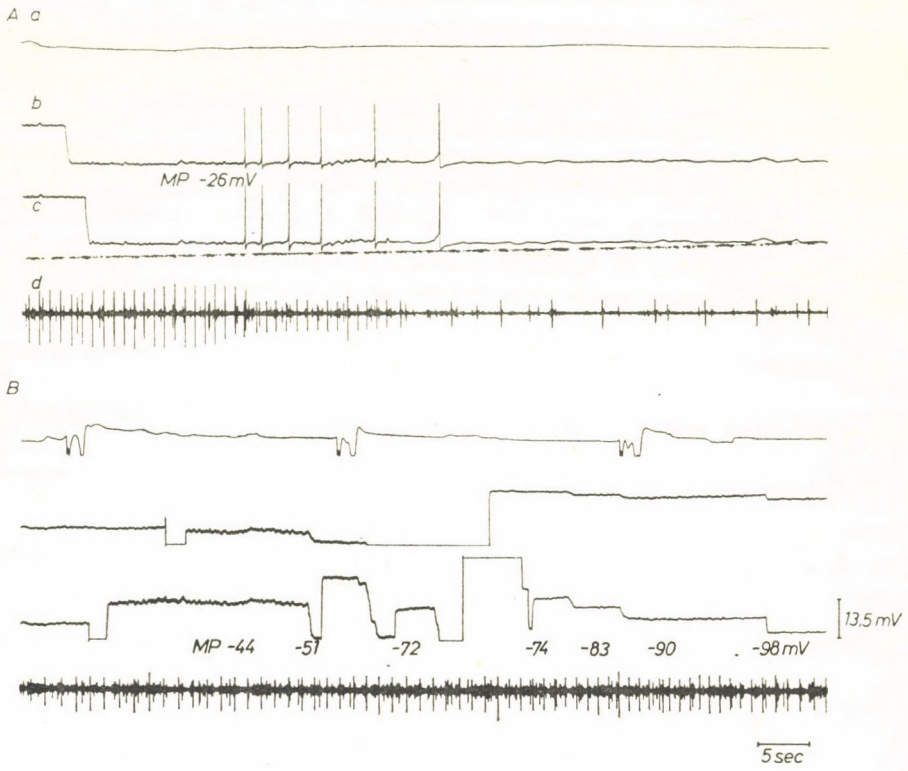
Fig. 12. Electrically coupled cells (V9 and V10) in the upper third of the visceral ganglion, above the V21 cell

A jobb parietális ganglion óriássejt-csoportjának RPa4 melletti tagja (RPa5) gátlással válaszolt a szív ingerlésére (*3. ábra*). E sejtcsoport többi tagja nincs kapcsolatban a cardio-renalis rendszer szabályozásával.

3. Szinkron reagáló sejtpárosok Achatina központi idegrendszerében

Achatina viscerális és jobb parietális ganglionjában egyaránt találtunk szinkron működő sejtpárosokat.

A viscerális ganglion felső harmadában a V21 sejt fölött található sejtpáros (V9 és V10) szimmetrikus szerveződésű, mind az AP-ok, mind az EPSP-k és IPSP-k egy időben jelennek meg a két sejten (*12. ábra*). Bármely sejt depolarizálása azonos változásokat indukál a partner sejtben (*12. ábra*). A sejtek kisülési gyakoriságának növekedése a szívműködést gátolja, a szóma membrán hiperpolarizálásakor pedig a szívműködés frekvenciája megnő (*13B. ábra*). E két sejt a cardio-renális rendszerből serkentő bemenetet kap (*12. ábra*). A hiper- és depolarizációra a partner sejten fellépő azonos válasz elektro-

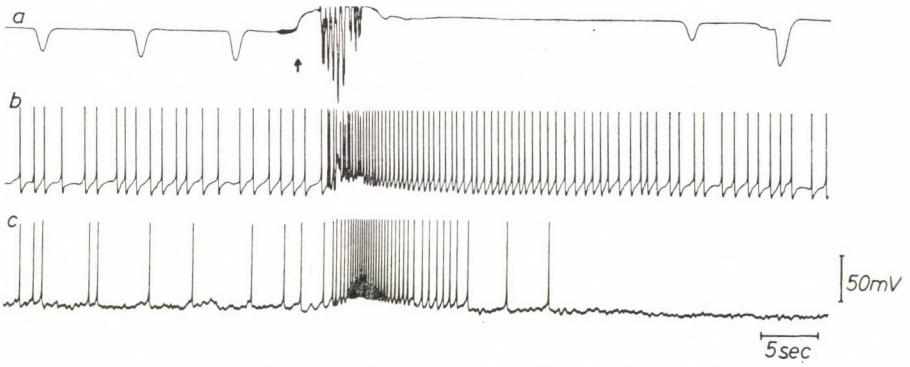


13. ábra. A 12. ábrán demonstrált elektromosan kapcsolt sejtek (V9 és V10) reakciója de- és hiperpolarizálásra

Fig. 13. Response of the electrically couples cells V9 and V10 (see Fig. 12) to de- and hyperpolarisation

tónusos kapcsolást valószínűsít a két sejt között. E sejtpáros a szív ingerlésére is egyformán serkentődött, s a reakció mindkét sejten rövid lefutású sorozat--kisülés volt.

Más sejtpárosok (RPa2 és RPa3) nem mutattak szinkron kisülést kontroll körülmények között, de a szív ingerlésére mindkét sejt kisülési frekvenciája megnőtt (*14. ábra*). A RPa2—RPa3 sejtpáros csak közös bemenetet kap, de



14. ábra. A jobb parietális ganglion két sejtje (RPa2 és RPa3), mely közös bemenetet kap a szívből, de elektrotónusosan nem kapcsolt páros

Fig. 14. Two right parietal ganglion cells (RPa2 and RPa3) receiving common input from the heart, but not coupled electrotonically

egymással direkt kapcsolatot nem alkot és válaszuk lefutása is eltérő. E két sejt a perikardiális rendszer más elemeinek ingerlésére is frekvencia fokozódással válaszol.

A jobb parietális ganglionban is található egy szinkron működő sejtpáros, mely a szív ingerlésére serkentődik (*3. ábra*).

Váltakozva szakaszos mintázatot mutató sejtpárosok időnként ugyancsak szinkron-párosként működtek, egyidejű csoport-kisüléssel. Ezek a sejtek a szív ingerlésére nem válaszolnak. A viscerális ganglion alsó harmadában leírt szakaszosan kisülő sejtnek (V1) a mélyebb rétegekben van egy szimmetrikus sejtpárja (V4). E két sejt mintázatában nincs különbség, közös vezérlésűek, de a mélyebb rétegben elhelyezkedő sejt tulajdonságait részletesen nem vizsgáltuk.

Megbeszélés

Vizsgálataink szerint *Achatina fulica* Fer. és *Helix pomatia* L. központi idegrendszerének felépítése, a ganglionok elhelyezkedése hasonló. Bizonyos, jól identifikálható neuronok is azonosíthatók a két faj központi idegrendszerében. Ugyanakkor *Achatiná*ban néhány, más Gastropoda fajra nem jellemző sajátosságot tártunk fel. Ezek közül legjellegzetesebbek: 1. az óriás sejtek jól lokalizálható csoportokban tömörülnek a ganglionok dorzális felszínén; 2. minden óriás sejtcsoport tartalmaz szakaszos-mintázatot generáló és a cardiorenális rendszerből bemenetet kapó sejteket; 3. gyakori a szakaszos mintázat a sejtek aktivitásában, s ez a mintázat időnként más típusúra változik.

Egészében az *Achatina fulica* Fer. és *Helix pomatia* L. központi idegrendszere között több a hasonlóság, mint az eltérés. Így a *Helix* központi idegrendszerében identifikált sejtek közül *Achatinában* megbízhatóan identifikálni lehetett az RPal, V12, V13, és V21 sejteket. A szívműködést szabályozó neuronhálózatban a V12 és V13 sejtek motoneuronok, míg a V21 interneuron, s ezek elhelyezkedése is hasonló a két faj központi idegrendszerében [13—15]. Hasonló jellegzetességnek bizonyult az is, hogy a cardio-renalis rendszer szabályozását ellátó neuron-populáció nem egyetlen ganglionban, hanem szórtan helyezkedik el a központi idegrendszerben. E vonatkozásban mind a *Helix*, mind az *Achatina* központi idegrendszere különbözik az *Aplysiától*, ahol a szív-szabályozó neuronhálózat az abdominális ganglionra lokalizált [6, 9—11].

Összevetve a *Helix* és *Achatina* V21 sejtjét azt látjuk, hogy bár e neuronok funkciója azonos — a szívműködést gátolják —, a sejt mintázata azonban nem azonos a két fajban. *Helix pomatiában* a V21 sejt kettős mintázatú, tónusos és fázisos működésre képes. A tónusos mintázat felelős a szívverés gátlásáért [13, 14], a fázisos működés sorozat mintázata viszont egybeesik az egyes szívkontrakciókkal. Az *Achatina* V21 sejtjén nem különül el két mintázat. A sejt gyakran hallgatag, kisülése a cardio-renális rendszer bemeneteinek aktiválódására indul, s ez sorozat-kisülés jellegű. *Achatinában* a V21 sejt spontán vagy kiváltott kisüléseinek csoportjai nem korrelálnak az egyes szív-kontrakciókkal, de a sejt kisülése itt is létrehozza a szívműködés gátlását. Az eltérések ellenére homológnak tekinthető a *Helix* és az *Achatina* V21 sejtje, mivel elhelyezkedésük és funkciójuk azonos.

A szívből és a cardio-renális rendszerből gátló vagy serkentő bemenetet fogadó sejtek elhelyezkedésében törvényszerűséget nem találtunk (*3. ábra*), ezek a viscerális és jobb parietális ganglion bármely részén előfordulhatnak. Az identifikált sejtek között gyakori a szinkron kisülő és közös bemenetet kapó sejtpáros. E párosok egy része elektrotónusosan kapcsolt, mások csak közös vezérlésűek. A hálózatszerveződésre az *Achatina* központi idegrendszerében a pályakettőzés jellemző mind az afferens, mind az efferens ágon, ami egyben túlbiztosítást is jelent az adott szervrendszer szabályozásában. Az identifikált sejtek közül több kapott bemenetet a szívből, mint ahány kimenetet képez a szív felé, ami a konvergáló, túlbiztosított hálózatok sajátossága [1, 3].

Achatinán végzett vizsgálataink igazolták, hogy a cardio-renális rendszer szabályozását nem egy feladatra specializált neuronok, hanem változó tulajdonságú elemekből felépült hálózat végzi. Ennek a rendszernek előnye, hogy bár a bemenetek a hálózat egyes elemein nyomon követhetők, ezek nem jelentenek merev, rögzített pályákat. Igazolni látszik ezt az állítást az a tény, hogy a hálózathoz tartozó elemek mintázata (szakaszos tüzelés vagy pacemaker jelleg) változik a bemenetek aktiválódásának idejétől vagy jellegétől függően. Ez a viselkedés a szinapszisok funkcionális plaszticitására utal a hálózatban [5, 6]. Ez a plaszticitás biztosítéka annak, hogy a neuronok több folyamatban is részt vehetnek, s így a szabályozó körök variábilis elemekből épülhetnek fel. *Achatina* idegrendszerben, adataink szerint, a perifériáról érkező jelzés számos sejtre divergál, de ez nem vonja automatikusan maga után a sejt bekapcsolását a szabályozásba. A szívműködés szabályozását képes 1—3 neuronból álló sejt vagy sejtcsoport ellátni (egy gátló, két serkentő vagy vice versa), de hogy az informált sejt populációból mely sejtek jutnak szabályozó szerephez, az az adott pillanatban fennálló funkcionális viszonyok függvénye. Nem tudjuk, hogy az identifikált neuron-csoport tartalmaz-e döntési joggal felruházott

szelektort vagy ez a funkció is hálózathoz kötött, s a hálózat adott információ mennyisége determinálja. Mindkét variáns alkalmas lehet azonban szabályozó hálózat működtetésére. Minden jel arra mutat, hogy Molluskák központi idegrendszerében a konvergáló, mindenről informált hálózatok a jellemzőek. Ezt igazolja a *Helix* szív szabályozását végző neuron hálózat felépítése [13—15], de az *Aplysia* multifunkcionális interneuronjának (L10) tulajdonsága is [6]. Ennek a szerveződésnek hátránya, hogy a viszonylag kisszámú neuront tartalmazó központi idegrendszer kapacitása telített is lehet, s így a szabályozás fontossági sorrendben kell, hogy megvalósuljon, s esetenként egyes funkciók szabályozása késedelmet szenvedhet. Ennek következtében a rendszer egészének hatékonysága alacsonyabb, mint fejlettebb szervezetekben.

Achatina központi idegrendszerében a hierarchikus felépítés kezdeti elemei felismerhetők. E szerveződési elv megnyilvánulásaként valamely sejt reagál a szív, de nem reagál a véredények ingerlésére (*10. ábra*). Ugyanakkor a hálózat központi eleme nem mutat bemenetfüggő reakciót (*4—8. ábra*), s kisülésének következménye a szabályozott szerv szintjén mindig azonos. A hálózat tehát információ gyűjtő és -analizáló, valamint vezérlő részre különül el. Ez a felépítési elv más Gastropodákon leírt neuronhálózatokra is jellemző [6, 13, 14].

Achatina központi idegrendszerében 5—6 szakaszos-aktivitást generáló sejt található. Ezek között fixált és változó sorozat mintázat egyaránt előfordul. Más Gastropoda fajok központi idegrendszerében is találtak eltérő mechanizmusú, szakaszos mintázatú sejteket [4, 7, 8, 21]. Ezek közül egyesek bizonyítottan endogén ritmusú, burst-mintázatú sejtek, mások szinaptikusan vezéreltek. *Achatina* endogén burst-aktivitású neuronját korábban TAKEUCHI és mtsai [18] identifikálták, s biológiailag aktív anyagok vizsgálatára használták. A RPa4 jelölésű szakaszos kisülésű sejtet pedig CHASE és GOODMAN [2] írták le izolált *Achatina* ganglionban. Az általunk identifikált szakaszos mintázatú sejtek közül négy információt kap a szív működéséről, de ezek közvetlenül a szívműködés szabályozásában nem vesznek részt. Feltehetően a szakaszos kisülést generáló sejtek mindig őriznek valamiféle információt a szervezetben periodikusan zajló eseményekről, de trigger szerepük nincs. *Achatina* szakaszos tüzelésű sejtjeinek modulálása a szívingerlésre feltehetően monoszinaptikus kapcsolat eredménye, s ezért kevéssé kifejezett, gyakran egyetlen sorozatban változik meg a kisülések száma. A Br sejt (RPa1) csak a szív ingerlésére reagált, más bemenetek aktiválására nem. A mintázat változása a kisülések vezérelt jellegére utal, két szakaszosan működő sejt esetén. Valamennyi identifikált sejt aktivitása függ más forrásokból eredő moduláló hatásoktól is, de a cardio-renális rendszerből eredő bemenet azonos sejteken ugyanazokat a változásokat hozza létre.

Összefoglalás

Vizsgáltuk *Achatina fulica* Férussac cardio-renális rendszerének szabályozását végző neuron-hálózat szerveződését és működési elvét, s azt összevetettük *Helix pomatia* L. és *Aplysia californica* ganglionjaiban leírt azonos funkcióju szabályozó körökkel. Megállapítottuk, hogy:

1. *Achatina* központi idegrendszerének makroszkópos felépítése megegyezik *Helix pomatia* L. ganglionjainak elrendeződésével. A szív és cardio-

-renális rendszer szabályozását végző neuronok szórtan helyezkednek el mindkét faj központi idegrendszerében.

2. *Achatina* központi idegrendszerében az óriás idegsejtek a dorzális felszínen három, jól elkülöníthető csoportot alkotnak. Egy a jobb parietális ganglionban, kettő a viscerális ganglionban található. Mindegyik óriás neuroncsoportnak van szakaszos kisülési mintázatot generáló és a cardio-renális rendszerből bemenetet fogadó sejtje.

3. *Achatina* központi idegrendszerében azonosítottunk két gátló motoneuront (V12, V13) és egy interneuront (V21), melyek *Helix pomatia* központi idegrendszerében identifikált sejtek analógjának tekinthetők. A V21 interneuron *Achatina* központi idegrendszerében is a cardio-renális rendszerből eredő információ gyűjtő állomása. A V21 sejt csoportos kisülési mintázata efferens jel formájában azonosítható a szívidegen. A V21 sejt depolarizálása a szív taktilis vagy kémiai ingerléséhez hasonló kisüléssort hoz létre és gátolja a szívműködést. A V21 gátló interneuron és egy serkentő motoneuron között reciprok gátló viszony van.

4. *Achatina* központi idegrendszerében 5—6 szakaszos kisülést generáló sejt identifikálható. Közülük négy információt kap a cardio-renális rendszer működéséről, de a szívműködés vezérlésére nem képes. A szakaszos tüzelésű sejt mintázata mindig valamely periodikusan zajló folyamat információit őrzi.

5. *Achatina* szívműködésének szabályozását végző neuronhálózatban gyakori a parallel szervezett, szinkron működésű sejtpáros mind az efferens, mind az afferens pályákon. E párosok egy része elektrotónusosan kapcsolt, mások csak közös vezérlésűek.

6. Az identifikált neuronok közül több kap bemenetet a szívből, mint ahány kimenetet képez a szív felé. A szívműködést szabályozó hálózat *Achatiná*ban konvergáló, túlbiztosított típusú. A hálózat felépítésében a hierarchikus szerveződés elvei felismerhetőek. A hálózat információ gyűjtő és analizáló, vezérlő egységekre bontható.

IRODALOM

1. Carol, P. M. (1976) Neural circuits involved in learning: The use of modifiable synapses in the stimulation of behaviour. *Intern. J. Neuroscience*, **7**, 9—18.
2. Chase, R. and Goodman, H. E. (1977) Homologous neurosecretory cell groups in the land snail *Achatina fulica* and the sea slug *Aplysia californica*. *Cell Tissue Res.*, **176**, 109—120.
3. Deutch, S. (1967) *Models of the nervous system*. Willey, New York—London—Sidney.
4. Frazier, W. T., Kandel, E. R., Kupfermann, I., Waziri, R. and Coggeshall, R. E. (1967) Morphological and functional properties of identified neurons in the abdominal ganglion of *Aplysia californica*. *J. Neurophysiol.*, **30**, 1288—1351.
5. Hebb, D. O. (1949) *The organization of behaviour: A neuropsychological theory*. Wiley—New York—London—Sidney.
6. Kandel, E. R. (1967) *Cellular fasis of behavior. An introduction to behavioral neurobiology*. Freeman and Company, 1—727.
7. Katayama, Y. (1973) Electrophysiological identification of neurones and neural networks in the perioesophageal ganglion complex of the marine pulmonate mollusc, *Onchidium verruculatum*. *J. Exp. Biol.*, **59**, 739—751.
8. Kater, S. B. and Kaneko, C. R. S. (1972) An endogenously bursting neuron in the gastropod mollusc, *Helisoma trivolvis*. Characterization of activity *in vivo*. *J. comp. Physiol.*, **79**, 1—14.

9. MAYERI, E., KOESTER, J., KUPFERMANN, I., LIEBESWAR, G. and KANDEL, E. R. (1974) Neural control of circulation in *Aplysia*. I. Motoneurons. *J. Neurophysiol.*, **37**, 458—475.
10. KOESTER, J., MAYERI, E., LIEBESWAR, G. and KANDEL, E. R. (1974) Neural control of circulation in *Aplysia*. II. Interneurons. *J. Neurophysiol.*, **37**, 476—496.
11. LIEBESWAR, G., GOLDMAN, J. E., KOESTER, J. and MAYERI, E. (1975) Neural control of circulation in *Aplysia*. III. Neurotransmitters. *J. Neurophysiol.*, **38**, 677—779.
12. S.-RÓZSA, K. (1975) Effect of veratrine on the heart receptors and central neurones regulating heart beats in *Helix pomatia L. Annal. Biol. Tihany*, **42**, 89—97.
13. S.-RÓZSA, K. (1976) Neuronal network underlying the regulation of heart beat in *Helix pomatia* L. *In:* J. SALÁNKI (ed.): *Neurobiology of Invertebrates. Gastropoda Brain.* Akadémiai Kiadó, Budapest, 597—613.
14. S.-RÓZSA, K. (1977) Central representation and integration of sensory inputs from the cardiorenal system of the *Helix pomatia* L. *J. Vusch. Nerv. Deat.*, **27**, 1224—1233.
15. S.-RÓZSA, K. and SALÁNKI, J. (1973) Single neurone responses to tactile stimulation of the heart in the snail, *Helix pomatia* L. *J. Comp. Physiol.*, **84**, 267—279.
16. MATSUMOTO, M., MORIMASA, T., TAKEUCHI, H., MORI, A. and KOHSAKA, M. (1973) Teneurs en amino-acides libres de l'hémolymphe et des ganglions nerveux de l'Escargot géant africain *(Achatina fulica* Ferussac) affamé et nourri. *Comp. rend. S.B.*, **167**, 1494—1498.
17. TAKEUCHI, H., YOKOI, I., MORI, A. and KOHSAKA, M. (1975) Effects of nucleic acid components and their relatives on the excitability of dopamine sensitive giant neurones, identified in subesophageal ganglia of the African giant snail (*Achatina fulica* Férussac). *Gen. Pharmac.*, **6**, 77—85.
18. TAKEUCHI, H., YOKOI, I., MORI, A., and OHMORI, S. (1976) Effects of glutamic acid relatives in the electrical activity of an identified molluscan giant neurone (*Achatina fulica* Férussac). *Brain Res.*, **103**, 261—274.
19. VÉRÓ, M. (1971) Negative capacitance amplifier for microelectrode investigations. *Annal. Biol. Tihany*, **38**, 107—115.
20. VÉRÓ, M. (1976) Movement indicator for biological objects with electro-optical sensing device. *Annal. Biol. Tihany*, **43**, 37—42.
21. WAZIRI, R., KANDEL, E. R. and FRAZERI, W. T. (1969) Organization of inhibition in abdominal ganglion of *Aplysia*. II. Posttetanic potentiation, hyterosynaptic depression and increments in frequency of inhibitory postsynaptic potentials. *J. Neurophysiol.*, **32**, 509—519.

HEART REGULATORY NEURAL NETWORK IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF ACHATINA FULICA FÉRUSSAC

Katalin S.-Rózsa
Biological Research Institute of Hungarian Academy of Sciences,
Tihany, Hungary

The organization and function of a neural network controlling the cardio-renal system in *Achatina fulica* Férussac was studied by comparison to similar regulating systems associated with the ganglia of *Helix pomatia* L. and *Aplysia californica*. The experimental observations have permitted the following conclusions:

1. The macroscopic structure of the central nervous system (CNS) of *Achatina* corresponds with the arrangement of the ganglia in *Helix pomatia* L. The neurons regulating the heart and the cardio-renal system are scattered throughout the CNS in both species.

2. On the dorsal surface of the CNS of *Achatina* giant nerve cells form three well defined groups, one located in the right parietal ganglion, two in the visceral ganglion. Each giant neuron group comprises cells capable of generation of periodic trains of impulses and of reception of input from the cardio-renal system.

3. Two inhibitory motoneurons (V12, V13) and one interneuron (V21) identified in the CNS of *Achatina* can be regarded as analogous of the neurons described earlier in the CNS of *Helix pomatia*. In *Achatina*, too, the interneuron V21 was found to serve as collector of information originating from the cardio-renal system. The train of firing in the cell V21 has been

identified as an efferent sign on the heart nerve. The depolarisation of V21 gives rise to the same train of impulses as the tactile or chemical stimulation of the heart. Activation of V21 in either way leads to an arrest of heart function. A reciprocal inhibition was found to take place between the inhibitory motoneuron (V21) and its excitatory motoneuron counterpart.

4. Five to six cells of the CNS of *Achatina* have been identified as generators of periodic trains of impulses. Of these, four cells serve as receivers of information on the function of the cardio-renal system, without, however, being in themselves capable of heart regulation. The pattern of the periodically firing cell probably stores information about certain periodic processes taking place in the organism.

5. The heart regulating neural network of *Achatina* contains numerous paired synchronously firing cells in parallel array in both the efferent and afferent pathways. Some cell pairs are coupled electrotonically, others only by the common regulation.

6. Among the identified neurons those receiving input from the heart are more numerous than the ones giving output to the heart. The heart regulating neural network of *Achatina* represents the convergent, redundant type. The setting up of the network reflects the principle of hierarchical organisation; it can be subdivided into collector, analyser and command units.

Biológia, **26**, *1978*, *195—197*

VITAROVAT

AZ EVOLÚCIÓ IRÁNYA*

Az elmúlt két évtizedben a hazai szakirodalom az evolúció kérdéseivel alig foglalkozott. Ami irodalom magyarban elérhető — talán egy egyetemi tankönyvet kivéve —, szinte teljesen a klasszikus ismeretanyagon nyugszik. Pedig legalább három olyan alapvetően új kutatási irányzat fejlődött ki e két évtizedben, amelyik az evolúció szemléletében teljesen új adatokra épülő, új szemléleti módot kíván: a molekuláris biológia, a lemeztektonika és a Föld fejlődésének kutatása. Ezért különösen aktuálisnak érzem Újhelyi Mária cikkét, aki bevezetőjében megállapítja, hogy: „. . . . az a szemléleti keret, mely a tények rendezésének értelmezésének alapját képezi, Darwin óta szinte semmit nem változott . . .", továbbá, hogy „. . . . a felhalmozódó eredmények kezdik szétfeszíteni az adott szemléleti keretet".

Mindenekelőtt: az evolúció szó közel egy évszázadon át szinte csak a biológiai evolúciót takarta a természettudományokban, ma viszont egyaránt beszélünk kozmikus evolúcióról, kémiai evolúcióról és biológiai evolúcióról. A kozmikus evolúció a Világegyetem különböző struktúráinak keletkezését és történetét tárgyalja az ősrobbanástól napjainkig, a kémiai evolúció (az elnevezés nem túl szerencsés) a szerves anyagféleségek abiogén kialakulásának folyamatát a C, O, N, H stb. atomoktól a több ezer vagy több tízezer atomot tartalmazó makromolekulákig, végül a biológiai evolúció, amely (az úgynevezett prebiológiai evolúcióval együtt) az élő rendszerek kialakulását, valamint az élővilág fejlődéstörténetét foglalja magában a legegyszerűbb élő rendszerektől napjaink bonyolult és igen változatos élővilágáig.

A három különböző evolúciós terület jellemző közös sajátossága, hogy az evolúciós folyamat kezdetekor csak a legegyszerűbb jellegzetes struktúrák voltak jelen a vizsgált terület struktúrái közül, míg az evolúció jelen állapotában a kiindulásihoz képest igen összetett, bonyolult rendszerek. A kezdeti és a jelenlegi állapot között mindhárom területen ez a legszembetűnőbb jelenség, s éppen ez indokolja, hogy mindhárom folyamatra az evolúció szót, vagyis a fejlődés fogalmát alkalmazzuk. Az evolúciónak — legyen az kozmikus, kémiai vagy biológiai — így nagy távlatból nézve tehát iránya van, olyan iránya, amely az egyszerűbbtől a bonyolultabb felé mutat.

Közös sajátossága továbbá a három evolúciós területnek, hogy az evolúció, — vagyis a nagy távlatokban fokozatosan bonyolultabbá válás — a szer-

* Hozzászólás Újhelyi Mária: „Adalékok az evolúcióelmélet továbbfejlesztéséhez" című cikkéhez. (Biológia, **26(1)**, 1978)

veződés különböző szintjein valósul meg. A kozmikus evolúció például az elemi részek sokféleségének szintjén (a kezdeti állapotokban csak itt), az atomok, a molekulák, a kristályok, a kőzetek, az égitestek, a naprendszerek, galaktikák stb. szintjén. A kémiai evolúció az atomok szintjétől indulva a molekulák, makromolekulák, makromolekula aggregátumok szintjén keresztül a mikrostruktúrák szintjéig, a biológiai evolúció a prokarióták, eukarióták, soksejtűek, populációk, biocönózisok stb. szintjein.

És éppen ez az, ami a mai biológiai evolúciós szemléletünkben még nem kap elég hangsúlyt, ez az, ami Újhelyi Mária dolgozatából is kicseng. A mutáció és szelekció — bármilyen tág értelemben fogjuk is fel a mutációt — a szerveződési hierarchiának csak adott szintjén fejti ki hatását. Itt megteremti az adott szerveződési szint egyedeinek azt a sokféleségét, ami lehetőséget teremt a szerveződés egy következő szintjének a kialakulására, ám nem közvetlen oka annak. A biológiában az első ilyen mechanizmus most kezd kibontakozni részleteiben az eukarióta sejtek endoszimbionta elmélete révén. Nyilvánvalóan ahhoz, hogy pl. az eukarióta növényi sejt kialakulhasson, előtte létre kellett jönnie a fermentatív, a fotoszintetizáló, az aerob stb. prokarióták sokféleségének és ebben a folyamatban a mutáció és szelekció vitte a döntő szerepet. Maga az egyesülés — a különféle prokarióta egységek egybeszerveződése munkamegosztás révén működő, összetettebb, bonyolultabb egységgé — nem tekinthető mutációnak, mert nem véletlenszerűen, hanem nagyon is determinált módokon jöhet csak létre, csak olyan egységek kapcsolódhatnak össze, amelyek tevékenysége egymást kiegészíti és csak olyan mennyiségi viszonyok mellett, ami nem veszélyezteti az összetett rendszer stabilitását.

Természetesen az a folyamat, amelynek révén az endoszimbiontából végül is sejtszerv lesz, ismét csak mutációk sokaságán keresztül állandóan ható szelekció mellett megy végbe, ám itt a pontmutációk mellett megjelennek olyan, a bonyolultabb struktúra adta lehetőséget kihasználó mutációs mechanizmusok, véletlenszerű változások is, amelyek a prokarióta szinten még nem voltak lehetségesek. Az eukarióta sejtek sokféleségét végül is a különböző véletlenszerű, mutációs jellegű megváltozások mellett a prokarióta egységekből való összeállás kombinációs lehetőségei, mint nem véletlenszerű változások is megszabják.

Ma még egyáltalán nem vizsgált terület, de logikusnak tűnik, hogy a soksejtűek felépülésénél ugyancsak léteznek kombinációs törvények, amelyek megszabják azokat a kereteket, amelyek között eukarióta sejtek sokféleségéből képződött halmaz, mint soksejtű organizmus működhet. Ebből a szempontból nem feldolgozott ugyan, de nyilvánvaló, hogy bizonyos soksejtűekből felépülő rendszerek, mint a hangyaállam, termeszállam, méhcsalád stb. ugyancsak nem véletlenszerűen, hanem az egyedek különböző képességeiből és funkcióiból, illetve azok összehangolhatóságából eredően meghatározott rendszerek.

Az evolúció irányultsága — véleményem szerint — éppen ebből adódik. A szinteken belül az adott környezetben stabil változatok (fajok, nemek stb.) elsősorban mutáció és szelekció révén alakulnak ki, betöltve mindazon lehetőségeket, amelyeket az adott szervetlen, szerves és biológiai környezet megenged. Ez a betöltődés statisztikus folyamat. Éppen statisztikus jellege miatt adott szinten belül nem lehet és nem is szabad egy-egy változásban irányultságot keresni. Nem lehet azt mondani, hogy az egyik változat fejlettebb, mint a másik, hogy egy mutáció előre- vagy hátramutató változást okoz. De feltétlenül állítható, hogy az eukarióta fejlettebb a prokariótánál, hogy a soksejtű az

egysejtűnél és hogy az élővilág ma fejlettebb, mint amilyen hárommilliárd évvel ezelőtt volt.

A biológiai evolúció is kozmikus időskálán végbemenő folyamat, amely egyedek és generációk statisztikus sokaságán át megy végbe, és csak azon keresztül mérhető és értelmezhető. Evolúcióról csak statisztikus értelemben és hosszú időtartamot figyelembe véve lehet beszélni. Az egyedek változásai, a populációk alakulása olyan viszonyban vannak az evolúcióval, mint a molekulák mozgása a gáznyomással: abból, hogy mikrotérfogatban egy adott pillanatban a molekulák egymás felé röpülnek, nem lehet levonni azt a következtetést, hogy a gáz nem tágul éppen. Hasonlóképpen abból, hogy egy „mikroökoszférában", az evolúciós időskálát tekintve töredék idő alatt milyen változások mennek végbe, nem lehet azt a következtetést levonni, hogy az evolúciónak nincs iránya.

Végül még egy megjegyzés kívánkozik ide: a biológiai evolúció és a szervetlen világ evolúciós folyamatai között van egy alapvető elvi különbség is a sok közös vonás mellett: az, hogy az élővilág evolúciója utódok végtelen sorozatán keresztül valósul meg, szemben az önreprodukciós tulajdonsággal nem rendelkező élettelen rendszerek evolúciójával. Ezért az adott élővilág tulajdonságait nemcsak a mindenkori környezet, hanem hasonló mértékben elődei sorozatának története is megszabja, s ebben a tekintetben a biológiai evolúció minden más evolúciós folyamattól különbözik.

Gánti Tibor
Eötvös Loránd Tudományegyetem
Genetikai Tanszék

Biológia, **26**, *1978*, *199–203*

VÉLETLENSZERŰSÉG ÉS TÖKÉLETESEDÉSI TENDENCIA*

A számos gondolatot ébresztő tanulmányhoz a mutáció és véletlenszerűsége, az organikus evolúció általános, valamint a tökéletesedő, fokozatos érvényesülést biztosító vonásához kapcsolódó néhány észrevételt szeretnék tenni.

A *mutációval* együtt rendszerint felmerül ilyen vagy olyan vonatkozásban a véletlenszerűség. Érdemes ezért magát a véletlenszerűséget, a véletlen eltérő formáit és azok szerepét közelebbről szemügyre venni.

Az organikus evolúció (bioevolúció) egészében véve törvényszerű folyamat. Ez azonban nem zárja ki, hogy a véletlenség is szerepet kapjon benne, csak az a kérdés, hogy miképpen. Az organikus evolúció tanulmányozói közelebbről nézve a véletlenszerűség három fontos típusával találják magukat szemben: *a)* a hétköznapi értelemben vett véletlen eloszlással *(random eloszlás*, matematikai valószínűség); *b)* az esély *(chance)* szerepével és *c)* az esetlegességgel *(eventuality, founding, founder principle)*.

A szakirodalom, sajnálatos módon vagy szinonimaként, vagy különbözőkként, de következetlenül használja ezeket a fogalmakat. Ebből aztán félrevezető következtetések is keletkeznek.

Mind az élet keletkezése, mind az egész organikus evolúció tanulmányozásában korunk egyik legnagyobb felfedezése a nukleinsavak megismerése. A nukleinsavak, ezek közül különösen a gének, mind az evolúcióbeli stabilitás, mind a változékonyság alapvető tényezői. Ezek építőelemeinek specifikus sorrendje tartalmazza azokat az információkat, amelyek a polipeptideket alkotó aminósavak sorrendjét és ezáltal funkcionáló fehérjékként való szereplését, a specifikus fehérjék szintézisét vezérlik. Eléggé elterjedt felfogás szerint az erre képes nukleinsavak sorrendje igen hosszú idő alatt random találkozások és a véletlenül alkalmasak szelekciójának köszönheti létezését. Az „értelmes" nukleinsav láncok (gének) ilyen módon való keletkezésével azonban nem tudunk egyetérteni. A szelekció kétségtelen „hatásosságával" szemben ezzel a szelekció „mindenhatósága" elfogadásának az alapjára helyezkednénk és kiderülne, hogy ha az egész Föld csak nukleotidákból álló választék lenne, akkor is kevésnek bizonyulna, az egész Naprendszer életideje ahhoz, hogy akár egyetlen „értelmes" sorrend *feltétlen* bizonyossággal előfordulna.

* Hozzászólás Újhelyi Mária: „Adalékok az evolúcióelmélet továbbfejlesztéséhez" című cikkéhez. (Biológia, **26(1)**, 1978)

Az élet keletkezéséhez és fejlődéséhez pedig legkevesebb ezer olyan gén szükséges, amely nemcsak egyszerűen funkcionáló, hanem összefüggő rendszerré kapcsolódó fehérje szintézisét biztosítja. Világos, hogy a random sorakozás feltételezése abszurd következtetés csíráját hordja magában. Tudomásunk szerint az irodalomban legelőször H. H. PATTEE (1961) hívta fel a figyelmet a feltevés néhány hibájára. Az ő és a magunk megállapításaiból nézzük a legfontosabbakat.

Random jelenség akkor (vagy csak olyan vonatkozásban) kerülhet szóba, amikor a véletlen „készlete" minden eleme abszolút értelemben (vagy egy szempontból abszolút értelemben) teljesen egyenértékűnek tekinthető. Ilyen feltételt elégítene ki az az eset, amelyben a négy nukleotida elem abszolút egyenértékű és egymással egyenlő példányban (azonos koncentrációban) szerepelhetne a sorakozás készlete gyanánt. (Ilyen feltétel adott a lottó kilencven, egy-egy példányban szereplő húzási készlete példájában.) Nem szorul azonban bővebb magyarázatra, hogy a négy nukleotida sem kémiailag, sem szterikusan, sem koncentráció tekintetében nem teljes mértékben egyenértékű. Nem random, hanem eltérő, a megelőzőtől függően eltérő chanceszal kerülhet kötésközelségbe.

Ismeretes olyan modellkísérlet, ami bizonyítja, hogy a legcsekélyebb eltérésnek is drámai a sorrendalakulásra való kihatása. A kísérletben olyan *A* és *B* típusú golyók sorakozásáról van szó, amelyek egy csekély súlykülönbségtől eltekintve tökéletesen egyformák. A golyók két különálló, egymás feletti ferde csatornán gurulhatnak be egyenként egy kazettába. A kazettában érzékeny kétkarú mérleg lengő serpenyője közül a bemeneti oldalon levő fogadja az egyik vagy másik csatornából lehulló golyót. Minthogy a golyók között súlykülönbség mutatkozik, az inga-lengés aperiódusossá válik. Így attól függően, hogy *A* vagy *B* típusú volt a megelőző golyó, a serpenyő az *A* vagy *B* típusú golyót fogadhatta, annak a bemeneti nyílását közelítette meg visszalengésekor, miután az előző golyó a másik serpenyőbe és onnan az egyetlen kimeneti csatornába hullott. A kimeneti csatornában rendezetlen sorrend alakult a különbség, illetve az aperiódusos lengés értelmében. Meglepetésre a „rendszertelen" mintázat 128 golyó (2^7) után pontosan megismétlődött. A második sorozatot ugyanolyan harmadik, negyedik stb. követte, amíg csak *A* és *B* típusú készletről gondoskodtak (P. R. EHRLICH és R. W. HAM 1963). Az adott súlykülönbség következtében csak *egyféle* „szeszélyes" sorrendre nyílott lehetőség. Joggal tételezhetjük fel, hogy négyféle nukleotida (4 sorakozó elem) három, illetve valószínűleg ennél több különbsége, egymással kombinálódva jelentős számú szekvenciáció típust eredményezhet. Az így létrejött sorrendek száma már reális lehet ahhoz, hogy hosszú, de az élet keletkezési idejével összhangban álló idő alatt a szelekció anyagaként szerepelhessen. Tudjuk, hogy mintegy ezer, információra képes sorozat elegendő ahhoz, hogy élő rendszer létesülhessen.

Nem szorul bővebb magyarázatra, hogy a sorrend hibásodása, a mutáció tekintetében hasonló a helyzet, ha nem is tekinthetjük azokat törvényszerűen irányítottaknak.

Felmerül az a kérdés, hogy találkozunk-e az evolúciós kutatások során olyan helyzettel, amelyben annak a halmaznak az elemeire nézve a véletlen eloszlás koncepciójának alkalmazása jogosult? Az elemek a vizsgálat szempontjából gyakorlatilag egyenértékűekként kezelhetők, ha például csupán a gyakoriságukat tekintjük. Az ilyen helyzet klasszikus példája a popu-

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA KÖNYVTÁRA

lációkban, fajokban a meghatározott génpárok (allélek) vagy alternatív bélyegek, bélyegkomplexek stb. előfordulási gyakoriságának, illetve ennek a gyakoriságnak nemzedékről nemzedékre való eltolódásának vizsgálata. Ideális az a helyzet, amelyben az alternatívák egyike teljesen dominál, a másik teljesen recesszív. Más esetben csak jó megközelítésre gondolhatunk.

Ha ilyenkor a gyakoriság eltolódásából annak okára nézve kívánunk következtetni, akkor már az *esély* (chance) jellemző példájával találkozunk. Ennek forrása éppen az alkalmasságuk *különbözősége*, amely a gyakoriságukat biztosítja. A gyakoriság tényének megállapítása szempontjából elhanyagolható kis különbségek a környezettel való kölcsönhatásuk megfelelő kialakulásának eltérő mértéke, azaz alkalmasságuk kisebb-nagyobb eltérése a következő nemzedékekbeli gyakoriságuk eltolódásában való részvételük *esély*ként jelentkezik. Az alkalmasabbak felszaporodásának esélye a szelekciós érték fokmérője.

Az organikus evolúcióban az *esetlegesség* (eventuality, founding) a véletlen olyan formája, amelyben igen ritka és egymástól független események váratlan összetalálkozása térben és időben merőben új kapcsolatok létesülésére vezethet, új, de most már törvényszerű következményekkel. Ezek újdonságok, amelyek fajok, sőt nemzetségek keletkezésére vezethetnek.

A rendkívüli ritka evolúciós tényezők ilyen sikeres koincidenciája és együtthatása az organikus evolúció esetében *elvileg* egyszeri és pontosan megismételhetetlen esemény. Eddig már 8—10 típusú ilyen esemény több egyedi példájáról számol be az irodalom (E. Mayr 1961, Faludi, B. 1974). Egy példa is elegendő, hogy a kérdés lényegére rávilágítson. Váratlan erejű és irányú szél több ezer kilométerre a kontinensektől távoli óceáni szigetekre sodor madarakat, rovarokat, magvakat, spórákat. Igen ritkán lehet az elsodródottak között például egy fajhoz tartozó madárpár, vagy akár egyetlen, éppen tojásrakó nőstény. Lehet a klíma élő környezet is azon a szigeten az eredeti lelőhelyhez olyan mértékben hasonló vagy éppen kedvező, hogy az új környezetben talál elég életlehetőséget ahhoz, hogy fennmaradjon és gyorsan elszaporodjék. Az eredeti faj mindezek ellenére nem rekonstruálódhat, csak új faj jöhet létre. A betelepülő egyed — érthető módon — faja génállományának csak leszűkített, legfeljebb egy-egy génnel képviselt töredékét vihette magával a szervezetében. Ez a töredék gyarapodhat ugyan, de csak új mutációkkal, melyeknek csekély hányada lehet az eredeti állománybeliekkel azonos. A klíma, a táplálék, a ragadozók száma és típusa a fészkelőhely stb. vagy megfelelő, vagy jobb is, mint az eredeti, de nem lehetnek ezek a környezeti tényezők azonos jelentőségű szelekciós hatásúak. Már most, ha mind a génalap, mind a szelekció az eredetitől eltérő, az eredményes kifejlet is csak eltérő lehet. Megjegyzendő, hogy az ilyen radikális véletlen esemény olyan *gyorsított evolúcióra* vezet, amely szemünk előtt játszódik le, évek alatt és így eredményesen ellenőrizhető.

Talán még csak azt kell közelebbről megindokolnunk, hogy miért *elvileg* egyszerű és megismételhetetlen az ilyen esemény. Organikus evolúcióban egy esemény ritkaságát az élőlények rövid életidejéhez és ezen belül a változékonyság igen nagy sebességéhez kell mérnünk. Az világos, hogy az elsodródási mechanizmus akár egy évszázad múlva pontosan megismétlődhet, bár ez nem is tekinthető szokatlanul ritka eseménynek. Időközben azonban az élettelen környezet változik valamelyest, de esetleg elhanyagolható mértékben. Az elsodort madár faja már nem lehet változatlan, sőt esetleg már nem is azonos. A magában hordozott géntöredék azonban nem lehetne ugyanaz,

hogyha nem egy évszázaddal, hanem csupán egy-két nemzedékkel később következnek be hasonló esemény. Ugyanez vonatkozik az új környezet biotikus szelekciós tényezőként ható elemeire. Ha csak egy ragadozó szaporodott fel, vagy egy táplálékfaj szegényedett el azóta, már elégséges ahhoz, hogy a puszta fennmaradás lehetetlenné váljék. Ilyen módon világos, hogy az elsodródási mechanizmus a véletlen összetalálkozások és a fajképződési mechanizmus megismétlődését feltételezve is legfeljebb változott fajból az előzőtől eltérő faj (vagy fajok sokasága) jöhet létre.

Az organikus evolúcióra *sajátos, megkülönböztető bélyegeket* sokan igyekeztek már felsorakoztatni. Kielégítő eredményről nem számolhatunk be. Nem lenne célravezető valamilyen definíciót konstruálni erre a célra. Inkább néhány fő vonásra igyekszünk rámutatni.

Minden evolúció alapjában véve egységes, előrehaladó, folytonos folyamat. Az élővilág geneológiai folytonossága azonban egészen sajátos módon biztosított. Az egyedi, családi szintű folytonosság biztosítottsága ennek a megoldásnak szemléletes példája az *utódlás*. Az utód, akár újszülöttről, új populációs nemzedékről, új fajról stb. van szó, leszármazottja *(descendens)* a szülőknek, elődöknek *(ancestor)* és nem egyszerű okozata vagy miniatűr másolata *(replica)*. A mindenkori régi, amikor „szüli" az újat, akkor az előd feleslegessé vált, elhatárolódott reprezentatív része elkülönül. Ez azonban csak *kezdemény*. Az elkülönülő rész (határesetben sejt vagy félértékű sejt) kezdemény volta talán a legjellemzőbb különbség más folytonossági biztosítékokkal szemben. Csak első lépéses biztosíték a hasonlóság kialakulásához, az újra kialakulásnak csupán a programja, amelyet részben a vele együtt különváló ivarsejti embrionális környezet és a környező biotikus és abiotikus életfeltételek fokozatosan érvényesülő ráhatása *(ektogenezis)* lépésről lépésre rekapitáló módon realizál (Faludi B. 1960, 1961). Kevésbé ismeretesek ugyan, de alapvető vonásai az utódpopulációk, fajok keletkezésében is felismerhetők. Ilyen értelemben minden organikus evolúciós folytonosságot *leszármazási jellegű* folyamatnak tekintünk és a változatosság létesülésében — végső fokon — szokatlanul nagyfokú konzervativizmus mutatkozik, a genetikai és biokémiai anyagcsere alapok szembeszökő *rokonsága*. Ez lényegében csupán nagyszámú elágazódás számára (divergencia) nyújt lehetőséget, de gyökeres eltérés nem következik be. Így az élővilág rokonsági ágazatok, törzsfák formájában való feltüntetése a bioevolúció *axiomája* (törzstörténeti jelleg) és nem puszta szemléletes ábrázolása vagy jelképe.

Sok vitára adott okot az organikus evolúció egy másik jellegzetessége, az alig tagadható fokozatos *tökéletesedési tendencia*. Sokan, joggal visszariadnak az antropomorf-teleologikus kifejezési mód lehetőségétől, másrészt viszont ilyen tendencia létezésének a kétségbevonása egyértelmű magának a bioevolúciónak nyílt vagy burkolt tagadásával. Aligha tagadható, hogy a törzsfejlődés folyamán olyan fokozódó „többlet" keletkezik, amely indokolttá teszi azt, hogy az újonnan keletkezőket megfelelő *magasabb szinteken* levőknek tekintsük nem csak a keletkezésük újabb időpontjának. Ez az utóbbi egyébként is csak viszonylagos.

A tendencia lényegét különböző módon igyekeztek megközelíteni, amelyek közül néhányat megemlítünk. Egyesek a semmitmondó belső „teremtő lendület" (élan vital) koncepcióval kísérleteztek (H. Bergson 1908). Mások megelégedtek az ún. emelkedő jelleg egy-egy „megnyilatkozási módjának" a kimutatásával (J. Huxley 1958). Sokan a fokozódó *bonyolulttá*

válásra hivatkoznak. Ez azonban úgyszólván mindig egyidejű egyszerűsödéssel párhuzamos és nem ritkán éppen ez jellemzi legnagyobb mértékben. Mind a komplexicitás, mind a felszaporodás, ritkulás, elterjedés, élettér-beszűkülés, életrevalóság és ezek kölcsönhatása, csak a tendencián *belül* mutatkozó hullámzásokat indokolja. Maga az *evolúciós alkalmasság* (fitness) is csak a tendencia érvényesülését bizonyítja, de konkréten nem világít rá a lényegére, mert a maga körülményei között „a maga módján" egészen különböző fajok (és magasabb evolúciós egységek) lehetnek egyenértékűek.

Mi viszont a megoldást éppen annak a vizsgálatától reméljük, hogy *miben* tökéletesebb az a körülmény és az a mód, amelynek közepette az alkalmasság megmutatkozik. Úgy is mondhatjuk: a kérdés kulcsát abban látjuk, hogy konkréten milyen az érintett fajra az élőlény-környezet egysége *(habitus--habitat viszony)*.

Az élőlény és környezet egységét és ezen belül az élőlény fölényét rendesen csak *általánosságban* vesszük figyelembe és nem elemezzük a „leigázott" környezet sokrétűségét és súlyát. Úgy hisszük, hogy ebben az élőlények szabályozó rendszere játssza a legnagyobb szerepet.

Az élőlények szabályozó funkciója elemi formában az elővéválás pillanatában működésbe lép és *ennek* birtokában nem volt teljesen kiszolgáltatva környezetének. Így kell értelmeznünk azt a tételt, hogy a legegyszerűbb élőlény már *szerves önfenntartó rendszer*. A legegyszerűbb szabályozási folyamatnak is az a körülmény nyújtott lehetőséget, hogy a táj értelemben vett anyag--energia kicserélődési rendszere „tárolás"-ra volt berendezve. Az élőlény olyan önfeltöltő akkumulátorhoz hasonló, amely minden anyag-energiabeli „bevételt" raktároz és minden „kiadást" raktárból fedez. Ennek a folyamatnak a szabályozottsága biztosítja egyrészt azt, hogy egyáltalán képződhet bármiféle többlet, másrészt azt, hogy a környezeti behatásokra szükség szerint aránytalanul „robbanékonyan" vagy átmenetileg akár egyáltalán ne reagáljon, illetve, hogy kompenzáljon, azaz más úton-módon válaszoljon. Lehetőség nyílik arra, hogy az élőlény a maga módján reagáljon és a környezet mind nagyobb számú tényezőjével szemben ez kialakulhasson, azaz kiszélesedhet és erőteljesebbé válhat a környezet feletti uralom a szabályozás kifinomulása arányában.

Az antropológusok régen felismerték, hogy a növekvő környezet feletti *fölény* (úgy tetszik, csökkenő kiszolgáltatottság) elérése az emberré válás menetére rendkívül jellemző. Az alkalmazkodástól való megkülönböztetés érdekében ezt külön névvel *úrrá válásnak, szuperációnak* nevezték el (G. A. SCHMIDT 1942). A magunk részéről azonban azt hisszük, hogy ez nem az antropogenezis speciális jellegzetessége, hanem a munka révén, egészen sajátos módon csak ott éri el a maximumát. Az úrrá válás általános, és ennek a széleskörűsége és erőteljessége *elvileg* alkalmas lehet a tökéletesedési tendencia jellegének és fokának a tanulmányozására. Azért mondjuk, hogy „elvileg", mert egyelőre nem áll rendelkezésünkre semmi olyan sokparaméterű kidolgozott ökológiai-etológiai koordináta rendszer, amely ezt gyakorlatilag kivihetővé tenné. Az illetékes szakemberek tarsolyában azonban tekintélyes mennyiségű részletadat halmozódott fel, ami biztató kezdeményezésekre is lehetőséget nyújthat.

Faludi Béla
Eötvös Loránd Tudományegyetem
Genetikai Tanszék

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója
Műszaki szerkesztő: Sándor István
A kézirat nyomdába érkezett: 1979. II. 8. — Terjedelem: 8,75 (A/5) ív
79.6866 Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György

MTA Könyvtára
Periodika 19 79/4001 m.

TARTALOM

T. Szabó Mária: A fő hisztokompatibilitási komplex biokémiai alapjai 107
Balázs András, Farkas Alfréd, Blazsek István és Klupp Tibor: Szérumfaktorok és proliferációs regulátorok szinergizmusa sejtkultúrákban 139
Szemere György és Zsibrita Ágnes: Egerek spermatocitáinak sugárérzékenysége a meiotikus profázis különböző stádiumaiban 153
Székely Sándor, Bercsényi Miklós és Csányi Vilmos: Szex-átfordítási kísérletek paradicsomhalon 167
S.-Rózsa Katalin: A szívműködést szabályozó neuronhálózat *Achatina fulica* Ferussac központi idegrendszerében 175

Vitarovat

Gánti Tibor: Az evolúció iránya 195
Faludi Béla: Véletlenszerűség és tökéletesedési tendencia 199

Ára: 21 Ft
Előfizetés egy évre: 42 Ft

INDEX: 26.073
ISSN: 0133—3844

INDEX

BIOLÓGIA (Budapest)
26/2 (1978)

T. Szabó, Maria: Biochemical Aspects of the Major Histocompatibility Complex 107
Balázs, A., Farkas, A., Blazsek, I. and Klupp, T.: Synergism of Serum Factors and Proliferation Regulators in Cell Cultures 139
Szemere, G. and Zsibrita, Ágnes: X-Ray Sensitivity of Murine Spermatocytes During the Different Stages of Meiotic Division 153
Székely, S., Bercsényi, M. and Csányi, V.: Sex Reversal Experiments in Paradise Fish 167
S.-Rózsa, Katalin: Heart Regulatory Neural Network in the Central Nervous System of *Achatina Fulica* Ferussac 175