A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK

KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTI

STRAUB F. BRUNÓ

X. KÖTET

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST
1967

TARTALOM

Thoma Andor: Az Előember nyakszirtcsontja a vértesszőllősi őstelepről 1
Pintér Miklós: Baktériumok rendszerezése számítógéppel 21
Alikhanian Sz. I.: A molekuláris genetika kutatásainak fő irányzatai 35
Szabó Gábor—Vitális Sándor és *Békési István:* A differenciálódás tanulmányozása mikroorganizmusokon 53

BESZÁMOLÓK

Sárkány Sándor: A II. Magyar Növényanatómiai Szimpozium 61
Tigyi József: Az Izomszimpozium 73

KÖNYVISMERTETÉS

G. Erdtman: Pollen and Spore Morphology (Plant Taxonomy. — Gymnospermae, Bryophyta (Text) 1965. — Almqvist and Wiksell, Stockholm p. 1—191. és 24 fényképtábla. (Nagy Lászlóné) 79

ÖNNÁLLÓ TANULMÁNY

Balogh János: A talajzoológia feladatai 81

AZ MTA NAGYGYŰLÉSE KERETÉBEN MEGTARTOTT ELŐADÁSOK

Győrffy Barna: Genetikai kérdések kísérletes megközelítése 95
Szende Kálmán: A kromoszóma szerkezet és működése összefüggésének vizsgálata baktériumokban és fágokban 105
Vida Gábor: Növények evolúciós változásainak genetikai elemzése 115
MTA Biológiai Tudományok Osztályának 1967. május 3-án tartott ülése 121
Weiszfeiler Gyula: A mikrobiológiai tudományok fejlődése a Szovjetunióban 159
N. P. Dubinin és *L. G. Dubinina:* Alkyláló vegyületekkel a *Crepis capillaris* száraz magvaiban kiváltott chromosoma mutációk 165
Salánki János: 40 éves a tihanyi Biológiai Kutatóintézet 191
Farkas Gábor: Beszámoló a VII. Nemzetközi Biokémiai Kongresszusról 203
Venetianer Pál: RNS—DNS hibridizációs tanfolyam, Nápoly, 1967. június 5—24 207
Gaál Ödön: Beszámoló a „Riboszoma és Messenger-RNS biokémiája" szimpoziumról 213

MODERN FIZIKAI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA A BIOLÓGIAI KUTATÁSBAN CIMŰ KOLLOKVIUM TIHANY, 1967 SZEPTEMBER 18—20

Sasvári Kálmán: Kristály és molekulaszerkezet vizsgálata röntgendiffrakcióval 219
Neszmélyi András és *Radics Lajos:* A magrezonancia spektroszkópia alapjai 251
Radics Lajos és *Neszmélyi András:* Az elektron spin rezonancia spektroszkópia alapjai 329
Belágyi József: Az ESR spektrometria biológiai vonatkozásai 355
Jobst Kázmér: Mikrospektrofotometria 371
Elődi Pál: Az abszorpció, optikai forgatás és cirkulár dichroizmus alkalmazása a fehérje szerkezetkutatásban 391
Czuppon Alfréd: Szedimentációs analitikai módszerek 413
Gaál Ödön: Preparatív szedimentációs módszerek 427
Venetianer Pál: Nukleinsav hibridizáció 439

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK

KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTI

STRAUB F. BRUNÓ

X. KÖTET 1. SZÁM

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

1967

BIOL. OSZT. KÖZL.

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK
KÖZLEMÉNYEI

A SZERKESZTŐ BIZOTTSÁG TAGJAI
DUDICH ENDRE, GYŐRFFY BARNA, SOÓ REZSŐ,
SZENTÁGOTHAI JÁNOS, TÖRŐ IMRE, ZÓLYOMI BÁLINT

SZERKESZTI
STRAUB F. BRUNÓ

TECHNIKAI SZERKESZTŐ
DÉZSI LÁSZLÓ

SZERKESZTŐSÉG: MTA BIOLÓGIAI OSZTÁLYA BUDAPEST V., NÁDOR U. 7.

KIADÓHIVATAL: BUDAPEST V., ALKOTMÁNY UTCA 21.

A Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Osztályának Közleményei változó terjedelmű füzetekben jelennek meg. Négy füzet alkot egy kötetet. Évenként egy kötet jelenik meg.

Az MTA Biológiai Osztályának Közleményei részére kéziratok a következő címre küldendők:

Budapest V., Nádor u. 7., Dézsi László technikai szerkesztő.

Minden szerzőt 100 különlenyomat és nyomtatott ívenként 400 forint tiszteletdíj illet meg megjelent munkájáért. Közlésre el nem fogadott kéziratokat a szerkesztőség lehetőleg visszajuttat a szerzőhöz, de felelősséget a beküldött kéziratok megőrzéséért vagy továbbításáért nem vállal.

A Közlemények előfizetési ára kötetenként belföldi címre 40 forint, külföldi címre 60 forint. Megrendelhető belföldre az Akadémiai Kiadónál (Budapest V., Alkotmány u. 21. Bankszámla: 05-915-111-46 sz.) külföldre a „KULTÚRA" Könyv- és Hírlap-Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest I., Fő utca 32. Bankszámla: 43-790-057-181 sz.) vagy annak külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

A Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Tudományok Osztálya és Orvosi Tudományok Osztálya a következő idegen nyelvű folyóiratokat adja ki:

Acta Biochimica et Biophysica
Acta Biologica
Acta Botanica
Acta Chirurgica
Acta Medica
Acta Microbiologica
Acta Morphologica
Acta Paediatrica,
Acta Physiologica,
Acta Zoologica

E lapok hivatottak a magyar biológiai és orvosi tudományok eredményeinek legjavával a külföldet megismertetni.

A cikkek angol, német, francia vagy orosz nyelven jelennek meg, a szerző kívánsága szerint, összefoglaló pedig további egy ill. két nyelven. A dolgozatot magyar vagy a megfelelő idegen nyelven az alábbi címekre kell beküldeni:

Acta Biochimica et Biophysica szerkesztősége, Budapest XI. Karolina út 29. (Dr. Boross László).

Acta Biologica szerkesztősége, Budapest IX. Tűzoltó u. 58. (Dr. Bernád Irén).

Acta Botanica szerkesztősége, Budapest XIV. Vajdahunyadvár, Növénytár (Dr, Allodiatoris Irma).

Acta Chirurgica szerkesztősége, Budapest VIII. Üllői út 78/b. Urológiai Klinika (Dr. Rényi-Vámos Ferenc).

Acta Medica szerkesztősége, Budapest VIII. Szigony u. 43. KOKI (Dr. Stark Ervin)

Acta Microbiologica szerkesztősége, Budapest IX. Gyáli út 4. OKI (Dr. Dömök István)

Acta Morphologica szerkesztősége, Budapest IX. Tűzoltó u. 58. Szövet- és Fejlődéstani Intézet (Dr. Bernád Irén).

Acta Paediatrica szerkesztősége, Budapest VIII. Bókay János u. 53. I. sz. Gyermekklinika (Dr. Véghelyi Péter).

Acta Physiologica szerkesztősége, Pécs, Rákóczi út 80. (Dr. Korányi Lajos).

Acta Zoologica szerkesztősége, Budapest VIII. Baross u. 13. Természettudományi Múzeum (Dr. Soós Árpád).

AZ ELŐEMBER NYAKSZIRTCSONTJA A VÉRTESSZŐLLŐSI ŐSTELEPRŐL

THOMA ANDOR

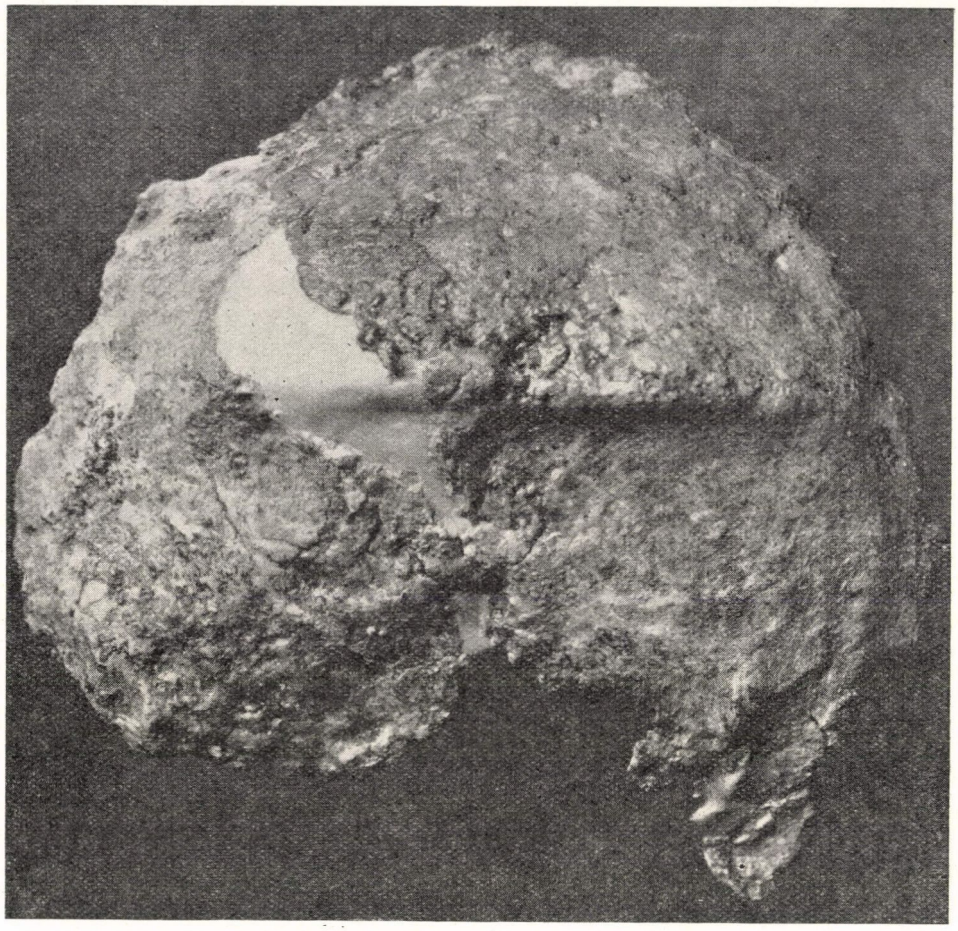
Kossuth Lajos Tudományegyetem Embertani Intézete, Debrecen

Az alsó-paleolitikus Buda-kultúrának a Mindel interstadiálisára datált, mintegy félmillió éves, vértesszőllősi telephelye ma már világszerte ismert (KRETZOI és VÉRTES, 1964; VÉRTES, 1966). Az eddigi ásatások során a legalsó, 1. sz. kultúrrétegből két emberi egyén fosszilis maradványai kerültek napvilágra. „Homo I"-ünk egy néhány fogmaradvánnyal képviselt gyermek, amelynek vizsgálatáról már beszámoltam (THOMA, 1966). 1965. augusztus 21-én az L ásatási szelvény ß négyszögéből egy felnőtt egyén os occipitale-ját rejtő mésztufa-tömböt mozdított ki egy kutatórobbantás. A leletet az ásatást vezető Vértes László gipszpakolásban beszállította a Nemzeti Múzeumba, majd 1965 őszén sajátkezűleg szabaddá preparálta. A jelen tanulmány ez utóbbi „Homo II" anthropológiai vizsgálatának eredményeiről számol be. E helyen mondok köszönetet Dr. Vértes Lászlónak, a kényes állapotú fosszilis csont vizsgálata során nyújtott technikai segítségéért!

Az új lelet segítségével jóval pontosabban tudjuk meghatározni a vértesszőllősi ember rendszertani és származástani helyét a Hominidae család keretén belül, mint a fogak alapján. Az Australopithecinae alcsaládot már az odontográfiai vizsgálat kizárta. Méretei alapján a nyakszirtcsont mintegy háromszor akkora agykoponyához tartozott, mint az előbbi alcsalád átlaga. Igy teljesen biztos, hogy leletünk az (Eu)Homininae alcsaládhoz tartozik, és elegendő, ha részletes összehasonlítást csak ez utóbbi taxon evolúciós szintjeinek (Archanthropus, Palaeanthropus, Neanthropus) leletanyagával végzünk.

Megtartási állapot és rekonstrukció

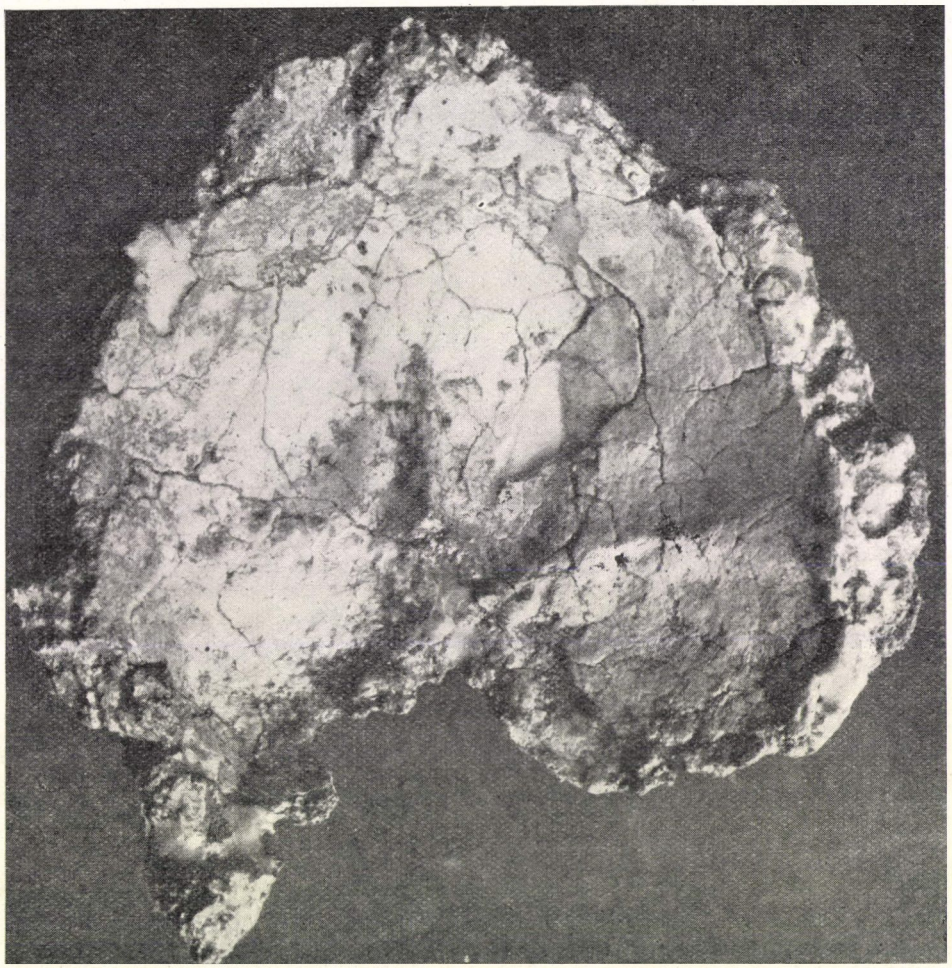
A lelet a nyakszirtcsont pikkelyi részéből (squama occipitalis) áll (lásd 1., 2. és 3. ábra). Környezetében a koponya egyéb részeinek nyoma sem mutatkozott. A pikkely két részre törve került elő, s ezek középtájon jól látható, átlós hézaggal illeszkedtek össze. Azonban, különösen az endocranialis felszínen, elegendő hosszúságú szakaszokon mutatkozott pontos illeszkedés az anatómiailag hű összeragasztáshoz. A csontról Dr. Bugyi Balázs Röntgen-felvételeket



1. ábra. Vértesszőllős II; a nyakszirtcsont exocranialis felszíne. 1/1

készített, és az ezeken konstatálható szabályos eloszlású csontszerkezet és megszakítatlan érlefutások igazolják az összeillesztés helyességét. A hiányok kitöltése cerezin-viasszal, a ragasztás acetonban oldott filmmel és műgyantalakkal, a csont konzerválása „Polyvinyl Acetal Alvar"-ral (előállítja: Shawinigan, Ltd., London) történt.

A lambdavarrat mindkét oldalon több sérülést visel, a lamina externa és interna-n számos hajszálrepedés és kisebb folytonossági hiány mutatkozik. Az öreglyuk szegélye körös-körül le van tördelve, azonban annak condylus mögötti szakasza kielégítő pontossággal rekonstruálható volt. Helyzetét már közelítőleg meghatározza az a körülmény, hogy a linea nuchae inferior alatt egy jelentős csontrész épen maradt a musculus rectus capitis post. maior és minor jól meghatározható tapadási felszíneivel. Pontosabb bejelölését az a



2. ábra. Vértesszőllős II; a nyakszirtcsont endocranialis felszíne. 1/1

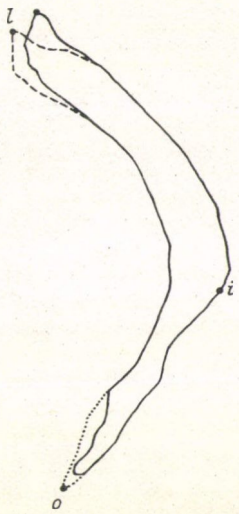
szerencsés körülmény tette lehetővé, hogy a csonttöredék bal alsó mediális szegélyén megmaradt az a hirtelen kiugrással kezdődő csontmegvastagodás, amely robusztus koponyákon a condylus occipitalisok mögött az öreglyukat szokta szegélyezni. E szakaszon a törési szél nem lehetett távolabb a foramen magnum anatomiai szélétől 1,5 mm-nél. A kidomborodás gerincének iránya alapján az öreglyuk szegélye e szakaszon már dorsalis irányban konvergált, s íve konzekvensen folytatható volt. E támpontok alapján, a méretek felvétele alkalmával, az öreglyuk szegélyét cerezin-viasszal rekonstruáltuk. Az opisthion mérőpont (o) e szegélynek a medián-szagittális síkkal való metszéspontjában helyezkedik el, s ez az adott esetben a crista occipitalis externa egyenes, basalis irányú meghosszabbítása segítségével volt lokalizálható. Helyzete, megítélésem szerint, 2 mm-es maximális hibával megfelel a természetesnek, és az eset-

3. ábra. Vértesszőllős II laterális nézetben. A szagittális kontúrvonal jobb-paramediális helyzetű, a torus occipitalis legnagyobb kiugrásánál; a széleken jól megfigyelhető a csont vastagsága. 1/1

leges lokalizációs hiba a planum nuchalet inkább minimálisan megrövidíthette, mint meghosszabbíthatta.

A nyakszirtpikkely apicalis része repedezett, összenyomódott és olyan értelemben deformált, hogy a pikkely csúcsán elhelyezkedő lambda mérőpont (1) eredeti helyzetéhez képest vertikális irányban mozdult el. Nem akarván a csontot megkárosítani, a lambda helyzetének korrekcióját csak a nyakszirtpikkely medián-szagittális körrajzán végeztem el. Az endocranialis kontúrvonalon a deformáció kezdete jól megmutatkozott, s annak természetes lefutása — az érintetlen szakasz megfelelő távolságig való, konzekvens meghosszabbításával — könnyűszerrel rekonstruálható volt. Az exocranialis kontúrvonal

hozzászerkesztését a falvastagság határozta meg. A pikkelycsúcs és a lambda-pont helyzetének korrekcióját (az opisthion-táj rekonstrukciójával együtt) a 4. ábra mutatja be. Összehasonlításra természetesen a korrigált lambdától felvett méretek szolgálnak. A kiigazítás módjából nyilvánvaló, hogy a felső-pikkely így meghatározott méretei kisebbek (tehát primitívebbek) nem lehetnek megadott értéküknél. A lambdavarrat pars lambdicajának sérülései miatt még fennáll (csekély valószínűséggel) annak a lehetősége, hogy a lambda-pont



4. ábra. A vértesszőllősi nyakszirtcsont medián-szagittális körrajza, a bejelölt mérőpontokkal. Mutatja az opisthion-táj rekonstrukcióját és a lambda-táj korrekcióját. 1/2

a felvettől jobbra és egy kissé az előtt helyezkedett el. Biztonság okából meghatároztam az ebben az irányban való tévedés lehetőségének maximumát is, és e hiba lehetséges befolyásának mértékét figyelembe vettem (l. a metrikus jellegek fejezetét).

Leíró-morfológiai vizsgálat

Életkor, nem, pathológia. — A csont kétségkívül növekedését befejezett egyénhez tartozott. A sutura lambdoides és s. occipitomastoidea, amelyeknél levált a koponyáról, megmaradt részeiken elcsontosodás nyomát nem mutatják. Elméletileg semmi sem indokolja, hogy a fosszilis embernél a varratok záródása a mai emberéhez képest *retardált* lett volna. A varratcsontosodás mai menete alapján tehát az egyén harmincadik évét még nem érhette el. A csont robusztícitása és összes dimenzióinak feltűnő nagysága inkább a férfi nemre engednek következtetni. Statisztikai távolságainak nemcsak nagyság-, hanem formabeli komponense is kisebb a recens férfi, mint a női referencia-sorozatnál (l. IV. táblázat).

1. táblázat

Fosszilis és recens Hominidák nyakszirti vastagságai (mm), TWIESSELMANN (1941) mérőpontjain: 6. lamda alatt 5 mm-el, 8. fossa cerebralis mélyén, 9. fossa cerebellaris a linea nuchae inferior előtt és alatt; a: jobb, b: bal

Nyakszirtcsontok	6.	a	8.	b	a	9.	b	Adatok forrása
Vértesszőllős II	>10	10,0		±10	3,5		3,0	jelen tanulmány
Oldoway („chelléen")	—		13,0		—		—	HEBERER, 1963
Pithecanthropus II	13,0	—		—		5,0		v. KOENIGSWALD, 1940 és
Sinanthropus min.	[7,0]	—		—		2,5		WEIDENREICH, 1943
(6 ♂ + ♀) ...max.	[10,7]	—		—		6,8		
Ngandong min.	—	6,1		6,0	6,0		5,2	SINGER, 1958
(6 ♂ + ♀) max.	—	8,5		10,1	9,1		8,0	
Ehringsdorf	7,5	—		—		1,2		WEIDENREICH, 1928
Spy I	10,0	7,0		7,0	6,0		6,2	TWIESSELMANN, 1941
Spy II	8,0	7,0		7,0	4,0		4,0	TWIESSELMANN, 1941
Swanscombe	11,0		6,0			4,0		WEINER—CAMPBELL, 1964
Quinzano	11,0	5,0		5,5	—		—	BATTAGLIA, 1948
Tapolca (f. paleol.)	8,0	—		5,0	—		—	THOMA, 1957
Cheix (magdalénien)	8,0	3,0		3,0	1,0		—	TWIESSELMANN, 1941
Sauveterre (azilien)	8,0	4,2		4,3	0,8		0,8	TWIESSELMANN, 1941
Rochereil (azilien)	7,0	4,2		5,0	2,0		2,0	TWIESSELMANN, 1941
Francia neo-aeneolith. min.	6,0	2,2		2,2	1,0		1,0	TWIESSELMANN, 1941
(39 ♂ + ♀) max.	9,0	7,0		7,0	4,0		4,0	
Recens európaiak min.	4,0	2,0		2,0	0,5		0,5	TWIESSELMANN, 1941
(400 ♂ + ♀) max.	10,2	6,5		6,7	2,5		2,7	
M (200 ♂♂)	6,55	3,89		4,09	1,27		1,36	
M (200 ♀♀)	5,71	3,13		3,16	1,08		1,22	
Ausztrálok min.	9,0	5,0		5,0	2,0		2,0	TWIESSELMANN, 1941
(6 ♂ + ♀) max.	13,0	8,0		8,0	5,0		5,0	

II. táblázat

A vértesszőllősi nyakszirtcsont metrikus jellegei, összehasonlítva egy recens sorozat és a Sinanthropus XII (♂) megfelelő értékeivel

No. Martin	Jelleg	Vértesszőllős II		Lakhis* (150 ♂ ♂)		(x—M)/σ**		
		o rek.	l. korr. o rek.	M	σ	Sin. XII	Vsz. II diagnózis	
12	ast-ast	126,5	**126,5**	107,94	4,88	1,45	3,80	archaikus
28	l⌒o	134	**135**[1]	117,34	7,32	0,36	2,41	speciális
28(1)	l⌒i	78	**79**	78,32	7,89	—2,96	0,09	modern
28(2)	i⌒o	56	**56**	39,02	—			
30(3)	l-ast d.	95,5	**[91]**	86,86	4,59	0,03	[1,12]	
30(3)	l-ast s.	89	**[86]**	—	—			
31	l—o	106	**102**[2]	96,51	5,19	—2,03	1,06	modern
31(1)	l—i	73,5	**73**[3]	69,81	6,63	—2,61	0,48	modern
31(2)	i—o	56	**56**	37,97	5,40	3,52	3,34	archaikus
33(4)	l—i—o ∢	108,5°	**103**	124,5°	—	*103°*		archaikus
31 : 12	Mag./Szél. ind.	83,79	**80,63**	89,82	7,15	—2,10	—1,29	modern
31(2) : 31(1)	Hurindex	76,19	**76,71**	55,12	10,34	5,17	2,09 ~	modern
28(1) : 28	Ivhossz-ind.	58,21	**58,52**	66,69	4,41	—4,55	—1,85 ~	modern
31 : 28	Szagittális ind.	79,10	**75,56**	82,32	2,30	—4,10	—2,94	archaikus
31(1) : 28(1)	Felsőpikkely görb. index	94,23	**92,41**	89,20	2,32	2,69	1,38	modern

[1] Kevésbé valószínű extrém érték : 141
[2] „ „ „ „ : 104
[3] „ „ „ „ : 77

* Weiner—Campbell (1964) után; az indexek paramétereit a szerzők adataiból, Yule—Kendall (1950, p. 329) képleteivel számítottam, a nyakszirt törésszögét az átlagos húrokból szerkesztett háromszögön mértem le.

** *Az 1%-os szignifikancia-küszöbnek megfelelő, adott irányú standardizált eltérés értéke 2,33.*

III. táblázat

A vértesszőllősi nyakszirtcsont megkülönböztető jellegei a fosszilis emberek sorában*

Fossziliák		Archaikus jellegek: M. 12 ast-ast	31(2) i—o	33(4) ∢ l—i—o	31 : 28 l—o / i⌒o	modern j.: 31(1) l—i	Adatok forrása
Vértesszőllős II	♂	126,5	56	103°	75,56	73	jelen tanulmány
Pithecantropus IV	♂	130	64	92,5°	72,3	44	WEIDENREICH, 1951
Pithecantropus II	♀	125	43	103°	75,0	53	v. KOENIGSWALD, 1940
Sinanthropus XII	♂	115	57	103°	72,9	52,5	WEIDENREICH, 1943
Sinanthropus III juv.	♂	117	[58]	106°	[74,2]	47	WEIDENREICH, 1943
Ngandong V	♂	126	[59]	98°	71,8	[59]	WEIDENREICH, 1951
Ngandong IX	?	129	54	100°	73,8	56	WEIDENREICH, 1951
Broken Hill	♂	[131?]	[59]	99°	[75,4]	[58]	WEINER—CAMPBELL, 1964.
Ehringsdorf	♀?	[135?]	[51,5?]	[107°]	[74,4?]	[58?]	WEIDENREICH, 1928
La Chapelle	♂	127	38	117,5°	78,5	67	* *
Swanscombe	♂?	123	48	118°	79,7	61	WEINER—CAMPBELL, 1964
Quinzano	?	124	—	—	—	77	BATTAGLIA, 1948
Skhul V	♂	122	51	111,5°	78,23	66	WEINER—CAMPBELL, 1964
Chancelade	♂	113	[50]	123,5°	[85,1]	60	VALLOIS, 1946
Taforalt	M	112,3	48,1	121,5°	83,5	69,8	FEREMBACH, 1962
11 ♂♂	min.	106	42	110,5°	79,4	63	és
12 ♂♂	max.	118	54	131,5°	87,6	80	1965

* A nyakszirt törésszögének értékét minden esetben ellenőriztem a hurok háromszögének megszerkesztésével, a l—i és i—o hurokat Chancelade és Taforalt koponyáin a megadott léptékü szagittális diagramokon mértem le. Broken Hill biasteriális szélessége saját becslés mulázson.

** Biasteriális szélesség VALLOIS (1958) után; a többi mulázson vett méret (WEINER—CAMPBELL, 1964), az inion lokalizációja miatt választva.

IV. táblázat

Fosszilis nyakszirtcsontok négyváltozós* távolságai a recens referencia-sorozattól, növekvő formabeli sorrendben

Disztancia	formabeli	nagyságbeli
Lakhis ♂♂ — Taforalt (M)	0,51	1,16
Lakhis — Vsz. II extr.	1,38	5,83
Lakhis — Skhul V	1,80	1,81
Lakhis — Chancelade	1,84	0,22
Lakhis — *Vértesszőllős II*	*2,04*	*4,70*
Lakhis — Swanscombe	3,15	0,61
Lakhis — La Chapelle	3,55	0,46
Lakhis — Sinanthropus XII	6,37	0,01
Lakhis — Ngandong V	7,12	1,28
Lakhis — Broken Hill	[8,93]	[1,77]
Lakhis — Pithecanthropus IV	17,13	0,30
Lakhis ♀♀ — Vsz. II extr.	1,82	9,29
Lakhis — Vértesszőllős II	2,60	7,77

* ast-ast, l—o, l—i és i—o hurok.

A csont rendkívüli kiterjedtsége felveti a hydrocephalia gyanúját. Ennek diagnosztikus jelei a koponyafal vékonysága és az endocranialis relief fokozott mintázottsága lennének. Azonban a vértesszőllősi occipitale e két tünetnek pontosan az ellenkezőjét mutatja. Egyébként is nehéz elképzelni, hogy egy vízfejű egyén az alsó-paleolithikumban megérhette volna a felnőtt kort. A csontra általánosan jellemző még a kifejezett anatómiai és metrikus aszimmetria, ez azonban nem ölt pathológiás méreteket. A tekintélyes falvastagság ugyancsak nem kóros eredetű, mivel annak létrehozásában a lamina externa, a diploë és a lamina interna kb. $\frac{1}{4}-\frac{1}{2}-\frac{1}{4}$ arányban vesznek részt. A paleopathológiában gyakori myelogen osteoporosisoknál ugyanis egyedül a diploë szokott rendellenesen kiterjedni.

Anatómiai jellegzetességek. — A vértesszőllősi nyakszirtcsont több, komparatív anatómiai szempontból értékelhető jellegzetességet visel. Ezek a következők:

1. A varratok lefutása igen egyszerű. A s. lambdoides sértetlen alsó szakasza (pars asterica) forma és kitérés szerint Oppenheim legprimitívebb I/1 sémájának felel meg. Ez a változat az Archanthropusoknál általános, míg a mai embernél igen ritka.

2. A lambdavarrat a s. occipitomastoideába való átmenete előtt mintegy $\frac{1}{2}$ cm-rel 100—110°-os, lateral felé nyitott szögben megtörik. Ez az ún. metastérikus szöglet, amely kifejezetten archaikus tulajdonság. Jelenléte a Sinanthropus X és XII-n, a Swanscombe-i középső-pleisztocén koponyán, valamint a La Chapelle-i, La Quina-i, továbbá a Spy I és II Neandertáliakon állapítható meg.

3. Az eminentia cruciformis lapos, rosszul elhatárolt és barázdái elmosódottak, kifejezett ellentétben a recens ember viszonyaival, és megegyezően egyes Archanthropusokkal (Pithecanthropus és Sinanthropus) és Palaeanthropusokkal (Ngandong, egyes Neandertáliak).

4. A sulcus sinus transversi a sutura occipitomastoideát metszve, a falcsont érintése nélkül megy át az os temporalera. Ez az ún. „direkt átmenet" rendkívül primitív tulajdonság: az emberszabású majmokon és a Sinanthropuson általános, a középső és felső-pleisztocén leletek közül eddig csak a Swanscombe-i és Fontéchevade-i koponyákon figyelték meg.

5. A sérülések ellenére megállapítható, hogy a fossa cerebellarisok területe sokkal kisebb, mint a fossa cerebralisoké. Ezzel összefüggésben a nagyagykisagyi határ, amit a csont belső felszínén a tentorium cerebelli eredése jelez, jóval alacsonyabb szintben helyezkedik el, mint a linea nuchae superior (a recens embernél ezek egy szintben vannak). A vértesszőllősi nyakszirtcsontnak ez az elrendeződése a legtipikusabban archanthropikus sajátság!

6. Az exocranialis felszínen uralkodik a fejlett torus occipitalis transversus: a csont közepén, annak teljes szélességében végigfutó, magas és osztatlan csontduzzanat. Felfelé egy vertikálisan konvex sulcus supratoralis határolja, alsó határát az egyenes és horizontális linea nuchae superior alkotja a m. trapezius tapadási csíkjával; ezalatt konkáv felszín vezet át a planum nuchale-ra. Protuberantia occipitalis externa nincs. A torus laterál felé egy felső és egy alsó ágra válik szét; az utóbbi mérsékelten fejlett crista occipitomastoideában végződik. — A Neanthropusnál ez a képződmény ritka és gyengén fejlett; a Palaeanthropusok torusa háromosztatú, variábilis fejlettségű, és a prot. occ. ext. jól elkülönült. A vértesszőllősi torus az Archanthropusokénak felel meg, ezeken belül a legtöbb morfológiai részlete a Sinanthropuséval egyezik. E két forma között eltérés abban mutatkozik, hogy a vértesszőllősi torus laposabb de jóval magasabb, mint a pekingi (és az összes többi) Előemberé.

A fenti összehasonlításból nyilvánvaló, hogy a vértesszőllősi nyakszirtcsont anatómiai részletei legjobban az Archanthropusokéival egyeznek. Ez utóbbiakon kívül egy európai fosszilia mutat feltűnő morfológiai megfeleléseket leletünkkel. Ez a Swanscombe-i occipitale a délangliai középső pleisztocénből (új feldolgozását l.: Ovey, 1964). Mintegy kétszázezer évvel későbbi a vértesszőllősi embernél, és attól eltérően szakócakultúrával együtt találták. Metastérikus szögletét és a sulcus sinus transversi direkt átmenetét már említettem. A két csont nuchalis reliefje erősen hasonló; megegyeznek abban a ritka variációban is, hogy a m. rectus capitis post. maior és a m. obliquus capitis sup. tapadási felszínei között erősen fejlett csonttaraj alakult ki. A Swanscombe-i torus (vö, Weidenreich, 1940) egészében gyengébb a vértesszőllősinél, azonban e képződmény sajátszerűen egyenes alsó elhatárolódása, a prot. occ. ext. hiánya és a crista occipitomastoidea jelenléte a két csonton azonos. Az angliai fosszilia torusának csontmasszája középtájon jobban redukálódott, laterális

részei erősebben kiemelkednek, és a felsőpikkelyen magasra felhatolva, annak egy felfelé rosszul elhatárolt, speciális részét alkotják. Ez az utóbbi részlet is emlékeztet a vértesszőllősi occipitalera, azonban még érdekesebb, hogy a felsőpikkely félmagasságánál egy felfelé konvex, íves tarajocska figyelhető meg. Lefutása teljesen eltér a recens koponyán e helyen található linea nuchae supremaétól. Jelentőségét most a vértesszőllősi lelet segítségével tudjuk megmagyarázni: véleményem szerint ez a csontív egy sulcus supratoralist határolt felülről, amelynek lefutása a vértesszőllősivel azonos volt, de mivel alatta a torus középtáji csontmasszája redukálódott, maga a barázda kisímult. Az ív mediális tetőpontjának a torus alapjától való egyenes távolsága 25 mm. Ez az érték felülmúlja az összes ismert Hominidák torusmagasságát, kivéve a vértesszőllősiét (l. a metrikus jellegek fejezetét). Ám ez utóbbi differencia arányos a két csont közötti általános nagyságkülönbséggel. Mindebből arra következtethetünk, hogy a Swanscombe-i ember nyakszirti duzzanata egy vértesszőllősi típusú, magas, lapos torus filogenetikai redukciójával keletkezett.

Agyvelő. — A vértesszőllősi nyakszirtcsont endocranialis felszínéről szilikongumi-öntvény készült. Ezen jól kivehető a szabályszerűen jobbra kanyarodó szagittális vénás sinus. A nagyagy nyakszirti lebenyei erősen a kisagy fölé domborodnak — ha nem is olyan mértékben, mint a Sinanthropusnál és a klasszikus Neandertáliaknál — és feltűnően símák. Mindkét oldalon csak egy-egy barázda ismerhető fel, amely helyzete szerint egy-egy hosszú sulcus lunatusnak felel meg. CONNOLLY (1950) kísérletei szerint, ha az agyon megvan a sulcus lunatus, akkor rendszerint megjelenik az endocranialis öntvényen is. A recens embernél ez a barázda kisebb, opercularizáltabb, sőt gyakran hiányzik. Más fosszilis emberek endocranialis öntvényeivel (PIVETEAU, 1957) összehasonlítva a vértesszőllősi ember agystruktúrája a legprimitívebbek közé sorolható.

Vértes megfigyelései szerint Vértesszőllős ügyesen kiválasztott és huzamosan lakott telep, az eszközanyag kitűnő kulturális adaptációra vall, az itt élt emberek igen eredményes vadászok voltak, ötletes módszerekkel tartósították a parazsat, és úgy látszik, hogy kultikus cselekményekre is képesek voltak. Igaz, hogy valójában nagyon keveset tudunk agy és kultúra összefüggéseiről, az is igaz, hogy az endocranialis öntvények megbízhatósága mérsékelt, de itt mégis valami ellentmondás mutatkozik!

Metrikus jellegek

A csont vastagsága. — A vastagsági méretek megoszlása sajátos inhomogenitást mutat a vértesszőllősi nyakszirtpikkelyen. A masszív felsőpikkely egyformán 1 cm körüli értékeket ad. A maximum a torus alsó régiójára esik (16 mm); ez alatt a planum nuchale hirtelen és aránytalanul elvékonyodik. A vas-

tagságok számszerű összehasonlítását az I. táblázat tartalmazza. Fosszilis csontunk nem mutatja a recens nyakszirtekre jellemző, fokozott baloldali vastagságot. Tekintélyes lambdatáji vastagsága a közismerten és különlegesen robusztus ausztráliai bennszülöttek kivételével felülmúlja az összes neanthropikus formák és a Neandertáliak méreteit, Swanscombehoz, a Quinzano-i prémoustérien nyakszirthez és az Archanthropusokhoz csatlakozva. Kiugró értéket képvisel fossa cerebralisainak vastagsága, amelyben már csak az Archanthropusok között akad versenytársa. Fossa cerebellarisainak vastagsága — bár robusztus variánsként — belül marad a Neanthropus variációjának terjedelmén, de ugyanekkor a felnőtt Sinanthropusokén is. Ez a méret az Archanthropusnál és Palaeanthropusnál erősen variábilis (Ehringsdorf), de a vértesszőllősi érték velük összehasonlítva viszonylag gyenge.

Dimenziók, arányok és görbület. — Az opisthion és lambda mérőpontok rekonstrukcióját, illetve korrekcióját a rekonstrukció fejezetében tárgyaltam. Az utóbbi mérőpont áthelyezésétől érintett dimenziókat a 4. ábra körrajzán mértem újra, az íveket puha dróttal és kartográfiai kurvométerrel. Az ábra feltünteti az inion mérőpont (i) helyzetét is, amely a torus alsó szélén, a m. trapezius tapadási csíkjának medián konvergencia-pontjában helyezkedik el. A negyedik (páros) mérőpont, az asterion (ast), a pikkely laterális kiszögellésének csúcsán helyezkedik el, az os occipitale, os parietale és os temporale szimultán találkozási pontján. Az e pontok által meghatározott vonal-, ív- és szögméreteket, valamint a belőlük alkotott indexeket a II. táblázat tünteti fel. A tábla első számoszlopa a vértesszőllősi nyakszirtcsont jelenlegi állapotában való méreteit adja, az opisthion nélkülözhetetlen rekonstukciójával, de a lambda korrekciója nélkül. Összehasonlításra a második számoszlop értékei használhatók, amelyek a lambda helyzetének korrekcióját is kifejezik. Lábjegyzetben megadom az e korrekció maximális hibája esetén adódó méreteket, „kevésbé valószínű extrém érték" címmel. A l—ast húrok értékének korrekciója közelítőleges; a szagittális méretek megbízhatósága természetesen a rekonstrukció függvénye.

Első lépésként hasonlítsuk össze a vértesszőllősi nyakszirtcsont metrikus jellegeit a recens emberével. A recens nyakszirtcsont jellemző tulajdonsága a nagy egyéni variábilitás, az egyes emberfajták között viszont csak minimális eltéréseket mutat. Ezért elegendő egyetlen recens referencia-sorozat használata: a táblázaton feltüntetett Lakhis-i temetőé. Ez a nagy, Közel-keleti, vaskori koponyasorozat elsőrendű megtartású, és méreteinek eloszlása igen jól közelít a normálishoz. Ha leletünknek és az irányjelzőnek használt, legépebb Sinanthropus-nyakszirtnek a referencia-átlagoktól való eltéréseit e sorozat szórásainak egységeiben fejezzük ki, közvetlenül megítélhetjük az eltérések szignifikanciáját. Első közelítésben a vértesszőllősi nyakszirtcsont azon jellegét diagnosztizálhatjuk *archaikusnak*, amelynek standardizált eltérése átlépi az 1%-os szignifikancia-küszöböt, a Sinanthropus-tanúval megegyező irány-

ban. Ezzel a módszerrel archaikusnak mutatkozik a csont nagy biasterialis szélessége, a planum nuchale tekintélyes hosszúsága (i—o) és ez utóbbinak a planum occipitalevel bezárt, viszonylag hegyes szöge, továbbá az erős nyakszirti görbületet jelző szagittális index. Az igen hosszú felsőpikkely (l—i), amelynek indexe fejlett görbületet mutat, viszont teljesen modern felépítésű. Egyedül ez a túlnőtt felsőpikkely okozza, hogy a csont jelentős magassága (l—o) a szélességgel modern index-arányt ad, valamint, hogy a nyakszirtpikkely két szegmentumának aránya — akár a húr-, akár az ívhossz-indexszel kifejezve — modern jellegű. A nyakszirti ív (l⌒o) igen nagy értéke egy modernül hosszú felső szegmentum és egy archaikusan hosszú alsó szegmentum speciális kombinációjának eredménye. Ha ellenőrzésképpen a lambda-ponttól kiinduló méretek „kevésbé valószínű extrém értékeit" fogadjuk el, és helyettesítjük be az indexekbe, azok minden esetben csak élesebbé teszik a táblán megadott diagnózisokat, akár archaikus, akár modern irányban. Megállapítható még, hogy a vértesszőllősi nyakszirtcsont általánosan nagy: összes abszolút méretei felülmúlják a recens átlagokat.

A III. táblázat a gyors diagnózisok ellenőrzését és pontosabbá tételét szolgálja. Vértesszőllős II archaikus jellegei harmonikusan modernebbnek mutatkoznak a robusztus Pithecanthropus IV megfelelő tulajdonságainál, és határozottan archaikusabbnak mutatják fossziliánkat a tábla alsó részén elhelyezkedő, Ehringsdorffal kezdődő csoportnál. A közbüleső csoporton belül a Pithecanthropus II és a Sinanthropus XII adataiból elő lehetne állítani az archaikus vonásoknak Vértesszőllős II-re jellemző kombinációját. Megállapítható tehát, hogy a vértesszőllősi nyakszirtcsont, jellegeinek ezen első csoportjával, klasszikus archanthropikus állapotot őriz. — Vértesszőllős II modern jellegei közül elegendő a felsőpikkely húrját figyelembe venni, mivel a többi ennek korrelátuma. Az összehasonlítás leletünknek ezt a méretét kifejezetten modernnek mutatja: jelentékenyen felülmúlja az összes Archanthropusok és Palaeanthropusok értékeit, és csak néhány Taforalt-i ó-holocén koponya és a felső-pleisztocén Quinzano-i occipitale megfelelő mérete nagyobb — tehát modernebb — nála.

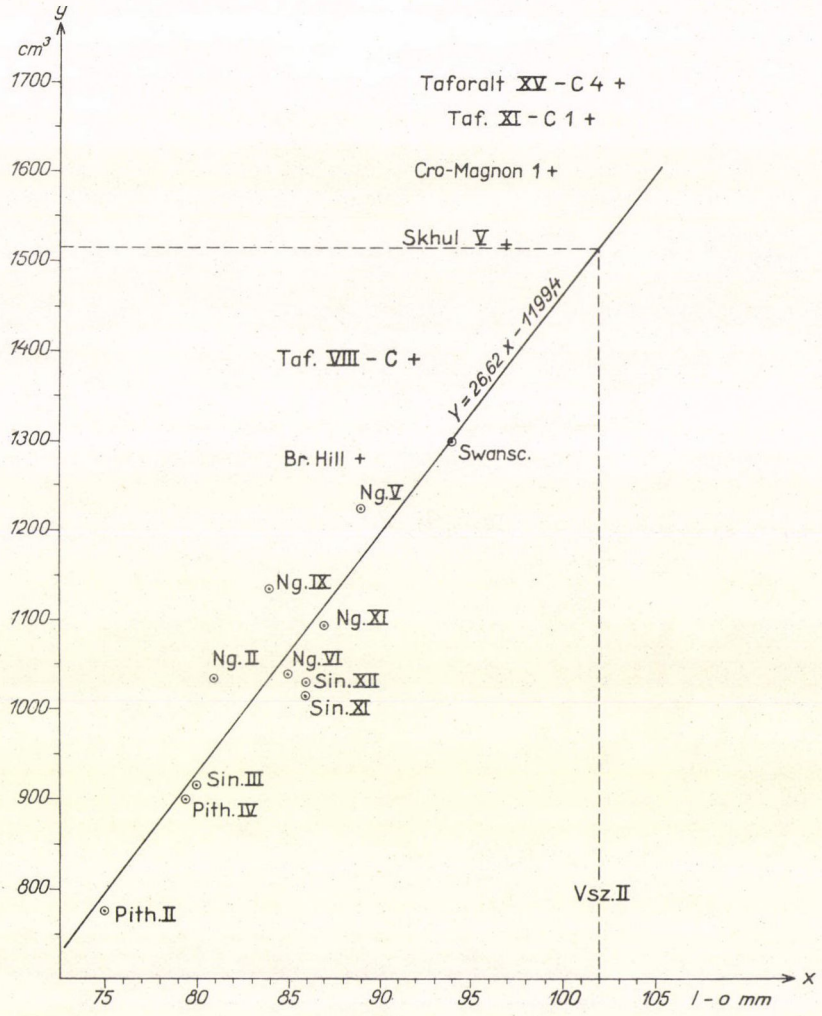
Morfogenezis és cerebralizáció. — A primitív euhominin nyakszirtcsont igen széles, és fejlett haránt-tarajt visel; a felsőpikkely rövid és lapos, míg a planum nuchale hosszú, és az általuk bezárt szög viszonylag hegyes; az inion egybeesik az opisthocranionnal (a koponya leghátsóbb pontja a glabellától mérve), míg a cerebro-cerebelláris határt jelző endinion (a prot. occ. int. csúcsa) mélyen az inion alatt helyezkedik el. Ezt az architekturális állapotot legszélsőségesebb módon a Pithecanthropus IV nyakszirtje képviseli. A további evolúció során a biasteriális szélesség lassan csökken, az egész csont fokozatosan megsüllyed és haránt-tengelye körüli „rotáción" megy át: az öreglyuk előre fordul, a pikkely csúcsa hátrafelé. E folyamattal párhuzamosan a pikkely két szegmentuma közötti szög kinyílik, és az egyre jobban domborodó felső-

pikkely kiterjed a planum nuchale rovására. Következésképpen az inion megsüllyed, és egyre jobban közeledik az endinion nívójához, míg az opisthocranion áthelyeződik a felsőpikkelyre. A fossa cerebellarisok területe megnő, s ennek következtében az endinion helyzete felfelé tolódik. Közben a torus redukálódik. E transzformációk eredményezik azt is, hogy a modern koponyán a nyakszirtcsont abszolute és relative kisebb területet foglal el, mint az archaikuson. Ez az egész, jól ismert folyamat az agy filogenetikai növekedésének következménye. Hogy a vértesszőllősi nyakszirtcsont morfogenezisének kulcsát megtaláljuk, meg kell tehát becsülnünk a koponya térfogatát, amelyhez tartozott.

A becslési eljárást az 5. ábra szemlélteti. 11 olyan fosszilis koponya áll rendelkezésünkre, amelynek falvastagsága és biasteriális szélessége — Vértesszőllős II-höz hasonlóan — nagy: a Pithecanthropusok, Sinanthropusok, a Swanscombe-i és Ngandong-i koponyák (az ábrán eredményponttal jelölve). A Neandertáliak sajátságos „kontyos" nyakszirtjük miatt kizárandók a számításból. A Hominidáknál a koponyakapacitásra legbiztosabban a magassági dimenziókból, az adott esetben tehát a nyakszirti húrból (l—o), következtethetünk. A diagram bemutatja a legkisebb négyzetek módszerével a pontnyalábhoz illesztett egyenest, amely a nyakszirtmagasságnak a koponyakapacitásra való regresszióját ábrázolja. Az elvégzett statisztikai tesztek szerint, a kis esetszám ellenére mind a korreláció, mind a regresszió 0,1%-ra szignifikáns, és nem mutat jelentős eltérést a linearitás 0-hipotézisétől. Ha a kapott regresszió-egyenletbe Vértesszőllős II 102 mm-es nyakszirti húr-értékét behelyettesítjük, 1516 cm^3-es koponyakapacitást kapunk. Ez az érték meglepően magas! Figyelembe véve azonban a becslés hibáját ($s_Y = 60{,}9$), a valódi koponyakapacitás 95%-os valószínűséggel nem lehetett *alacsonyabb* 1405 cm^3-nél. Az ábrán jól látható, hogy a becslés extrapoláción alapszik. Jelenthet-e ez hibaforrást? A regresszió a mért értékpárok határai között lineáris, de mivel ezek abszcisszái vonalméreteket, ordinátái térfogatokat jelentenek, lehetséges, hogy az egyenes a felső határon túl felfelé kanyarodik. Ez azonban azt jelenti, hogy a lineáris extrapolációval a vértesszőllősi koponya kapacitását csak alábecsülhettük, de túl nem. Ellenőrzésképpen bejelöltem az ábrán néhány fosszilis Neanthropus és a Broken Hill-i, modernül magas homlokagyú Palaeanthropus értékeit. Az ezeket ábrázoló keresztek szorosan zárkóznak saját regressziós egyenesükhöz, amely magasabb helyzetű és meredekebb, mint a becsléshez használt archaikus koponyák regressziós egyenese. Nyilvánvaló tehát, hogy az extrapolációs becslés nem modernizálta mesterségesen a vértesszőllősi ember koponyaalkatát.

Ha maximális óvatossággal *a koponyakapacitás becslésének végeredményeként a következő megállapításra szorítkozunk: Vértesszőllős II* > 1400 cm^3, ez még mindig azt jelenti, hogy fosszíliánk ebben a lényeges tulajdonságában nem különbözött a mai embertől, akinek átlaga mintegy 1450 cm^3, igen széles

variációval. Ez az eredmény egyrészt megerősíti a nemi diagnózist, másrészt megoldást kínál a primitív agystruktúra és jó kulturális adaptáció ellentmondására. A vértesszőllősi ember cortexének viszonylagos símasága az agytömeg



5. ábra. Primitív euhominin koponyák kapacitásának (y) regressziója a nyakszirti húrra (x) A +-el jelölt neanthropikus értékek az egyenes illesztésénél nem vétettek figyelembe. Vértesszőllős II koponyaűrtartalmának becslését szaggatott vonal jelzi

megnövekedésével kompenzálódott, következésképpen a felszín, s ezzel a neuronok száma mégis emelkedett. A cm^3-ekben való többlet a kortárs Archanthropusokkal szemben igen tetemes. CONNOLLY (1950) szerint, a főemlősöknél az agy filogenetikai növekedését törvényszerűen kíséri felszínének redőződése; úgy látszik, ez utóbbi még nem következett be a vértesszőllősi embernél. Mind-

ezen jelenségek csak egy *hirtelen* cerebralizációs folyamatból eredményeződhetnek. E folyamat egyébként teljesen indokolt. A kőipar afrikai eredetre utal, s a mindeli eljegesedés körülményeihez való alkalmazkodás feltétlenül a bevándorló populációra nehezedő, igen erős szelekciós nyomással járt. A hirtelen cerebralizáció viszont egyedül lehetséges és elegendő magyarázattal szolgál a vértesszőllősi nyakszirtcsont morfogenezisére. Összes sajátosságai a primitív állapotot mutatják, kivéve a túlnőtt felsőpikkelyt. A csontnak nem volt ideje (filogenetikai értelemben), hogy az agytömeg brutális megnövekedésére komplex architekturális hozzáilleszkedéssel reagáljon, s csak a felsőpikkely megnyújtásának kényszermegoldása maradt számára hátra.

Hogy a vértesszőllősi emberen a felsőpikkely kiterjeszkedése a nyakszirt rotációja nélkül ment végbe, azt két további megfigyelés is igazolja. — 1. Ha az iniont az endocranialis felszínre vetítjük, az 25 mm-rel az endinion fölött helyezkedik el. A recens embernél ez a távolság ± 0, a Pithecanthropus II-nél pont 25, a Sinanthropus variációjának terjedelme 27,5—38, a Ngandong-i koponyáké 21—38, a Neandertáliaké 10—24, Ehringsdorfon 18, Swanscombeon 15 mm. A vértesszőllősi csonton tehát az inion és endinion egymás felé való vándorlása még nem indulhatott meg. — 2. Fossziliánkon a torus occipitalis magassága a középvonalban, alapjától a sulcus supratoralisig 38 mm. E dimenzió összehasonlítása: Pithecanthropus II 16,5, Pithecanthropus IV 19,3, Sinanthropus 17,4—20,4, Ngandong 15,4—19, Neandertáliak 4—6 mm. Eszerint a vértesszőllősi emberen a torus magassága a felsőpikkely húrjával (l—i) arányosan múlja felül a többi primitív Hominidáét. A felső torushatár passzívan követte a felsőpikkely kiterjeszkedését, hasonlóan ahhoz, mint amikor egy gumilemezre krétával vonást jelölünk, majd arra merőlegesen a lemez egyik szélének közepét meghúzzuk. Nyilvánvaló, hogy csak egyetlen, szagittális grádiens mentén következett be túlnövekedés (vö. D'Arcy Thompson, 1961), éspedig vertikális irányban és a nyakszirtstruktúra komplex átrendeződése nélkül.

A metrikus konfiguráció viszonylagos helyzete. — A IV. táblázat több fosszilis nyakszirtcsontnak a recens referencia-sorozattól való többváltozós távolságait tartalmazza, a legkevésbé korrelált méretek alapján. Mivel az egyes leletek között nagy cerebralizációs különbségek mutatkoznak, Penrose (1954) statisztikájának alkalmazása mutatkozott célszerűnek, amely szétválasztja az általánosított távolság nagyság- és forma-komponenseit. Az összehasonlításból világosan megmutatkozik a vértesszőllősi nyakszirtcsont viszonylagos formai modernsége: formabeli disztanciája a primitív Neanthropusokéhoz csatlakozik. A „kevésbé valószínű extrém értékek" behelyettesítése még jobban modernizálja a csontot. Ám a hatalmas nagyságbeli disztancia (Vértesszőllős II javára) markánsan elválasztja a recens nyakszirttől. Azonos koponyakapacitás mellett ez a primitivitás jele; a pikkely általánosan nagy kiterjedése speciális morfogenezisének nyilvánvaló következménye.

A vértesszőllősi ember leszármazási kapcsolatai és helye a Hominidák rendszerében

Az új lelet lehetőséget nyújt arra, hogy tovább finomítsuk a fogmaradványokból levont filogenetikai és taxonomiai következtetéseket. Óvatosság azonban most is ajánlatos, mivel *töredékes* és *egyedi* fossziliák összehasonlítására vagyunk utalva. Ez a körülmény a jelleg-komplexekkel dolgozó, többváltozós statisztika használatát írja elő. Az V. táblázaton megadom a számbajöhető

V. táblázat

Fosszilis nyakszirtcsontok négyváltozós* távolságai a vértesszőllősitől, növekvő formabeli sorrendben

Disztancia	formabeli	nagyságbeli
Vértesszőllős II — Skhul V	0,003	0,94
Vértesszőllős II — Swanscombe	0,17	1,91
Vértesszőllős II — Chancelade	0,51	2,89
Vértesszőllős II — Taforalt (M)	1,58	1,19
Vértesszőllős II — La Chapelle	1,60	2,22
Vértesszőllős II — Sinanthropus XII	1,82	4,33
Vértesszőllős II — Pithecanthropus IV	7,50	2,64
Vsz. II extr. — Skhul V	0,10	1,48
Vsz. II extr. — Swanscombe	0,39	2,67
Vsz. II extr. — Chancelade	0,52	3,78
Vsz. II extr. — Taforalt (M)	1,15	1,80
Vsz. II extr. — La Chapelle	1,55	3,03
Vsz. II extr. — Sinanthropus XII	2,38	5,43
Vsz. II extr. — Pithecanthropus IV	8,93	3,50

* ast-ast, l—o, l—i és i—o húrok.

fossziliáknak most már Vértesszőllős II-től való nagyság- és formabeli disztanciáit. A kérdés természeténél fogva a forma a döntő kritérium; egyébként az összehasonlított nyakszirtcsontok közül a vértesszőllősi a legnagyobb. A táblázat alsó részén behelyettesítettem az utóbbinak „kevésbé valószínű extrém értékeit". Megállapítható, hogy a kétféle módon kapott disztanciák azonos döntésekhez vezetnek. Ezért elegendő a táblázat felső részét figyelembe venni. — A levonható következtetéseknek bizonyos mértékig *provizórikus* jelleget kölcsönöz az a körülmény, hogy fontos leletekkel (Mauer-i állkapocs, Atlanthropus, *Homo habilis)* nem tudjuk összevetni fossziliánkat, homológ csontmaradványok vagy részletes leírás híján. Annyi mindenesetre kétségtelen, hogy a vértesszőllősi ember koponyakapacitása több mint kétszerese a *H. habilis*-énak (lásd: Tobias, 1964). — A lelet értékelése három, elvileg és módszertanilag élesen különböző szempont szerint történik.

1. A *függőleges leszármazási vonalakon* (phylon) való összeköttetéseket a teljes morfológiai mintázat segítségével kell keresnünk. — a) *Lefelé* ez bizonyosnak látszik. A leíró-morfológiai és metrikus elemzés egyértelműen arra

utal, hogy a vértesszőllősi ember nem távoli, közös gyökérrel ered a klasszikus Archanthropusokkal: a Sinanthropus és társaival. Bizonyos valószínűséggel a közös ősformát is megjelölhetjük. Ez csak az a „robusztus Archanthropus" lehet, amely Kínában (Lantian), Jáván (Djetis) és Keletafrikában (Olduvai, „Bed II" alsó része) időben megelőzi a klasszikus Archanthropusokat. Megerősíti ezt a leszármaztatási elképzelést az a nagyfokú csökkenés, amit a Sinanthropus és Pithecanthropusnak Vértesszőllős II-től való formabeli disztanciái mutatnak (V. táblázat), ugyanezen fossziliáknak a recens emberétől mért megfelelő távolságaihoz (IV. táblázat) képest. — b) *Felfelé* a vértesszőllősi ember leszármazottainak sorából mindenekelőtt ki kell zárnunk más kontinensek ősemberi leleteit, továbbá a Steinheim-i és Saccopastore-i koponyákat. Az utóbb említett leletek 1100—1200 cm^3-es koponyakapacitása az evolúciós decerebralizáció valószínűtlen folyamatát involválná. A Saccopastore-típust tekintik a nagyagyú, klasszikus Neandertáliak (az V. táblázaton La Chapelle képviseli őket) ősének, s így ez utóbbiak is kiválnak a lehetséges leszármazottak sorából. Az utolsó interglaciális két lelete — Ehringsdorf és Gánovce — töredékes, és az adott szempontból nem informatív. Egy leletcsoport marad csak fenn — amelybe progresszív Palaeanthropus-formákat sorolhatunk — és amelynek egy vértesszőllősi típusú populációból való leszármazása valószínűnek látszik. A mindel-Riss interglaciális végére datált Swanscombe-i koponya nyakszirtje feltűnő és speciális morfológiai megfeleléseket mutatott Vértesszőllős II-vel. Metrikus konfigurációja formailag igen közel áll a vértesszőllősihez, nagysága koponyakapacitásával ($\geqslant$ 1300 cm^3) arányosan kisebb. Ez utóbbi differencia értékelésénél figyelembe veendő azonban, hogy a Sinanthropus férfikoponyái 200 cm^3-es terjedelemben variáltak, de egyáltalán nincs kizárva, hogy a Swanscombe-i koponya nőhöz tartozott, s így az eltérést a nemi dimorfizmus is indokolná. A Riss-Würm interglaciálisra datált Fontéchevade-i koponyatető (Vallois, 1958) esetében mindössze három támpontunk van: koponyakapacitás mintegy 1470 cm^3, biasteriális szélesség 126 mm, a sulcus sinus transversi nem érinti a falcsontot. Ezek az adatok megegyeznek a vértesszőllősiekkel. A Verona közelében talált Quinzano-i nyakszirt-töredék (Battaglia, 1948), amely valószínűleg egykorú az előbb említett fossziliával (Oakley, 1964), anatómiailag teljesen modern. Metrikus jellegeiben azonban megismétli Vértesszőllős II rendkívüli kombinációját: tekintélyes vastagság, nagy biasteriális szélesség, igen hosszú felsőpikkely-húr (lásd I. és III. táblázat). A még modernebb formák közül az ó-würmi Skhul V és a késő-würmi Chancelade nyakszirtjeitől való minimális, illetve csekély formai disztanciái ugyancsak a vértesszőllősi ember progresszív evolúciós tendenciáit tanúsítják. Ezek a tendenciák azonban csak viszonylagosak: az ó-holocén Neanthropussal (Taforalt) való összehasonlításból már nem tűnnek ki. Vértesszőllős II az utóbbitól formailag ugyanolyan mértékben különbözik, mint a klasszikus Neandertálitól.

2. A *horizontális evolúciós szintet* a progresszív átalakulásnak alávetett jellegek átlagos evolúciós foka határozza meg. Egy ilyen adott átlag a szabadon társuló archaikus és modern jellegeknek teljesen különböző kombinációjából jöhet létre — ami összeegyeztethetetlen lenne a phylon vagy a taxon fogalmával. Vértesszőllős II anatomiailag teljesen, vastagságában és egyéb metrikus jellegeinek jórészében archanthropikus. Az ettől az állapottól való eltérései mindössze egy tényezőre, agyának nagyságára vezethetők vissza. A humánpaleontológia általános megállapodása a túlcerebralizált klasszikus Neandertáliakat a Palaeanthropus szintjébe helyezi. Ezzel analóg módon, a vértesszőllősi embert ismert tulajdonságainak átlagos evolúciós foka alapján Archanthropusnak kell tekintenünk, terjedelmes agya ellenére. Ugyanerre az eredményre vezetett Vértesszőllős I fogainak vizsgálata is (THOMA, 1966).

3. A *rendszertani besorolásnál* az egyes jellegek meghatározó értéke különböző. A Hominidáknál a koponya kapacitását tekintik döntő taxonómiai kritériumnak. Fosszilis formák rendszertani helye függ még az osztályozó által elfogadott törzsfa-sémától is. Jelenleg alternative használatos egy retikuláris és egy radiációs séma. Ha az (Eu)Homininae evolúcióját az Archanthropus-szinttől mindmáig teljesen hálószerűnek fogjuk fel, akkor jogosulttá válik a Wartenstein-i symposionon kidolgozott rendszer (WASHBURN, 1963), amely ezen az alcsaládon belül csak az egyetlen *Homo* nemet és ennek két faját: *erectus* és *sapiens*, fogadja el érvényesnek. Az előbbi ún. palaeospecies, amely kontinuusan átmegy az utóbbiba. Közöttük a faji határt COON (1962) után 1250—1300 cm^3-es koponyakapacitásnál húzzák meg (ennek megfelelően a kutatók többsége ma már a klasszikus Neandertáliakat is *sapiens*-alfajnak tekinti). Ebben a rendszerben a vértesszőllősi ember a *sapiens*-határon belül esik. — Ha viszont az Archanthropus, Palaeanthropus és Neanthropus szintjein több, párhuzamos phylon-t vezetünk végig, amelyeknek némelyike teljesen izolált, akkor a *sapiens*-faj határát lefelé ki kell terjesztenünk e vertikális ágak találkozásáig, tehát a „robusztus Archanthropus"-ig (THOMA, 1962; HEMMER, 1964). Ez alatt már csak a *H. habilis*nek van esélye a palaeospecies rangjára (TOBIAS, 1966). Az adott törzsfa-sémában ez az osztályozás formálisan következik abból a tényből, hogy a recens Neanthropus bár politipikus, de egyetlen faj. Így a hozzá vezető vertikális politipia is szükségképpen intraspecifikus. Ebben a sémában a vértesszőllősi ember fajilag automatikusan *sapiens;* morfológiai elkülönülése feltétlenül alfaji mérvű. Tekintve azonban a koponyakapacitás becsült voltát, az elméleti koncepció egyediségét és újabb leletek előkerülésének lehetőségét, csak lazább rendszertani meghatározást adok neki: *Homo (erectus* seu *sapiens) palaeohungaricus* n. ssp.

Összefoglalás és konklúziók

A jelen tanulmány a Mindel-kori Vértesszőllős II ember nyakszirtcsontleletét ismerteti. Kóros elváltozásokat nem mutat, minden valószínűség szerint 30 éven aluli férfihez tartozott. A szerző a *Homo (erectus* seu *sapiens) palaeohungaricus* n. ssp. provizórikus taxon típusának tekinti. Diagnózis: vastagfalú, igen széles, kúp alakú nyakszirtpikkely, „rotáció" jelei nélkül, osztatlan, igen magas és lapos torus occipitalis transversussal; összes anatómiai részletei és metrikus jellegeinek jórésze archanthropikusak, de a pikkely felső szegmentuma modernül nagy és görbült; primitív struktúrájú, de 1400 cm^3-nél nagyobb agy.

A vértesszőllősi nyakszirtcsont morfogenezisét hirtelen cerebralizáció szabályozta. A morfológiai-biometriai összehasonlító elemzés arra a következtetésre vezet, hogy ez az emberi forma az Archanthropus rétegén belül differenciálódott el, és időben felfelé leginkább a korai-progresszív Swanscombe-i koponyával mutat affinitásokat. Az új lelet megerősíti a Vértesszőllős I egyén fogmaradványainak meghatározását (THOMA, 1966) és az ezekből levont, az emberi evolúció általános menetére vonatkozó következtetéseket.

IRODALOM*

1. BATTAGLIA, R.: Osso occipitale umano rinvenuto nel giacimento pleistocenico di Quinzano nel comune di Verona. Palaeontographia italica, **42**, Mem. 2., pp. 31 (1948)
2. CONNOLLY, C. J.: External Morphology of the Primate Brain. Thomas, Springfield, (1950)
3. COON, C. S.: The Origin of Races. Knopf, New York, (1962)
4. D'ARCY THOMPSON, W.: On Growth and Form. Cambridge, at the University Press, (1961)
5. HEMMER, H.: Über allometrische Beziehungen zwischen Hirnschädelkapazität und Hirnschädelwölbung im Genus Homo. Homo, **15**, 218—224 (1964)
6. KRETZOI M.—VÉRTES L.: A vértesszőllősi alsópaleolit telep. MTA Társ.-Tört. Oszt. Köz. XIII., 421—428 (1964)
7. OAKLEY, K. P.: Frameworks for Dating Fossil Man. Weidenfeld and Nicolson, London, (1964)
8. OVEY, C. D. ed.: The Swanscombe Skull. Roy. Anthrop. Inst., London, (1964)
9. PENROSE, L. S.: Distance, Size and Shape. Ann. Eug., **18**, 337—343 (1954)
10. PIVETEAU, J.: Primates, Paléontologie humaine. Traité de Paléontologie, T. VII. Masson, Paris, (1957)
11. THOMA A.: A *Homo Sapiens* kibontakozása. Le déploiement évolutif de l'*Homo sapiens*. Anthropologia Hungarica, **5**, 1—179 (1962)
12. THOMA A.: Az Előember fogmaradványai a vértesszőllősi őstelepről. MTA Biol. Oszt. Köz. sajtó alatt.
13. TOBIAS, P. V.: The Olduvai Bed I Hominine with special Reference to its Cranial Capacity. Nature, **202**, 3—4 (1964)
14. TOBIAS, P. V.: The Distinctiveness of *Homo habilis*. Nature, **209**, 953—957 (1966)
15. TWIESSELMANN, F.: Méthode pour l'évaluation de l'épaisseur des parois crâniennes. Bull. Musée Roy. d'Hist. Nat. de Belgique, **17**, 1—33 (1941)
16. VALLOIS, H. V.: La Grotte de Fontéchevade. II. Anthropologie. Masson, Paris, (1958)
17. VÉRTES L.: Jelentés a vértesszőllősi őstelep újabb ásatásairól. MTA Társ.-Tört. Oszt. Köz. **XV.**, 111—114 (1966)
18. WASHBURN, S. L. ed.: Classification and Human Evolution. Aldine, Chicago, (1963)
19. WEIDENREICH, F.: The Torus occipitalis and Related Structures and their Transformations in the Course of Human Evolution. Bull. Geol. Soc. China, **19**, 479—559 (1940)
20. WEINER, J. S.—CAMPBELL, B. G.: The Taxonomic Status of the Swanscombe Skull. In [8], 175—209
21. YULE, G. U.—KENDALL, M. G.: An Introduction to the Theory of Statistics. 14th Ed. Griffin, London, (1950)

* Csak a folyó szövegben hivatkozott címek. A teljes bibliográfiát a végleges publikációban közlöm.

BAKTÉRIUMOK RENDSZEREZÉSE SZÁMÍTÓGÉPPEL

PINTÉR MIKLÓS

Megyei Kórház Központi Laboratóriuma, Gyula

A baktériumok rendszerezésére irányuló törekvések egyidősek magával a bakteriológiával. Annak ellenére azonban, hogy a baktériumokra vonatkozó ismereteink évről évre gyors ütemben gyarapodnak, távol állunk attól, hogy kielégítő baktérium rendszertannal rendelkezzünk. Ennek oka elsősorban az, hogy azok az elvek és módszerek, amelyek jól beváltak a magasabbrendű szervezetek osztályozásában, csak igen korlátozottan alkalmazhatók a mikrobák világában. Nem szükséges a baktérium rendszerezés hatalmas irodalmának a részletes tanulmányozása annak megállapításához, hogy még az alapelvek tekintetében is heterogén a kutatók állásfoglalása. Elegendő csak az élőlények rendszerezésének egységére, a speciesre utalni, mely a baktériumok esetében közel sem olyan könnyen meghatározható fogalom, mint a többsejtűeknél. A species határai mindkét irányba, a genus és típus felé egyaránt bizonytalanok, amint azt a salmonellák antigéntípusaival kapcsolatos viták vagy a pseudomonas fajok rendszertanonként jelentősen eltérő száma mutatja. Ennek következtében természetes, hogy a magasabb egységek (genus, familia) határai méginkább eltérőek az egyes felosztásokban. Az elmúlt száz esztendő során kidolgozott számos rendszertan eltérései elsősorban azt mutatják, hogy a baktériumokkal kapcsolatos adatok jellege és a vizsgálati módszerek fejlődése döntő hatással volt a rendszerezésre. Kezdetben a morfológiai tulajdonságok játszották a fő szerepet, majd a biokémiai jelenségek szolgáltatták a legbőségesebb információt. Az antigénszerkezet részletes analízise (streptococcus, salmonellák) jelentette a következő lépést. A legutóbbi évek is hoztak újabb eredményeket, mivel a baktériumsejtből kivont DNS bázisösszetételének vizsgálata nagyon jó alapot szolgáltat a rendszerezéshez is. Több kísérlet történt a filogenezis elvének az alkalmazására is. Míg azonban az evolúció a magasabbrendű szervezetek rendszerezésének reális vezérfonalát jelenti, a baktériumok esetében egyelőre csak feltevéseket tesz lehetővé. A többsejtűeknél az őslénytani leletek ugyanis objektív alapot nyújtanak a filogenetikus felosztáshoz, ugyanakkor a baktériumoknál ilyen természetű adatokkal alig rendelkezik a tudomány.

Többekben felvetődött már a kérdés, hogy egyáltalán szükség van-e a baktériumok rendszertanára. Ha e kérdésre kizárólag gyakorlati szempontból adjuk meg a választ, akkor is igennel kell válaszolni. Rendszertan nélkül ugyanis nem képzelhető el egységes nomenklatúra, ez pedig nélkülözhetetlen a tudományos információk kicseréléséhez. A gyakorló bakteriológus sokszor éppen a nomenklatúrán keresztül tapasztalja a tisztázatlan rendszertani helyzetet. Elegendő csupán olyan gyakran előforduló baktériumok változó elnevezéseire utalnunk, mint a staphylococcusok vagy a *Klebsiella-Aerobacter* csoport. A rendszertan nélkülözhetetlen alapja az identifikálásnak is, mivel az itt leírt taxonómiai egységek szolgáltatják a mintát a vizsgálandó baktériummal való összehasonlításhoz. A jelenleg használatos rendszertanok, pl. a Bergey-féle kézikönyv, a fenti céloknak csak korlátozottan felelnek meg. Mi az oka lényegében, hogy a régi és új rendszertanok egyaránt képtelenek a tudományos és gyakorlati igényeket teljesen kielégíteni? A magyarázat elsősorban abban keresendő, hogy minden eddigi rendszertan ún. speciális, mesterséges rendszer. Ez azt jelenti, hogy valamilyen speciális célból vagy speciális módszerrel készült. A cél legtöbbször az volt, hogy a rendszertan a baktériumok felismerését lehetővé tegye, vagyis diagnosztikus célokat szolgált. Tipikus példája ennek a Bergey-féle rendszertan, mely címével is jelzi, hogy határozó könyvnek készült. Az ilyen jellegű munkák módszertani alapja a baktériumok tulajdonságainak bizonyos hierarchikus beosztása. Ezek szerint adott nagyobb csoporton belül bizonyos tulajdonságoknak kulcsszerepük van az egyes taxonómiai kategóriákba való besorolásnál. Kezdetben a tapasztalatok, később az egzakt megfigyelések azt mutatták, hogy ezek a „kulcs" tulajdonságok gyakran csődöt mondanak és téves identifikáláshoz vezetnek. Pl. a laktózt fermentáló képesség, ill. e képesség hiánya ma már közel sem jelent olyan értékű adatot, mint néhány évtizeddel ezelőtt; számos enzimreakció és antigénszerkezeti adat az episomok ismerete óta veszített rendszertani súlyából. A baktériumok változékonyságát, a környezeti hatások nagy szerepét a vizsgáló módszerek hibalehetőségeit ismerve valóban irreálisnak látszik a legtöbb tulajdonság kulcsszereppel történő felruházása. Az identifikálásban természetesen nélkülözhetetlen a tulajdonságok fontosságának és gyakoriságának ismerete, a rendszerezés során viszont helytelen lehet kizárólag erre támaszkodni.

A rendszerezés fentebb igen vázlatosan ismertetett problémái új utak keresését tették szükségessé. Jelentős lépés fűződik ezen a területen SNEATH (1957) nevéhez, aki egy XVIII. században élt francia botanikus, Adanson módszerét és elvét alkalmazta baktériumok rendszerezésénél. Az Adanson-elv lényege az, hogy az élőlényeket tulajdonságaik hasonlósága alapján kell csoportosítani, anélkül, hogy bármely tulajdonságnak *a priori* nagyobb súlyt adnánk. Nyilvánvaló, hogy a módszer hatásfoka elsősorban a vizsgált tulajdonságok számától függ, és mivel bármely élőlényről igen nagy számú adat gyűjthető, ezek statisztikai értékelése a legújabb időkig alig volt lehetséges.

Ez a magyarázata annak, hogy Adanson módszerének tudományos súlyú alkalmazását az elektronikus számítógépek tették lehetővé. SNEATH úttörő tevékenysége, amikor egy kétszáz éves gondolatot a legújabb technikával párosított, rövid néhány év alatt iskolát teremtett és ma már jelentős irodalma és komoly eredményei vannak a numerikus vagy elektro-taxonómiának, ahogyan ezt az új tudományágat elnevezték.

Az Adanson-elv alkalmazásával felépített rendszer „természetes" rendszernek tekinthető, szemben az előzőekben említett „mesterséges" rendszerekkel. E természetes rendszertan legfontosabb jellegzetességei az alábbiakban foglalhatók össze:

a) A rendszertan alapját a lehető legnagyobb számú információ képezi. A baktériumok esetében ezen információk legnagyobb részükben a fenotípusra vonatkoznak, mivel jelenleg a genotípust érintő adatok csak korlátozottan nyerhetők. A fenotípusra vonatkozó adatok számának a növelése azonban arányosan teljesebb képet ad a genotípusról.

b) A vizsgált tulajdonságok az értékelés során egyenlő súlyt képviselnek. E feltétel a módszer legfontosabb követelménye, holott látszólag ellentmond a mindennapos tapasztalatnak. Az ellentmondás valóban csak látszólagos, mivel a tulajdonságok különböző „súlya" és „értéke" az analízis során reálisabb és objektívebb módon nyilvánul meg, mint bármely eddigi rendszerezési eljárásnál. A lényeges különbség az eddigiekkel szemben az, hogy a tulajdonságok jelentősége csak a rendszerezés elvégzése után, *a posteriori* állapítható meg. Ezért az így szerzett információk csak az identifikálás során hasznosíthatók és nem a rendszerezésben. Ebből következik, hogy a rendszerezés és az identifikálás elveiben és módszereiben egymástól eltérő és elválasztandó művelet. SNEATH (1962) a tulajdonságok egyenlőségén alapuló rendszerezést „polythetikus" eljárásnak, a tulajdonságok hierarchiáján alapuló diagnosztikát „monothetikus" műveletnek nevezte.

c) A vizsgálandó egységek (baktériumtörzsek) egymáshoz való viszonyát és a további csoportosítás alapját az *általános hasonlóság* (overall similarity) matematikailag kifejezhető értéke képezi. Ez az érték a tulajdonságok funkciójának az eredménye. A hasonlítás és nem hasonlítás egyszerű alternatívája az analízis különböző fázisaiban, elsősorban a vizsgálatban szereplő baktériumoktól függően, rendkívül különböző értékű információkat szolgáltat és itt nyilvánul meg a tulajdonságok változó súlya. Pl. ha a vizsgálatban csak pálca alakú baktériumok szerepelnek, ennek a tulajdonságnak („pálca") az értéke minimális; ha azonban a vizsgálatban coccusok is részt vesznek, a „pálca" tulajdonság funkciója sokkal értékesebbé válik. Az egyes tulajdonságok szerepe az általános hasonlóság értékének kialakításában hálás területe a matematikai és statisztikai analízisnek. Különösen a tulajdonságok korrelációinak vizsgálatától várhatunk további értékes eredményeket.

A numerikus taxonómia módszeréről

Az Adanson-elvet az élőlények legkülönbözőbb csoportjainak rendszerezésére fel lehet használni. Az alkalmazott módszerek alapelvei ugyan azonosak a biológia különböző területein, részleteikben azonban különleges feltételekkel járnak. A baktériumok rendszerezésénél figyelembe kell venni egyrészt a különleges biológiai sajátosságokat, másrészt megfelelő eljárásokat kell alkalmazni az összegyűjtött adatok kódolásánál, valamint a programozásnál. Az egész eljárás fontosabb lépései az alábbiakban foglalhatók össze:

1. Vizsgálandó taxonómiai egységek. Ez a fogalom gyakorlatilag legtöbbször baktériumtörzset jelent. A vizsgálandó törzsek száma a tervezett feladattól függ elsősorban. Célszerű, ha a vizsgálandó csoportokat minél több törzs képviseli. A törzsek kiválasztásánál két szempont érvényesítése hasznos. Egyrészt ajánlatos a vizsgálatba típustörzseket bevonni. Ezeket a törzseket, melyek részletes leírása a szakirodalomban megtalálható, a nagy nemzeti vagy nemzetközi gyűjtemények őrzik. Kizárólag ilyen törzsek vizsgálata azonban nem ad reális képet, mivel a mesterséges környezet több éves vagy évtizedes hatása módosítólag hathat bizonyos tulajdonságokra. Szükséges ezért a természetes környezetből, élőlényekből, betegekből izolált ún. „vad" törzsek felhasználása is.

2. Tulajdonságok. A legfontosabb követelmény, hogy minél nagyobb számú tulajdonságot vizsgáljunk. Legalább 40—50 tulajdonság megfigyelése szükséges, az idevágó közlemények azonban többnyire 60—100 tulajdonság vizsgálatáról számolnak be. A kiválasztott tulajdonságok minél szélesebb skálát képviseljenek. A morfológiai, tenyésztési, táplálkozási, biokémiai tulajdonságokon kívül egyesek újabban a baktériumsejt, ill. egyes részeinek kémiai összetételére, fizikai és kémiai tulajdonságaira vonatkozó adatokat is szerepeltetnek. Olyan tulajdonságokat, melyek nyilvánvalóan következnek egy másikból, nem kell alkalmazni.

3. Kódolás. A kódolás célja a kísérleti eredmények transzponálása egy olyan jelrendszerre, mely alkalmas a matematikai műveletekre. A számítógép programjának elkészítése a legegyszerűbb abban az esetben, ha csak 2 jelet használunk. Bizonyos esetekben valóban elegendő lehet 2 jel (+ vagy —, ill. 0 vagy 1) annak kifejezésére, hogy egy tulajdonság jelen van-e vagy hiányzik. Gyakran előfordul azonban, különösen, ha a vizsgált baktériumok heterogén csoportot képviselnek, hogy sem +, sem a — jel nem alkalmazható. Pl. egy nem-spórás baktériumnál a spóra elhelyezkedésére, méretére vonatkozó kérdéseknek nincs értelmük. Ilyenkor egy harmadik jelet kell alkalmazni, mely olyan utasítást tartalmaz, hogy ezt a jelet és a vele összehasonlításra kerülő bármelyik jelet a számításból ki kell hagyni. Ebben az esetben azonban a gép számára az utasítások már csak kettős jelekkel (pl. 00, 01, 11) közölhetők.

A kódolás során a legtöbb megfontolást a részekre bontott tulajdonságok jelölése jelenti. Gyakori eset, hogy a megfigyelt jelenség (pl. növekedés inhibitorok jelenlétében, tenyésztési hőmérséklet, hőrezisztencia, enzimaktivitás stb.) az egyes baktériumtörzseknél különböző fokozatokat mutat és célszerűtlen lenne ezeket az ún. másodlagos adatokat figyelmen kívül hagyni. Ezeknek az adatoknak a kódolása különleges megfontolást kíván, mivel helytelen eljárásnál előfordulhat, hogy egyes tulajdonságok nagyobb súlyt kapnak a kelleténél. Az alábbiakban egy 4 fokozatra bontott tulajdonság 3 különböző kódolási módszerét mutatjuk be:

	I			II			III			
Negatív	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
Gyengén pozitív	+	−	−	+	−	−	0	+	−	−
Mérsékelten pozitív ...	+	+	−	0	+	−	0	0	+	−
Erősen pozitív	+	+	+	0	0	+	0	0	0	+

Az első változatot additív módszernek nevezik. Ebben az esetben minden tulajdonság-tartománynak (tulajdonság-fokozatnak) külön helyértéke van. Ennek következtében a részekre bontott tulajdonságok nagyobb súllyal szerepelnek a számításban, mint az osztatlanok. Előnye viszont, hogy a kvantitatív különbségeket árnyaltabban fejezi ki, mint a következő módszerek.

A második változat a törlési jellel kiküszöböli a redundánsnak tekinthető jeleket, így a számításba csak egy összehasonlítás kerül. A mennyiségi különbségek fokozatai azonban elvesznek.

A harmadik változat a negativitást azonos értékűként kezeli a pozitív fokozatokkal. E módszer kidolgozói (Beer és Lockhart, 1962) azzal indokolják eljárásukat, hogy célszerűtlen a negatív és pozitív választ élesen elválasztani, mivel ez sokszor csak a kísérleti technika következménye. Különösen áll ez az antibiotikumok és egyéb inhibitorok hatására, mely nemcsak a tesztbaktériumtól, hanem a koncentrációtól is függ. Lockhart és Hartman (1963) módszerük legújabb változatában a törlési jelet teljesen elhagyják és helyette 4 jelből (A, B, C, D) álló rendszert használnak. A programozás ezáltal egyszerűbbé vált, ugyanakkor bármely tulajdonságot 4 tartományra lehet felosztani anélkül, hogy ez túlsúlyt jelentene az osztott tulajdonságok javára. A tulajdonság hiánya (negativitása) minden esetben külön jelet kap. Hasonlóság csak akkor állapítható meg, ha a vizsgálandó baktériumpárnál a 2 betűszimbólum megegyezik. A 4 betűszimbólumot kettős jelekkel lehet (00, 01, 10, 11) a gép számára érthetővé tenni.

A különböző kódolási módszerekkel nyert eredmények általában lényegbevágó eltérést nem mutatnak, a másodlagos adatok fehasználása és megfelelő kódolása azonban növeli a csoporton belüli és csökkenti a csoportok közötti hasonlóságot.

4. A hasonlóság kiszámítása. E munkaszakasz során a táblázatba foglalt és kódolt adatok alapján minden, a vizsgálatban szereplő baktérium összehasonlításra kerül mindegyikkel. Ezt a műveletet a megfelelő program alapján a számítógép végzi. A program alapjául a következő hasonlósági formulák használhatók:

a) Hasonlósági index (similarity coefficient, SNEATH, 1957):

$$S = \frac{n_s}{n_s + n_d},$$

ahol n_s jelenti a megegyező tulajdonságok számát, n_d a különböző tulajdonságok számát. Az n_s csak a megegyező pozitív tulajdonságokat jelenti, egyező negatív tulajdonságok nem kerülnek számításra. Ennek az elgondolásnak az az alapja, hogy egy tulajdonság kölcsönös hiánya nem jelenthet hasonlóságot, mivel az ilyen jellegű tulajdonságok száma elméletileg végtelen.

b) Affinitási index, „M" (matching coefficient, SOKAL és MICHENER, 1958). Ez az arányszám annyiban különbözik a fentitől („S"), hogy kiszámításánál a megegyező negatív tulajdonságokat (tulajdonságok hiányát) is figyelembe veszik. E módszer mellett szintén számos érv hozható fel. Egyes esetekben (pl. antibiotikumokkal szembeni ellenállás, ill. érzékenység) önkényes annak eldöntése, hogy melyik tulajdonságot jelöljük + ill. — jellel. A pozitív és negatív válasz közötti határvonal sem mindig éles, mivel az alkalmazott módszertől is függhet. Fontos érv az affinitási index használata mellett az is, hogy a számításoknál a képlet nevezője állandóan ugyanaz, míg az „S" értéknél páronként változó és ezzel együtt kismértékben változik a kapott értékek szignifikanciája is.

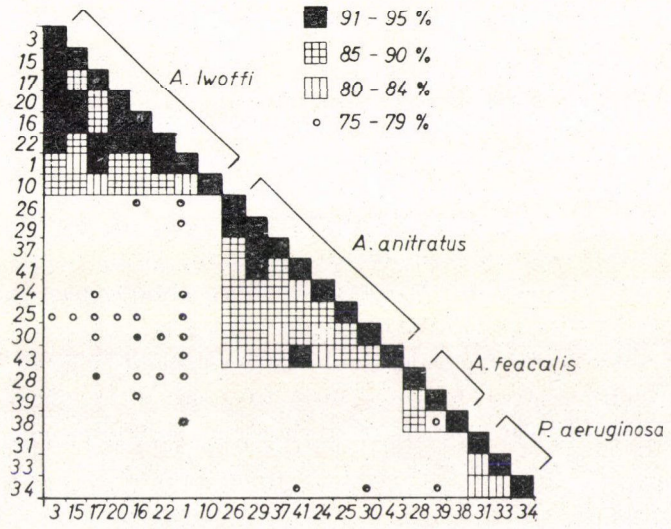
c) Különbözőségi index (distance value, ROGERS és TANIMOTO, 1960):

$$D = -\log_2 M.$$

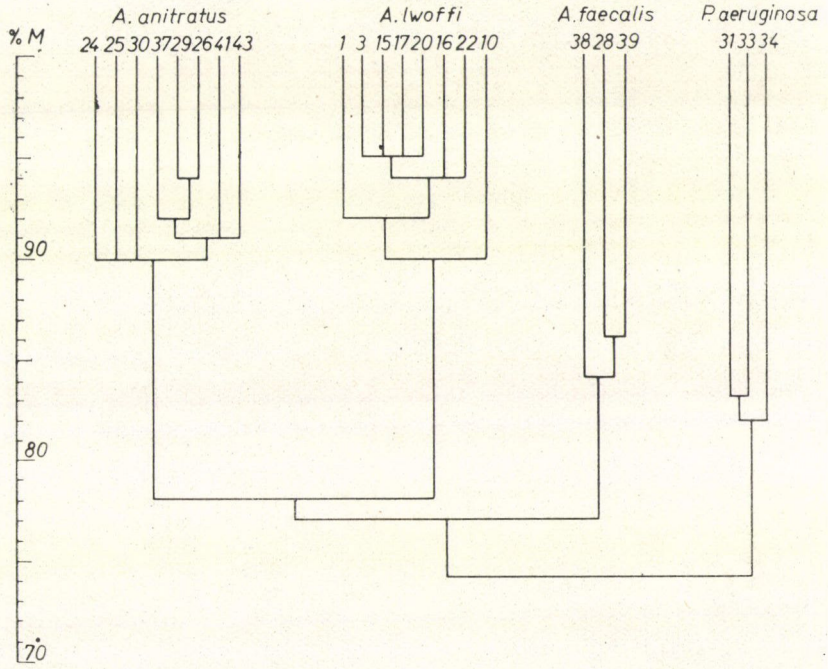
Az affinitási index értékeinek átszámítása a fenti képlet szerint lényeges változást nem eredményez. Előnye abban foglalható össze, hogy a kis eltérések kevésbé jelentkeznek a magasabb *M*-értékek (0,80—0,99) átszámításánál, mint az alacsonyabb (0,50 körüli) értékeknél. Ennek következtében az egymáshoz közel álló törzsek különbözősége csökken, a kevésbé hasonlók különbözősége növekszik, vagyis a csoportok homogénebbé válnak, viszont egymástól jobban elkülönülnek.

5. Csoportanalízis. A hasonlósági értékek (*S*, *M* vagy *D*) kiszámítása után, ezek alapján történik a törzsek csoportokba rendezése. A csoportok kialakítására általában az alábbi két programot szokták alkalmazni:

a) Legmagasabb kapcsolódás (highest link) módszere. A vizsgáló kiválasztja a legmagasabb hasonlóságot mutató baktériumpárt: a megfelelő prog-



1. ábra. Háromszögdiagram (hasonlósági matrix) különböző Gram-negatív nem-fermentáló baktériumok általános hasonlóságának feltüntetésére. A számok a baktériumtörzsek sorszámai. A diagram alapjául szolgáló számításokat az MTA Számítástechnikai Központja végezte



2. ábra. Az 1. ábra alapját képező adatok ábrázolása dendrogram alakjában. A diagramból leolvasható az egyes törzsek és csoportok kapcsolódása a legnagyobb hasonlóság alapján

ram alapján a gép megkeresi azt a törzset, mely az előző kettő bármelyikével szemben a legmagasabb hasonlóságot mutatja, az így kialakult hármas csoporthoz a bármelyikkel szemben mutatott legnagyobb hasonlóság alapján a gép megkeresi a negyediket, s. i. t. Amennyiben több csoport szerepel a vizsgálatban — és legtöbbször ez a helyzet — minden csoport vezető párjával kezdődően el kell a sorrendet készíteni. Így ki lehet alakítani az egymástól elkülönülő csoportokat és meg lehet állapítani kapcsolódási szintjüket.

b) Átlagos hasonlóság módszere (variable group method, SOKAL és MICHENER, 1958). E módszer elve hasonló az előzőéhez, de pontosabb sorrendet állapít meg. A kiválasztott magpárhoz a program alapján a gép azt a törzset választja ki, mely a legmagasabb átlagos hasonlóságot mutatja az első kettővel szemben. A továbbiakban ugyenezt a műveletet végzi el a növekvő csoporthoz viszonyítva minden törzzsel és így állapítja meg a sorrendet. A programozás ebben az esetben természetesen bonyolultabb, mint az előző módszernél.

A fenti módszereken kívül kidolgoztak néhány, az említetteknél sokkal bonyolultabb eljárást is. Ezeknek azonban már bakteriológiai szempontból különösebb jelentőségük nincs.

6. Grafikus ábrázolás. A csoportanalízis nélkülözhetetlen befejező lépése a grafikus ábrázolás. Enélkül ugyanis szinte lehetetlen a törzsek egymáshoz való viszonyát áttekinteni. Az ábrázolásnak két általánosan elterjedt formájával találkozunk.

a) A háromszögdiagram (similarity matrix) a hasonlósági értékeket tartalmazó háromszög-táblázat grafikus megfelelője (1. ábra). Az 5-százalékonként csoportokba foglalt *S*-, ill. *M*-értékeket fokozatosan csökkenő árnyékoltságú jelekkel ábrázoljuk. A homogén csoportok a diagramban háromszöget képeznek.

b) *Dendrogram.* A háromszögdiagramból megközelítő pontossággal leolvasható bármely két törzs kölcsönös hasonlóságának értéke. A dendrogram ezzel szemben a törzsek kapcsolódásának szintjét, tehát a legmagasabb hasonlósági értékeket tünteti fel (2. ábra). A csoportok itt is jól láthatók, a csoportok közötti összefüggések azonban sokkal szemléletesebben jelentkeznek, mint a háromszögdiagramban. A dendrogram lényegében a taxonomikus hierarchia grafikus ábrázolása.

A numerikus taxonómia eddigi eredményeiről

Az eddig közölt vizsgálatok között csak néhány olyan jellegűt találunk, mely nagyobb számú species analízise segítségével választ igyekszik adni arra a kérdésre, hogy a jelenleg használatos rendszertanok mennyiben állják meg a helyüket. SNEATH és COWAN, (1958), LISTON és munkatársai (1963), FOCHT

és LOCKHART (1965) vizsgálatai egyaránt azt mutatják, hogy a jelenleg használatos rendszertani kategóriák nagy része (tribus, familia, ordo, classis) mesterséges konstrukció és nagyon csekély természetes alappal rendelkeznek. A speciesek és a genusok általában jellegzetesen szétválnak, ill. a numerikus analízis során olyan csoportok képződnek, melyek leginkább ennek a két kategóriának felelnek meg. Azok a törekvések, hogy a speciest és a genust egy bizonyos hasonlósági értékkel és szinttel lehessen jellemezni, csak részben jártak eredménnyel, mivel az alkalmazott bakteriológiai és számítási módszerek nagymértékben befolyásolják a kapott szinteket akkor is, ha maguk a csoportok állandó jelleggel szétválnak. Ezért egyes esetekben egy új rendszertani fogalmat, a *phenon*-t használják a numerikus analízissel kapott csoportok jelölésére, megadva azt a hasonlósági szintet, melynél az adott csoport végződik (pl. 65%-phenon, 75%-phenon, stb). Az adatok és tapasztalatok nagy része azt mutatja, hogy a specieshatár leggyakrabban a 75—80%-os *S*-, ill. *M*-értéknél van. Addig azonban, míg az alkalmazott bakteriológiai és statisztikai módszerek nincsenek teljesen standardizálva, nem várható, hogy az egyes rendszertani kategóriákat pontos számszerű határokkal el lehessen választani.

Bőségesebb adatokat találunk a különböző baktériumcsoportok természetes rendszertani helyzetével kapcsolatban. Egyhangú megállapítás, hogy a Gram-negatív baktériumok között a bélbaktériumok természetes csoportot képeznek. Az *Escherichia, Salmonella, Serratia, Shigella* és *Erwinia* genusok jól elkülöníthetők egymástól, a *Proteus* hasonlósága azonban lényegesebb alacsonyabb, a numerikus analízis alapján nem látszik bélbaktériumnak (FOCHT és LOCKHART, 1965, LOCKHART és KOENIG, 1965).

Minden bizonnyal a pseudomonasok sokat vitatott rendszerezése az oka annak, hogy e baktériumok numerikus analízisével számos közlemény foglalkozik (COLWELL és LISTON, 1961, RHODES, 1961, LISTON és munkatársai, 1963, PFISTER és BURKHOLDER, 1965). Három vagy négy csoport minden esetben elkülöníthető szélesebb skálájú vizsgálatok során. Az 1. csoportot tengeri eredetű (marin) pseudomonasok alkotják, a 2. csoport tipikus képviselője a *P. fragi*, a 3. csoportot a pigmenttermelő törzsek képezik. E csoport típusspeciese a *P. fluorescens*, a *P. aeruginosa* törzsek alcsoportot képeznek. E pigmenttermelő csoporton belül élesen szétválnak a psychrophil és mesophil törzsek. A 4. csoportba pigmentnélküli, mesophil törzsek tartoznak, tipikus képviselőjük a *P. ovalis*. A fenti csoportokon belül a különböző rendszerezések által speciesként elfogadott egységek elkülönítése sok esetben nem lehetséges.

Az aeromonasokról régóta ismeretes, hogy közti helyzetet foglalnak el az enterobaktériumok és a pseudomonasok között. A numerikus analízis igazolta ezt a helyzetet és megállapította, hogy a gáztermelő speciesek a bélbaktériumokhoz, az anaerogének a pseudomonasokhoz állanak közelebb (COLWELL és LISTON, 1961).

A *Vibrio* genus önállósága igen kétessé vált a numerikus analízis során. Az általános hasonlóság alapján az aeromonasok és pseudomonasok között állanak. A fermentatív speciesek az aeromonashoz állanak közel *(V. comma)*, az oxydatív fajok *(V. percolans, V. cuneatus)* viszont már nem különíthetők el a pseudomonasoktól.

A pozitív és negatív oxydase-reakciót mutató *Pasteurella* speciesek az Adanson-analízis során is élesen szétválnak (SMITH és THAL, 1965). Az oxydase-pozitív csoportba tartozik a *P. multocida* és *P. haemolytica*, a negatív csoportba a *P. pseudotuberculosis* és a *P. pestis*. Az utóbbiak igen közel állanak a bélbaktériumokhoz.

Igen bizonytalan a rendszertani helyzet azok között a Gram-negatív, glukózt nem fermentáló baktériumok között, melyek nem tartoznak a pseudomonasok közé. Az *Alcaligenes, Achromobacter, Moraxella, Flavobacterium* és más elnevezések alatt szereplő genusok tartoznak ebbe a csoportba. A numerikus analízist megnehezíti, hogy ezen baktériumok nagy része biokémiailag inaktív, a használatos biokémiai próbák többsége negatív eredményt ad. Ezért a szélesebb skálájú vizsgálatok során ezek a baktériumok egy csoportba kerülnek, elkülönülve az előzőekben említett Gram-negatív baktériumoktól. A tulajdonságok megfelelő kiválogatásával ezen baktériumokat is el lehet egymástól különíteni. Klinikai anyagokból izolált emberi eredetű törzseket a numerikus analízis három csoportra osztotta, melyek megfelelnek az *Achromobacter (Acinetobacter) lwoffii, Achromobacter (Acinetobacter) anitratus* és *Alcaligenes faecalis* specieseknek (PINTÉR és BENDE, (1967). Ugyanez a vizsgálat nagyfokú hasonlóságot állapított meg az *A. faecalis* és *Bordetella bronchiseptica* között, alátámasztva azt a javaslatot (STEEL és COWAN, 1964), hogy az utóbbi baktériumot az *Alcaligenes* genusba kell helyezni.

A Gram-pozitív baktériumok minden analízis során teljesen elkülönülnek a Gram-negatívoktól. Közülük legrészletesebben a staphylococcusokat tanulmányozták (HILL és munkatársai, 1965). Ezek szerint a következő csoportokra oszthatók: 1. *S. aureus*, 2. *S. epidermidis*, 3. *Micrococcus roseus*, 4. *S. afermentans, M. luteus, Sarcina flava*, 5. *S. lactis*.

A corynebaktériumokkal kapcsolatban elsősorban az a megfigyelés érdemel említést, hogy a *C. diphtheriae* nagymértékben különbözik a többi corynebaktériumtól, szinte önálló helyzetet foglal el a Gram-pozitív baktériumok között (NIGEL da SILVA és HOLT, 1965). A *Bacillus* genus, melynek szeparált helyzete kétségtelen, 2 alcsoportra osztható (SNEATH, 1962).

A fentieken kívül számos más baktériummal és gombával végezték el a számítógépes analízist. Ezek eredményeiről összefoglaló képet kaphat az olvasó SNEATH (1964) referátumában.

Az utóbbi évek hatalmas eredményei a baktériumgenetika területén nem maradtak hatástalanok a rendszerezési törekvésekre sem. Elsősorban a baktérium-DNA guanin-cytozintartalmának százalékos értéke az a viszonylag

könnyen megállapítható adat, mely a rendszertani viszonyokat is sok esetben tükrözi. Ugyancsak taxonómiai viszonyokra utalnak a baktériumok hibridizációjával kapcsolatos eredmények és az episomokkal történő génátvitel adatai. A genotípusra vonatkozó ezen adatok, valamint a numerikus analízis során vizsgálatra kerülő fenotípusos tulajdonságok összehasonlítása számos szerző vizsgálatai nyomán azt mutatja, hogy az eredmények nagyfokú párhuzamosságot mutatnak (COLWELL és MANDEL, 1964, 1965, SILVESTRI és HILL, 1965). Ez azzal a nyilvánvaló ténnyel magyarázható, hogy a fenotípusra vonatkozó nagyszámú adatnak viszonylag hűen kell a genotípust tükröznie.

A fenotípusos variáció a baktériumok identifikálásának állandóan jelenlevő hibaforrása. A környezeti tényezők (tenyésztési körülmények, táptalaj, hőmérséklet, pH stb.) ugyanis a leggondosabb technika mellett is csak egy bizonyos határig standardizálhatók. LISTON és munkatársai (1963) azt tanulmányozták különböző pseudomonas speciesek esetében, hogy a miliő változtatása milyen hatással van a szubkultúrák hasonlóságára. A változatos körülmények között tartott törzsek hasonlósága önmagukkal szemben általában 95% körüli érték volt. Az egyes tulajdonságok stabilitását statisztikai módszerekkel elemezve bevezették az ún. Medián Organizmus fogalmát, mely egy-egy species esetében a statisztikailag legvalószínűbb, számításokkal konstruált törzs. Az a törzs, mely ehhez az elméleti törzshöz legközelebb áll, elsősorban alkalmas a típustörzs szerepére.

Következtetések

A természetes, numerikus rendszerezési eljárások végleges kritikájának és értékelésének az ideje még nem érkezett el. Számos elvi és gyakorlati probléma tisztázására van még szükség. A legtöbb vita kétségkívül a tulajdonságok „súlya" és „értéke" körül zajlik. Nem nehéz feladat az idevágó munkák egy részében mind a tulajdonságok megválasztását, mind a kódolást illetően támadható, esetleg szubjektív pontokat felfedezni. Egyes szerzők munkáiban túlzott súlyt képviselnek a baktériumok méretére, alakjára vonatkozó adatok. LEIFSON (1966) joggal bírálja ezeket a közleményeket, bár valószínű, hogy a csillókra vonatkozó adatok (csillók száma, hullámhossza, amplitúdója) általa hangsúlyozott fontosságát egyesek szintén túlzottnak tartják. A biokémiai jellegű adatok numerikus feldolgozása már kevesebb szubjektív tényező érvényre jutását teszi lehetővé, viszont a tulajdonságok súlya körül sok vitára nyílik alkalom. STANIER és munkatársai (1966) legutóbb a pseudomonasok rendszerezését kísérelték meg nagyszámú organikus vegyület egyedüli szénforrásként történt felhasználása segítségével. Bár az adatok száma alapján kézenfekvő lett volna a gépi feldolgozás, nem alkalmazták, mivel az egyes anyagok felhasználásának különböző jelentőséget tulajdonítottak. Ha figyelembe vesz-

szük, hogy különböző organikus vegyületeknek a sejtanyagcserébe történő bevonásához más-más számú enzimre van szükség, indokoltnak látszana a tulajdonság súlyát az igénybevett enzimek száma alapján mérlegelni. Egyelőre azonban a megfelelő biokémiai adatok csak hézagosan állanak rendelkezésünkre és a tulajdonságok ilyen értelmű, reálisabbnak tekinthető mérlegelése csak a teljes biokémiai feltérképezés után válik lehetővé.

A statisztikai módszerek, elsősorban a hasonlósági indexek kiválasztása szintén befolyásolhatja az eredményt és ezért szubjektív tényezőként szerepelhet. Bár az esetek nagy részében az egyes indexek nem mutatnak lényeges eltérést ugyanazon kísérleti anyag értékelésénél, magasabbfokú statisztikai eljárások, logikai és valószínűségszámítási műveletek bevezetésével fokozni lehetne a módszer megbízhatóságát. Erre különben a többsejtű élőlények egyes csoportjainál, a fenetikus és filogenetikus rendszerezés összehangolásánál több példát lehet találni (SOKAL és SNEATH, 1963).

Bár még számos elvi és gyakorlati kérdés nyitottnak tekinthető a numerikus taxonómia területén, annyit már megállapíthatunk, hogy az új módszertől gazdag ismeretanyagot várhatunk. Az eddigi tapasztalatok alapján e módszer perspektíváját a baktériumok rendszerezése és identifikálása területén a következőkben foglalhatjuk össze.

1. A gépi rendszerezés az eddigieknél sokkal nagyobb információmennyiséggel dolgozik és objektívebb módszereket használ. Ezért alkalmas arra, hogy a régebbi rendszertanok tradicionális és szubjektív ellentmondásaira rámutasson. A baktériumrendszertani kategóriák, elsősorban a species és genus dinamikus szemléletének helyességét a természetes rendszerezési eljárás objektív adatokkal támasztja alá. Azt a törekvést, hogy a taxonómiai egységek, elsősorban a speciesek indokolatlanul magas számát redukálni kell, a gépi eljárás teljesen igazolja.

2. Az Adanson-féle eljárás kiterjedt alkalmazása során számos olyan tulajdonság került megfigyelésre, melyek eddig alig szerepeltek a leírásokban. A sok tulajdonság és nagyszámú adat részletes statisztikai feldolgozása nyomán olyan identifikálási „kulcsok" szerkeszthetők, melyek pontossága felülmúlja a jelenleg használatosakat. Nagyszámú baktériumtörzs feldolgozása nyomán várható, hogy az identifikálási kulcsok pontosságát és a kapott diagnózis helyességét matematikailag ki lehessen fejezni. A távolabbi jövőben nem lehetetlen a gépi identifikálás megvalósítása sem. Ennek legfontosabb előfeltétele a bakteriológiai módszerek egységesítése és megbízhatóságuk fokozása. Jelenleg ugyanis a tenyésztési eljárások és biokémiai próbák számtalan változata nagymértékben befolyásolja az eredményt és a gépi identifikálást eleve illuzórikussá teszi. A diagnosztikai tesztek egységesítése után azonban elképzelhető, hogy bizonyos kódszámok betáplálása és a memóriaegységben tárolt adatokkal történt összehasonlítása alapján a vizsgált baktérium rendszertani helyzetét meg lehet határozni és statisztikailag kifejezni.

IRODALOM

BEERS, R. J., LOCKHART, W. R.: Experimental methods in computer taxonomy. J. gen. Microbiol., **28,** 633 (1962)

COLWELL, R. R., LISTON, J.: Taxonomic relationship among the pseudomonads. J. Bacteriol., **82,** 1, (1961)

COLWELL, R. R., MANDEL, M.: Adansonian analysis and deoxyribonucleic acid base composition of some Gram-negative bacteria. J. Bacteriol., **87,** 1412 (1964)

COLWELL, R. R., MANDEL, M.: Adansonian analysis and deoxyribonucleic acid base composition of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol., **89,** 454 (1965)

FOCHT, D. D., LOCKHART, W. R.: Numerical survey of some bacterial taxa. J. Bacteriol., **90,** 1314 (1965)

HILL, L. R., SILVESTRI, L. G., IHM, P., FARCHI, G., LANCIANI, P.: Automatic classification of staphylococci by principal-component analysis and a gradient method. J. Bacteriol., **89,** 1393 (1965)

LEIFSON, E.: Bacterial taxonomy: a critique. Bact. Rev.: **30,** 257 (1966)

LISTON, J., WIEBE, W., COLWELL, R. R.: Quantitative approach to the study of bacterial species. J. Bacteriol., **85,** 1061 (1963)

LOCKHART, W. R., HARTMAN, P. A.: Formation of monothetic groups in quantitative bacterial taxonomy. J. Bacteriol., **85,** 68 (1963)

LOCKHART, W. R., KOENIG, K.: Use of secondary data in numerical taxonomy of the genus Erwinia. J. Bacteriol., **90,** 1638 (1965)

NIGEL DA SILVA, G. A., HOLT, J. G.: Numerical taxonomy of certain coryneform bacteria. J. Bacteriol., **90,** 921 (1965)

PFISTER, R. M., BORKHOLDER, P. R.: Numerical taxonomy of some bacteria isolated from antarctic and tropical seawaters. J. Bacteriol., **90,** 863 (1965)

PINTÉR, M., BENDE, I.: Computer analysis of *Acinetobacter lwoffii (Moraxella lwoffi)* and *Acinetobacter anitratus (Moraxella glucidolytica)* strains. J. gen. Microbiol., **46,** 267 (1967)

RHODES, M. E.: The characterization of *Pseudomonas fluorescens* with the aid of an electronic computer. J. gen. Microbiol., **25,** 331 (1961)

ROGERS, D. J., TANIMOTO, T. T.: A computer programme for classifying plants. Science, **132,** 1115 (1960)

SILVESTRI, L. G., HILL, L. R.: Agreement between deoxyribonucleic acid base composition and taxometric classification of Gram-positive cocci. J. Bacteriol., **90,** 136 (1965)

SMITH, J. E., THAL, E.: A taxonomic study of the genus *Pasteurella* using a numerical technique. Acta path. microbiol. Scand., **64,** 213 (1965)

SNEATH, P. H. A.: The application of computers to taxonomy. J. gen. Microbiol., **17,** 201 (1957)

SNEATH, P. H. A., COWAN, S. T.: An electro-taxonomic survey of bacteria. J. gen. Microbiol., **19,** 551, (1958)

SNEATH, P. H. A.: The construction of taxonomic groups. Symp. Soc. Gen. Microbiol., **12,** 289, (1962)

SNEATH, P. H. A.: New approaches to bacterial taxonomy: use of computers. Ann. Rev. Microbiol., **18,** 335 (1964)

SOKAL, R. R., MICHENER, C. D.: A statistical method for evaluating systemathic relationships. Kans. Univ. Sci. Bull., **38,** 1409 (1958)

SOKAL, R. R., SNEATH, P. H. A.: Principles of numerical taxonomy. W. H. Freeman, San Francisco, (1963)

STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J., DOUDOROFF, M.: The aerobic pseudomonas: a taxonomic study. J. gen. Microbiol., **43,** 159 (1966)

STEEL, K. J., COWAN, S. T.: Le rattachement de *Bacterium anitratum, Moraxella lwoffi, Bacillus mallei* et *Haemophilus para*pertussis au genre *Acinetobacter* Brisou et Prévot. Ann. Inst. Pasteur, **106,** 479 (1964)

A MOLEKULÁRIS GENETIKA KUTATÁSAINAK FŐ IRÁNYZATAI

ALIKHANIAN SZ. I.

Kurcsátov Atomenergiai Intézet, Moszkva

A jelenkori biológiában lejátszódó forradalmi változások sokat köszönhetnek a mikroorganizmusokkal végzett genetikai kutatásoknak. A biológia forradalmi változásainak lényege az alapvető biológiai funkciók kutatásának molekuláris szintre való kiterjesztésében rejlik. A molekuláris biológiai kutatásokban a genetika központi helyet foglal el.

A molekuláris genetika megoldott kardinális problémáinak egyike a genetikai információ reprodukálása. A genetikai információ pontos reprodukciójának molekuláris mechanizmusa hosszú ideig rejtély volt. Világos volt, hogy a gén pontos másolása problémájának megoldása a gén kémiai természetének, molekuláris szerkezetének felderítését követően kell hogy bekövetkezzen. Szinte maga a feladat — a „gén kémizmusának", molekuláris szerkezetének tisztázása — diktálta azokat az utakat, amelyeken a kutatásokat végezni kell. Sokan azt tartották, hogy a kémia az a tudomány, amely hivatott arra, hogy a gén kémiai természetének titkait felfedje. Úgy vélték, hogy amiképpen az öröklődés kromoszomális elmélete megállapította a genetikai információ és a kromoszómák — gének — kapcsolatát, úgy a kémia fogja majd megoldani a gén önreprodukciójának, a pontos lemintázódás mechanizmusának problémáját.

Valóban, citokémiai, biokémiai és kémiai kutatásokkal sikerült is a kromoszómák kémiai természetét megállapítani. A kromoszóma nukleinsavak és fehérjék bonyolult képződményének bizonyult, amelyben a fehérjék nagy részét hisztonok, azaz bázikus proteinek képezik. Ez utóbbiak funkciója feltehetően a savanyú DNS-molekulák negatív töltésének semlegesítése. Szinte mindenki hajlamos volt azt hinni, hogy a gén fehérje természetű, mivel csak a 20-féle aminósavból álló és ezek végtelen kombinálódási lehetőségével bíró fehérje biztosíthatja az élőlények számtalan bélyegét és tulajdonságát kontroláló gének változatosságát.

1943-ig sokan azt hitték, hogy éppen a hisztonok maguk a genetikai információ hordozói, de a hisztonok teljes hiánya sok baktériumban súlyos érvként szolgált a fehérjék genetikai funkciója ellen. Csak kevesen tételezték fel, hogy genetikai szubsztrátumként a nukleinsavak szerepelhetnek, amelyek az élőszervezetek különböző fajainak képviselőinél nem sokban különböztek

egymástól, arról nem is beszélve, hogy ugyanazon faj genetikailag különböző formái nem mutattak észrevehető különbséget a nukleinsavak összetételében. És mégsem a kémia oldotta meg ezt a problémát.

Bármennyire paradoxként hat is, a genetikai szubsztrátum természetének meghatározása tisztán genetikai kísérletekből eredt. Ma már széltében ismeretesek Ávery, McLeod és McCarty kísérletei, akik baktériumokkal mutatták ki, hogy a genetikai információ hordozója a dezoxiribonukleinsav. Ez a felfedezés nagyon fontos lépést jelentett a genetika fejlődésében és valószínűleg nem túlozunk, ha azt állítjuk, hogy éppen ez a munka jelenti a molekuláris genetika fejlődésének kezdetét.

A DNS specifikus funkciójának felfedezése meggyorsította és lehetővé tette a DNS makromolekuláris szerkezetének megfogalmazását. Az irodalomban igen gyakran szokták azt állítani, hogy Watson és Crick a DNS makromolekuláris szerkezetének modelljét „Chargaff kémiai adatainak, valamint Franklin és Wilkins röntgendiffrakciós módszerrel végzett kutatásainak általánosítására alapozták" (1). Igazságosabb volna, ha azt mondanánk, hogy a DNS-szerkezet modelljének megszerkesztését a fiziko-kémia mellett a genetika fejlődésének eredményei készítették elő. Azok nélkül az adatok nélkül, amelyeket genetikai és citogenetikai kutatások halmoztak fel az öröklődés kromoszomális elméletének kialakulása során, nem lehetett volna megalkotni a DNS mai modelljét. Ezekhez az adatokhoz tartozik elsősorban a gének pontos kontinuitása a sejtek egymást követő nemzedékeiben, illetve annak a szilárd törvénynek a megállapítása, hogy minden gén magához hasonló gént hoz létre.

Ugyanakkor kétségtelen, hogy az örökletes információ pontos reprodukálásának molekuláris mechanizmusa a Watson—Crick-féle DNS-modell megszerkesztése nyomán tisztázódott. A DNS szerkezetének alapját képező komplementaritási elv teljes összhangban van a gének önreprodukciójának genetikai elképzeléseivel.

Ily módon a mikroorganizmusokkal végzett genetikai és biokémiai kutatások lehetővé tették a genetika egyik legalapvetőbb problémájának — az önreprodukció mechanizmusának — felderítését.

Mi a gének reduplikációjának, önreprodukciójuknak az alapja? Mi a gének keletkezésének kémiai mechanizmusa? A DNS enzimatikus szintézise (melyet Kornberg fedezett fel) tulajdonképpen a gének reduplikációs mechanizmusának megfejtését jelenti. Ha a transzformálási kísérletek bebizonyították, hogy a gén DNS-ből áll, akkor Kornberg volt az, aki a DNS szintézisének mechanizmusát tisztázta. Ő bizonyította ugyanis, hogy a polimeráz hatására képződő DNS nukleotidjainak sorrendjét a rendszerhez adott DNS-*primer* határozza meg.

A polimeráz viszonylagos aspecificitásának tanulmányozása baktériumoknak páros számú T-fágokkal való fertőzése esetén azt illusztrálja, hogy a DNS specifikus összetételét a DNS-*primer* specifikus összetétele, valamint az a tény határozza meg, hogy a sejt enzimapparátusa csak olyan bázisok

(dezoxinukleozid-trifoszfátok) képződését valósítja meg, amelyek normálisan a DNS-ben részt vesznek.

A Kornberg-féle kísérletek értéke abban rejlik, hogy tisztázták a DNS specifikus molekulák keletkezésének mechanizmusát, amely nélkülözhetetlen a gének aktív specifikus anyagának pontos másolásához.

Az utóbbi években jelentős sikereket értek el a DNS replikációjának *in vivo* tanulmányozásában a baktériumokkal. Kimutatták, hogy a bakteriális kromoszóma, fág és episzoma a replikáció egyetlen rendszerét — a *replikont* alkotják. A replikáció a kromoszóma egy meghatározott pontján kezdődik és végigmegy a kromoszóma teljes hosszában (2). Felfedezték olyan polipeptid-komponensek létezését, amelyek a replikáció megindításához szükségesek, valamint olyan mechanizmusokat, amelyek a növekedési sebesség függvényében a genetikai anyag szintézisét reculálják (3, 4).

Ezt a problémát jelenleg számosan igen intenzíven tanulmányozzák (például JACOB, PRITCHARD és LARK). Az eddig felhalmozódott kísérleti adatok lehetővé tették, hogy JACOB olyan genetikai rendszer modelljét állítsa fel, amely a DNS-replikáció folyamatát regulálja (1). A modell két genetikai egység létezését tételezi fel; a *strukturális gént*, ami a diffúzióra képes *iniciátor* szintézisét határozza meg, az iniciátor viszont a második genetikai egységre — a replikáció *operátorára* hat. Az operátor „kapcsolja be" a replikáció folyamatát, amely a kör alakú struktúra mentén megy. Igaz, ez a séma sok vonatkozásban hipotetikus, mégis várható, hogy a legközelebbi években a genetikai anyag önreprodukciójának folyamatát szabályozó sejten belüli mechanizmusok problémája megoldódik. Ily módon mikroorganizmusokkal végzett kutatások megállapították a genetika kémiai alapjait, továbbá választ kapott a genetika fő kérdése — a gének kémiai szerkezetének és önmegújításának kérdése.

Napirenden van a gén-önmegújulás genetikai mechanizmusának végleges tisztázása. Jelenleg már tisztázott az a genetikai rendszer, mely regulálja a sejt élettevékenységének második alapfolyamatát — a transzkripciót, — vagyis specifikus fehérjék képződését meghatározott sebességgel. Néhány bakteriális és fág rendszerben kimutatták olyan regulációs elemek jelenlétét, amelyek lehetővé teszik a sejt számára, hogy az bármely időben — az igényeitől és a környezeti feltételektől függően — a genetikai információnak azt a részét válassza, amely a szükséges proteinek képződését eredményezi (például alkalikus foszfatáz *E. colinál*-ban).

Kimutatták, hogy a struktúr-gén (ill. leggyakrabban a struktúr-gének csoportjának) aktivitását, működését az operátor-gén ellenőrzi. Az operátor az általa ellenőrzött struktúr-gének csoportjával képezi transzkripció egységét — az *operont*. Az operon transzkripciója molekuláris szinten olyan polarizált folyamatot jelent, amely az operátornál kezdődik.

A baktériumokban a biokémiai reakciók egymás után következő lépéseit ellenőrző gének leggyakrabban egy operonban helyezkednek el. Néha azonban

kromoszomális átrendeződések miatt egyes gén-operonok a kromoszóma más helyére kerülhetnek — más operátorok ellenőrzése alá (az arginin szintézisének egymás után következő lépéseit ellenőrző 7 gén a kromoszóma 5 részében van).

A struktúr-gének mellett a genetikai anyag olyan részeket tartalmaz, amelyeket regulátor-géneknek hívnak. A regulátor-gének citoplazmatikus represszorokat szintetizálnak, amelyeknek meghatározott operátorokkal van rokonságuk. A represszornak az operátorhoz való kapcsolódása az egész operon transzkripciójának kezdetét blokkolja. A represszorok kismolekulájú anyagokkal — *effektorokkal* — reagálhatnak, ami a represszor inaktiválásához vezet. Ennek eredményeképpen az operon transzkripciója lehetővé válik. A represszió vagy indukció által az egy operonhoz tartozó struktúr-génekre gyakorolt hatás mindig mennyiségileg koordinált.

Azokban az esetekben, amikor egy reakciólánc enzimjeinek szintézisét meghatározó struktúr-gének a kromoszóma különböző szakaszaiban helyezkednek el, a represszor — valószínűleg — a hasonló szerkezettel rendelkező különböző operátorok egész sorára hat. Így előadódhat, hogy kvantitatív koordináció nem figyelhető meg. Ennek eredményeképpen ezeknek a géneknek az aktivitása megváltozhat (helyzet-effektus).

A transzkripció genetikai és kémiai mechanizmusának kiderítése lehetővé tette, hogy újszerűen közelítsük meg a *szupresszió* problémáját, azaz a mutáció következtében létrejövő zavarok regenerálásának mechanizmusát. Világossá vált, hogy a szupresszálás a transzkripció folyamatának bármely szakaszán megvalósulhat. A szupresszió ilyen sokfélesége a *back*-mutációknak az evolúcióban betöltött nagy szerepéről tanúskodik.

Ma már kísérleti adatok alapján állíthatjuk, hogy a szupresszió az alábbiak eredményeképpen valósulhat meg:

a) A bioszintézis folyamatának másik, kerülő útra történő átkapcsolása (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11);

b) Az enzim inaktiválásának meghatározott metabolitokkal való megakadályozása (a Neurosporában a td_{24} allél szupreszora (12);

c) A transzfer-RNS struktúrájának megváltozása (13);

d) Az aminósavaknak az RNS-hez való kapcsolódását biztosító enzimek specifikusságának megváltozásai.

A közvetlen mutáció következtében létrejött zavarok regenerációs útjainak ilyen változatossága felveti a *back*-mutációknak az evolúcióban betöltött jelentős szerepének kérdését (14, 15).

A DNS szerkezeti modelljének megszerkesztését követően Watson és Crick azt az egyedül lehetséges feltevést mondották ki, hogy a mutáció, azaz a szervezet örökletes „átállása", egy meghatározott fehérje szintéziséért felelős DNS-molekula-darab, (azaz a gén nukleotidszekvenciája) megváltozásának eredménye (mert végeredményben a gének nem mások, mint a DNS-molekula

meghatározott darabjai). Ennek folytán és a dolgok logikájából következőleg felmerült a gén finom szerkezetének problémája. Mint ismeretes, a gén kiterjedésének és oszthatóságának elvét már jóval a molekuláris genetika megszületése előtt kimondották, azonban annak kísérletes bizonyítását és az elemi genetikai részecske meghatározását a *Drosophilá*val végzett genetikai analízis feloldóképessége komplikálta.

Ennek a kardinális problémának a megoldásához, azaz annak a tételnek a bizonyításához, hogy a gént alkotó sok ezer nukleotid közül mindegyik meghatározott genetikai funkciót tölt be, baktériumokat és bakteriofágokat használtak. Ha elismerjük, hogy a gén a DNS-molekula egy darabja, akkor fel kell tételeznünk azt is, hogy a nukleotid-párok sorrendje az egész molekulában meghatározott.

Annak idején BENZER a T4 fág *r*II génje finom szerkezetének ma már klasszikusnak számító vizsgálataiban felvetette a genetikai rekombináció egységének — a *rekon*nak létezését. Feltételezték, hogy a rekon olyan elemi genetikai egység, amelynek meghatározott és a gén genetikai térképének teljes kiterjesztésében és a kromoszómában egyforma mérete van. Ezen az alapon számításokat végeztek, amelyek során a genetikai térkép rekombinációs egységeit a nukleotid-párokban kifejezett gén-méretre számították át. Az így kapott kielégítő egyezés a kiindulási feltevések közvetett bizonyítékául szolgált (16). Ezen adatok szerint a fág kromoszómáját 250 ezer nukleotid-párból és egyidejűleg 800 rekombinációs egységből állónak becsülték. Következésképpen egy rekombinációs egységre nagyjából 250 nukleotid-pár jut, és minthogy az *r*II gén 8 rekombinációs egységet jelent, így egy rekon 2000 nukleotid-párból áll. Milyen tehát a rekombináció által felosztott legkisebb gén-szakasz? BENZER adatai szerint ez 0,01% rekombinációs egységgel, azaz 2,5 nukleotid-párral egyenlő. A későbbi kutatások alapján azonban kételyek merültek fel az egész genetikai térképben teljesen meghatározott és egyforma rekon-méret reális létezését illetően. E hipotézis direkt (bár nem kielégítően teljes) ellenőrzése (Folsom 1965) nem igazolta a feltevés helyességét. TESSMANnak (17) nemrég (1965) sikerült egy módszert kidolgoznia a T4 fág *r*II szakaszában végzett mutáns keresztezésekre, melyek rekombinációs érzékenysége fokozott volt és elérte az 1×10^{-5} értéket. E módszer segítségével sikerült a korábbi feltevések szerint egy és ugyanabban a „hot spot"-ban elhelyezkedő mutánsokat több új egymás mellett elhelyezkedő „hot spot"-ra bontani. Sőt mi több, keresztezésekkor kifejezett inadditivitást találtak a valószínűleg szomszédos nukleotid-párokhoz tartozó *site*-ok közötti távolságokat illetően a térképen. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy az ultra finom genetikai szerkezet szintjén a rekombináció gyakorisága már nem függ a mutációs *site*-ok közötti valódi fizikai távolságtól, hanem vagy a keresztezésekben felhasznált markerek típusa, vagy a keresztezésbe vitt mutációs *site*-ok közötti nukleotid-szekvencia jellege határozza meg azt.

Nem mondhatjuk tehát, hogy az elemi genetikai egység egyszer és mindenkorra adott, egyforma mérettel rendelkezik, ami nem zárja ki azt, hogy a rekombinációk egy nukleotid-pár szintjén végbemehetnek.

A triptofánszintetáz *A* fehérjének szerkezeti károsodásait a DNS-ben bekövetkezett megfelelő genetikai károsodások genetikai analízisével párhuzamosan vizsgálva az *E. coli*ban, YANOFSKY kimutatta, hogy a genetikai rekombináció a DNS-*kodon* — elemi kodoló egység — keretein, azaz három nukleotidon belül megvalósulhat. Kiderült, hogy ugyanannak az aminósavnak, a glicinnek — az egyik esetben alaninra, a másik esetben pedig glutaminsavra történő kicserélődéséhez vezető két mutáció csak egy kodonhoz tartozó nekleotidok kicserélődésének az eredménye lehet. YANOFSKY és munkatársai (18) által leírt hasonló tények alapján helyesnek tekinthető TESSMAN állítása, mely szerint a rekombináció által megosztott legkisebb DNS-egység (a rekon) csak egy nukleotid-párral egyenlő. Következésképpen a genetikai analízis mai, molekuláris szintjén megállapíthatjuk, hogy az elemi genetikai egység egy nukleotid-pár.

A gén finom szerkezetének analízisében elért jelentős eredmények ellenére a *crossing-over* mechanizmusának megértésében haladt legkevésbé előre a genetika. Ez lehet azzal kapcsolatos, hogy Watson és Crick DNS-modellje nem kielégítő, vagy legalábbis nem ad semmiféle támpontot a rekombináció mechanizmusának magyarázatához, vagy pedig azzal, hogy az introgenikus *crossing-over* mechanizmusa egészen más, mint az intergenikus szinten lejátszódó *crossing-over* mechanizmusa. És valóban, eléggé nagy olyan tényanyag gyűlt össze, amely azt mutatja, hogy a génen belüli és a gének közötti *crossing-over* genetikai következményei lényegesen különböznek egymástól.

Itt az olyan jelenségekre gondolunk, mint a mutáció szerkezeti sajátosságainak hatása a rekombinációk gyakoriságára, a negatív interferencia, a reciprocitás hiánya a rekombináns utódokban stb. Ezek a jelenségek okozták, hogy a kutatók egyre inkább elégedetlenek a „mechanikus" *crossing-over* általánosan elfogadott hipotézisével, mely szerint a *crossing-over* a rekombinálódó kromoszóma-struktúrák szakadásainak és újrakapcsolódásainak eredménye. Bár a hipotézisnek alapos kísérletes bizonyítékai vannak, nincs kizárva, hogy a genetikai anyagnak a génen belüli rekombinációját a DNS replikációja is kíséri. A fág rekombinációja folyamán a DNS nem nagy, de teljesen megbízható szintézisének direkt bizonyítékát közölte egyik nem régi munkájában MESELSON (19). Ennek ellenére ma még nem rendelkezünk a *crossing-over* kielégítő molekuláris modelljével. Úgy látszik, hogy a *crossing-over* folyamatában fontos szerepet kell tulajdonítani a specifikus enzimeknek. Ezzel kapcsolatban érdekesek CLARK és MARGULIES (20), SNARASHI és STRAUSS (21) munkái, akik az *Escherichia coli* K-12 és a *B. subtilis* olyan mutánsainak izolálását közlik, amelyeknek jelentősen gyengült a genetikai rekombinációs képességük és a kiindulási törzshöz viszonyítva fokozódott az UV besugárzással, valamint

az alkiláló vegyületek toxikus hatásával szembeni érzékenységük. Egy mutáció eredményeképpen egyidejűleg két folyamat volt megzavarva: a genetikai anyag rekombinációs képessége és az UV sugarakkal károsított DNS reparaciós képessége. A legutóbbi időben TESSMAN közölte, hogy az *E. coli* ilyen mutánsaiban a fágok rekombinációja sokkal lassúbb. Az ilyen mutáció természetére vonatkozóan legvalószínűbb feltevés az, hogy a két különböző folyamatban — *crossing-over* és a DNS UV-s károsodása — megkárosított DNS sajátos szintézisét biztosító enzim károsodik. A *crossing-over* és az UV sugárzással károsított DNS regenerálása közötti kapcsolat a következőképpen magyarázható. Minthogy az UV besugárzás után a DNS regenerálódásának egyik stádiuma a timin-dimerek kihasadása következtében létrejött szakadások reparálása, feltehető, hogy a „rekombinációs enzim" egyidejűleg „reparációs enzim" is.

Ezeknek a munkáknak igen nagy az elvi jelentőségük. A metabolizmus folyamataival együtt genetikai kontrol alatt vannak a rekombináció és a genetikai anyag replikációjának folyamatai is.

Ily módon kirajzolódnak a rekombináció molekuláris szinten való tanulmányozásának a lehetőségei. Ebben az irányban azonban még igen sok a tennivaló — kiderítendő a rekombinációért felelős enzimek pontos mennyisége, feltérképezendők a megfelelő gének, reprodukálandó a rekombináció *in vitro* rendszerben stb. Mindezen igen nagymértékben segítene olyan mutánsok célirányos előállítása, amelyekben a rekombináció különböző stádiumai károsodva vannak.

A molekuláris biológia fejlődésében nagy szerepet játszott a genetikai kód felfedezése. A genetikai kódról igen sokat írtak már, éppen ezért aligha volna értelme ismét részletesen ismertetni. Csak annyit említek meg, hogy a genetikai kód elméletének alapját az egymásutániság, szekvencia hipotézise képezi, amely szerint az adott gént alkotó DNS-rész bázispárjainak sorrendje határozza meg a szintetizálandó polipeptid-lánc aminósav-sorrendjét.

Nem szükséges hangsúlyozni, hogy a kód felfedezése csak a mikroorganizmusokkal végzett genetikai kutatások alapján vált lehetségessé. Nem rég a szekvencia-hipotézis kísérletes bizonyítást nyert ugyancsak YANOFSKYnak (18) baktériumokkal, valamint bakteriofág-mutánsokkal végzett kísérleteiben. Ezekben a munkákban kiderült a két struktúra — a gén és az általa meghatározott polipeptid-lánc kolinearitása.

Mint ismeretes, a genetikai kódban a központi problémák egyike a punktuáció problémája, vagyis a gén-transzkripció kezdeti pontjainak megállapítása a DNS molekulában. A kérdés a következő. Mi az a mechanizmus, amely a gén egy meghatározott pontjától elindítja és egy meghatározott helyén megállítja a „leolvasást"? — ez lényegében a gén határainak a kérdése. A probléma megoldása elsőrendű fontossággal bír a molekuláris genetikában. A megoldásra kétféle út kínálkozik. Az egyik út az úgynevezett *nonsense* vagy *termi-*

nális mutációk tanulmányozása, amelyek a polipeptid-lánc szintézisét egy meghatározott stádiumban megállítják, mégpedig akkor és ott, ahol megszűnik a leolvasás a *nonsense* kodon képződésének eredményeképpen. A „*nonsense*" elnevezés azt mutatja, hogy mutáció eredményeképpen a DNS-ben „értelmetlen" triplet keletkezik, azaz olyan szekvencia jelenik meg, amely semmiféle aminósavat nem kódol. Az ilyen tripletek közös tulajdonsága az, hogy imitálják a transzláció, azaz a polipeptid-lánc szintézisének végét a riboszómában. Ezért nevezik ezeket a tripleteket terminális tripleteknek is. A *nonsense* mutáció eredményeképpen ily módon megrövidült polipeptid-láncok szintetizálódnak (22). A másik út az RNS-polymerázzal kapcsolatos mutánsok tanulmányozása. Ez a polymeráz a génnek az RNS-molekulára való transzkripciójában játszik szerepet.

Míg az elsőket, azaz a poláris mutációkat AMES részleteiben is tanulmányozta a hisztidin-locus példáján a *Salmonella typhimurium*ban, az RNS-polymeráz-mutánsok még várják kutatóikat (23).

Anélkül, hogy AMES (24) munkásságának részleteibe merülnénk, utalunk arra, hogy a terminális mutációk tanulmányozásának alapján az említett szerző azt a hipotézist állította fel, amely szerint egy operonról csak egy m-RNS-molekula transzkribálódik, az operon leolvasáskor mint egyetlen egész viselkedik és a transzkripció a riboszómákban csak a m-RNS operator-végétől kezdődik. A bakteriofágoknak specifikus mutagének hatására kapott terminalis mutációit tanulmányozva sikerült megfejteni két esetben a *nonsense* tripleteket, amelyek a m-RNS-ben, UAA és UAG-nek bizonyultak. A *nonsense* kodonok összetételét olyan aminósavak cseréjének tanulmányozása révén kapták, amelyek számos revertánsban az alkalikus foszfatáz molekulájában ugyanazon a helyen fordulnak elő (25).

A másik út a *nonsense* kodonok összetételének tisztázására kémiai mutagének (hidroxylamin, 2-aminopurin) hatására keletkező ilyen kodonok és revertánsai tanulmányozásából áll (26).

A baktériumok és bakteriofágok genomjaiban megtalálható és általunk most röviden áttekintett *nonsense* vagy terminális kodonokkal kapcsolatos kérdések tanulmányozása a legközelebbi jövőben sok olyan érdekes adatot ígér, amelyeknek felhasználásával újabb lépéseket tehetünk az öröklődés genetikai kódjának megfejtésében. Végeredményben a molekuláris genetika legaktuálisabb feladata az egyes gének, illetve operonok nukleotid-sorrendjének felderítése, azaz a gének konkrét struktúráinak meghatározása.

Viszonylag nem régen még maga a kérdésfelvetés is irreálisnak tűnt volna. Ma azonban a bakteriofágok genetikai kutatásainak fejlődésével, valamint a nukleinsav-hibridizáció módszereinek kidolgozásával a hasonló kutatások teljesen reálisakká váltak.

Ismeretes, hogy előállíthatók nagy transzdukciós gyakoriságú fágok. Az ilyen fágok az esetek 50%-ában saját genomjukon kívül még valamilyen

bakteriális gént is tartalmaznak. Az ilyen fágok DNS-e izolálható és hibridizálható a bakterium össz-m-RNS-évei, RN-áz segítségével eltávolíthatók azok a m-RNS-ek, amelyek nem tartoznak a vizsgált génhez, DN-áz segítségével pedig eltávolítható a vizsgált operon fág DNS-e. Ily módon tehát egyetlen meghatározott operon „tiszta" m-RNS-ét elő lehet állítani. Következésképpen a mikroorganizmusok genetikája már jelenleg reális genetikai módszerekkel rendelkezik a génről transzkribált információs RNS izolálására. A komplementaritás törvényéből kiindulva ilyen módon „el lehet olvasni" a nukleotidok elhelyezkedésének sorrendjét a génben.

A mikroorganizmusokkal végzett genetikai kísérletek tehát segítettek értelmezni azokat a korábbi genetikai kutatásokat, amelyeket az úgynevezett gén-hormonokkal kapcsolatban végeztek (gén-hormonokon a gének elsődleges termékét értették). Akkoriban nem sikerült kideríteni a gén-hormonok természetét. Ma már pontosan bizonyított, hogy a génhatás mechanizmusa az információs RNS-en keresztül érvényesül. A tisztán előállított individuális m-RNS-ek tehát egyúttal az elsődleges gén-termék problémáját oldják meg.

Az utóbbi időben a bakteriofágok genetikájában igen elterjedt a feltételesen-letális mutánsok vizsgálata. A feltételesen-letális mutánsok alkalmazásának eszméje nem új, de új objektumra — a mikroorganizmusokra — kiterjesztve különös értelmet nyert. Először beszélhetünk a gén kimerüléséről, a genetikai térkép génekkel való telítettségéről. Végül joggal remélhetjük, hogy az ez irányban végzett munkák további fejlődése a morphogenesis (ontogenesis) molekuláris mechanizmusának kiderítéséhez fog vezetni (27, 28).

A bakteriofágok, nevezetesen a T4 fág genetikai apparátusáról szerzett molekuláris ismereteink lehetőséget nyújtanak arra, hogy a magasabbrendű organizmusok genetikai apparátusával kapcsolatban is tegyünk bizonyos általánosításokat.

Mint ismeretes, a *Drosophila* ivarsejtjének magjában a DNS mennyisége 3×10^{-7} gamma, a coli-fág viszont 2×10^{-10} gamma DNS-t tartalmaz. Következésképpen a *Drosophila* genomja a DNS mennyisége alapján tizezerszer több genetikai információt tartalmaz, mint a bakteriofág. Abból kiindulva, hogy a fágok, a baktériumok és a magasabbrendű szervezetek fehérjemolekuláinak méretei lényegében azonosak, elképzelhetjük, hogy génjeik méretei sem különböznek nagyon egymástól.

Tudjuk, hogy a T4 fág *r*II génje 2000 nukleotid-párból áll, ugyanakkor a fág egész DNS-molekulája 2×10^5 nukleotid-párt tartalmaz. A fág kromoszómája tehát körülbelül 100 gént, a *Drosophila* pedig tízezerszer több, azaz 10^6 nagyságrendű gént tartalmaz.

Számításaink szerint tehát a T4 bakteriofág kromoszómája a *Drosophila* ivari kromoszómájának 1/200-ad része. Ha ezeket az értékeket összehasonlítjuk a nyálmirigyek kromoszómájával, meglepetéssel tapasztaljuk, hogy a bakteriofág kromoszómája az ivari kromoszómának csupán egy-két korongot

tartalmazó szakaszát teszik ki, amelyben mindössze 0,2 gént sikerült felfedezni és lokalizálni, ugyanakkor a bakteriofág DNS-molekulájának ugyanilyen szakaszában a 100 számított génből a mai napig körülbelül 70 gént lokalizáltak. Ilyenek a valóban molekuláris szintig lebontott genetikai analízis kimeríthetetlen lehetőségei a mikroorganizmusok esetében.

Korunk genetikai irodalmában nagy helyet foglalnak el a mutagenezissel kapcsolatos kutatások. Nem régen egy külön folyóiratot is megindítottak „Mutation research" címmel. Ezen kutatások központi témája a mutagenesis molekuláris mechanizmusának kiderítése.

Nálunk sokat írtak az ún. „hibaelméletről", amely feltételezi, hogy a mutációk a DNS replikációja során keletkeznek, mint a „replikáció hibája", vagy a „beépülés hibája". Aligha szükséges részletesen kitérni erre az elméletre, amely mindenki előtt jól ismert (29). Lényege abban volt, hogy bázis-analogok beépítése vagy akárcsak az egyik nukleotid kémiai átalakítása a DNS anomális replikációjához és végeredményben a nukleotidok eredeti sorrendjének megváltoztatásához vezet.

Ma azonban már vitatják ennek az elméletnek az univerzalitását. ALIKHANIAN kimutatta, hogy az aktinofágok mutagenezisének molekuláris mechanizmusát a mutagén jellege határozza meg. Így pl. a szarkolizin és a chlorambucil hatására a DNS replikációja nélkül is mutációk jöhetnek létre (30).

Ebben a vonatkozásban érdekes DRAKE (31) munkája, aki közölte, hogy a T4 bakteriofág spontán mutációi létre jöhetnek DNS-replikáció nélkül is. A nyugvó fágok tárolási idejével arányosan halmozódtak fel a revertánsok és a direkt mutációk 0°, illetve 20° C hőmérsékleten. A keletkezett mutációk jellege tipikusan a melegítés és savas közeg hatására bekövetkező károsodásokra hasonlított (31).

A mutagenézis modern elméletével kapcsolatban két kérdésre szeretnék kitérni. Az első kérdés SETLOW rendkívül lényeges felfedezésével — a DNS-be bekerülő hibás bázisokat „felismerő" és azokat kiküszöbölő enzimek felfedezéseivel — kapcsolatos — (32, 33). Ez a felfedezés egy teljesen új problémát vet fel, éspedig a DNS-ben jelentkező hibák eltávolításának problémáját. Nevezetesen az ultraibolya besugárzás által előidézett timin-dimerekről lehet itt szó. Ennek alapján feltehetjük, hogy létezhetnek egyéb olyan enzimek, amelyek más típusú hibákat korrigálnak. Az említett felfedezés következtében tehát felül kell vizsgálnunk a mutagenézisre vonatkozó elképzeléseinket. Ma már nem elég tudni, hogy milyen molekuláris cserék történtek a mutagenézis folyamán, hanem azt is tudni kell, hogy közülük melyek javíthatók és melyek nem. A hibák kijavításának folyamata lehetővé teszi, hogy felhasználjuk azt az óriási mennyiségű információt, amely a DNS-ben van, minthogy a bázisok sorrendjében keletkező hibák nem jelentkeznek a DNS leány-fonalaiban.

Ha elképzeljük azt a végtelen genetikai információt, amely magában a DNS-molekula struktúrájában van, valamint a molekula mutagén átalaku-

lásainak végtelen nagyságát, akkor a korrigáló enzimek létezése valószínűleg a genom stabilizációjának az alapvető útja.

Lehetséges, hogy a hibajavítás jelenségének jelentősége túlmegy a mutagenézis problémájának határain. Például köze lehet a rekombináció mechanizmusához, mégpedig a hibrid DNS-molekulák képződéséhez (két homolog fonalai között) kis DNS-szakaszok felbomlása és más nukleotidokkal való helyettesítésük útján.

A hibák kijavításának elve igen nagy hatással lehet a mutagenézis molekuláris alapjainak tanulmányozása szempontjából, mivel azt mutatja, hogy a keletkezett és a megnyilvánult mutációk között eltérés van.

Mindez új perspektívákat rajzol elénk a mutagenézis problémájának területén és arról tanúskodik, hogy a mutagenézis molekuláris mechanizmusának megismerése meglehetősen bonyolult probléma.

A replikáció szerepének meghatározása mutációk képződésében más oldalról is lehetséges.

Jól ismert, hogy NOVICK és SZILÁRD (34, 35) kimutatták, hogy az *E. coli* spontán mutációinak gyakorisága nem függ a baktériumok generációs idejétől. E jelenség legegyszerűbb magyarázata az, hogy a mutációk nincsenek kapcsolatban a DNS replikációja közben előforduló hibákkal, hanem egyszerűen az idő folyamán felhalmozódnak. Nem rég ezeket a kísérleteket a spontán mutációkkal, valamint a koffeinnal indukált mutációkkal megismételték (36, 37). Ha szabályozzuk a sejtosztódás ütemét ahhoz hasonlóan, ahogy azt NOVICK és SZILÁRD tették, azaz a triptofánnak a chemostatba való belépése sebességével, akkor a mutálás üteme nem függ a szaporodás ütemétől. Ha viszont az osztódás ütemét szabályozó tényezőként a glukózt alkalmazzuk, akkor a mutációk gyakorisága egyenesen arányos az osztódás ütemével. Úgy látszik tehát, hogy különböző táplálkozási feltételek esetén két teljesen különböző mutáció-mechanizmus létezik: amikor a sejtosztódás szabályozására triptofánt alkalmazunk, akkor a mutációk a nyugvó génben keletkeznek, a glukóz alkalmazása esetén viszont a gén megkettőződése során bekövetkezett hiba eredményeképpen jön létre a mutáció.

Ugyanezek a szerzők tanulmányozták a mutációk gyakoriságának függését az osztódás ütemétől két másik (ultraibolya sugarak és 2-aminópurin) mutagénre vonatkozóan: UV besugárzás esetén a mutációk üteme nem változik a szaporodás ütemének megváltozásaival, a 2-aminópurin alkalmazásakor viszont a mutációk megjelenésének üteme egyenesen arányos a szaporodás ütemével. Ugyanezt az összefüggést figyelték meg függetlenül attól, hogy a szabályozó tényező glukóz vagy triptofán volt. KUBITSCHEK és BENDIGKEIT eme kísérletei igen nagy jelentőségűek a mutációk keletkezésének mechanizmusával kapcsolatos elképzeléseink szempontjából. Ezek alapján feltételezhető, hogy a mutációk keletkezésének minden valószínűség szerint csak két alapvető mechanizmusa van: a nyugvó génben és a gén lemintázódása közben

bekövetkezett hiba eredményeképpen. Hogy a két mechanizmus közül éppen melyik működik, az mind a mutagéntől, mind a sejt metabolizmusának feltételeitől függ.

A mutagenézis egyik fontos problémája a folyamat specifikusságának kiderítése. A mutagenézis specifikusságának molekuláris szintű vizsgálata ezt a több mint 40 éven keresztül tanulmányozott problémát majdnem az eredeti helyzetébe vetette vissza. E probléma állapotáról beszélve csak azt szeretnénk hangsúlyozni, hogy ma a legaktuálisabb feladat annak az ellentmondásnak a megoldása, amely az óriási tényanyag felhalmozódásával kapcsolatos. A következőkre gondolunk. Egyrészt: számos mutagén a DNS-nek ugyanazzal a bázisával reagál, másrészt: a mutagének hatására minden esetben — fenotípusuk szerint — a legkülönbözőbb mutációk jönnek létre. Ez csak azzal magyarázható, hogy a bázisok átcsoportosulása következtében keletkezett mutációk fenotípusos megvalósulása útján egy egész sor bonyolult folyamat van, amelyek kijavítják a mutagenézis első szakaszában keletkezett változásokat. Ezért aligha várható, hogy az irányított mutációk sikeres előállítása a megfelelő mutagén kiválasztásától, azaz a mutagén specifikusságától függ. Véleményünk szerint a mutagenézis specifikusságában döntő szerepet játszhat a gén minősége, azaz a minden génre jellemző nukleotid-sorrend, másrészt — a mutációk időben elnyúlt fenotípusos megvalósulásának kontrolálása.

Az első feltevés helyességének bizonyítéka az ún. „*hot spot*"-ok felfedezése, valamint a genom szerepe minden egyes gén mutabilitásában. A második út helyessége számos mutagénnek a mutációk fenotípusos megvalósulására gyakorolt specifikus hatásával kapcsolatos ismereteinkből következik.

Egyes gének más génekhez viszonyított gyakori mutálásának megértésében nagy szerepe lehet a mutátor-gén molekuláris hatásmechanizmusának, amelyet nem régen tisztáztak bakteriofágoknál. Kimutatták, hogy a mutációk gyakoriságát 2000-szeresen fokozó mutátor-gén hatása a DNS-polimeráz működését kontroláló gén mutációjával van kapcsolatban, aminek eredményeképpen növekszik a bázis-párok normális sorrendjének hibája a DNS szintézise közben (38).

A modern molekuláris genetika, vagyis a mikroorganizmusok genetikájának legérdekfeszítőbb kérdéseinél elidőzve, csupán hangsúlyozni akartam a kérdések fontosságát és mélységét. Az elmondottakból kitűnik, hogy éppen a mikroorganizmusok genetikájának köszönhetjük az öröklődés molekuláris alapjainak kidolgozását.

Néhány évtizedre visszanézve és a genetika néhány főbb eredményét vizsgálva azt állapíthatjuk meg, hogy az elméleti genetikai kutatások eredményei direkt módon hatottak a szelekcióra. Ez a hatás különösen szembeötlő a mikroorganizmusok genetikájának és szelekciójának esetében.

A 40-es évek a penicillin és a streptomycin termelésében hoztak nagy sikereket. Ekkor használták először széles körűen a fizikai és kémiai mutagé-

neket nagy aktivitású antibiotikumtermelő gomba- és aktinomyces-törzsek előállítására. A mutagének alkalmazásának eredményeképpen az eredeti törzsek aktivitása szinte nagyságrendekkel emelkedett, ami lehetővé tette a penicillin és streptomycin, majd más antibiotikumok nagyüzemi termelését.

Olyan mutagéneket használva, mint UV sugarak, a mustárnitrogén, az etilénimin, a törzspenicillin termelése 100 egységről 10—15 000 egységre emelkedett. Nem nehéz ezek után elképzelni, hogy milyen hatalmas jelentőséggel bírnak a producens mikroorganizmusokkal folytatott szelekciós genetikai kutatások. Országunkban — mint a világon mindenhol — minden antibiotikumot mutáns törzsekből nyernek. Hála a genetikának a streptomycin, terramycin, biomycin, erithromycin, oleandomycin és más antibiotikumok ma már minden beteghez eljuthatnak.

Ennek a munkának elméleti alapjait 10—15 évvel korábban lerakták, vagyis akkor, amikor felfedezték a röntgen-, UV sugarak és számos kémiai anyag mutagénhatását és tanulmányozták a szervezetre kifejtett hatásuk törvényszerűségeit.

Az 50-es években kidolgozták és megvalósították az aminósavak előállítását mikrobiológiai módszerrel. Ezzel lefektették a haszonállatok rentábilis takarmányozásának és az emberiség teljes értékű táplálékkal való ellátásának alapját. Az alkalmazott mikrobiológiának ez az új irányzata teljes mértékben a modern genetikának, különösen a mikroorganizmusok genetikájának köszönheti létét. A kezdetet ebben a vonatkozásban Beadle és Tatum kutatásai jelentették, akik kimutatták, hogy a *Neurospora crassa* esetében a biokémiai funkciókat a genotípus ellenőrzi. A biokémiai mutánsok fenotípusos jellegzetességeinek tanulmányozása tette lehetővé az ismert tétel megfogalmazását: „egy gén — egy enzim". Ez a tétel lényegét tekintve — megtartotta jelentőségét napjainkig („egy cistron — egy polipeptid"). Ekkor állapították meg azt is, hogy a biokémiai mutánsokban bizonyos specifikus biokémiai reakciók gátolva vannak és ennek eredményeképpen a specifikus metabolitok bioszintézisének közti termékei bennük felhalmozódnak. A biokémiai genetika eme első eredményei óriási hatással voltak a mikroorganizmusok genetikájának és általában a biokémiának fejlődésére.

Jelenleg a mikroorganizmusok genetikája és a molekuláris biológia legfontosabb problémáit a különböző típusú biokémiai mutációk tanulmányozásával oldja meg. Ezek felhasználása tette lehetővé a sejtben lejátszódó bioszintetikus folyamatok egymás után következő lépéseinek kiderítését. A biokémiai mutánsokat széles körben alkalmazzák indikátor kultúraként az aminósavak és vitaminok mennyiségi meghatározásában. És végül, amit az előbb már említettünk, az aminósavak előállítása mikrobiológiai módszerrel körülbelül 10 évvel Beadle és Tatum munkája után megvalósult.

Régebben azt tartották, hogy a természetben nem léteznek olyan mikroorganizmusok, amelyek azzal a képességgel bírnának, hogy aminósava-

kat jelentős mennyiségben halmozzanak fel. Ezt az állítást elméleti megfontolásokból tették. Az alaposabb vizsgálódások azonban kimutatták, hogy ez a következtetés nem felel meg a valóságnak, hiszen számos olyan mikroorganizmus létezik, amely a környezetbe bizonyos aminósavakat választ ki. De ezek között nem akad olyan, amely főleg egy aminósavat szintetizálna, vagy ha igen, akkor a jelentős mennyiségben felhalmozódó aminósavak közül hiányoztak a legértékesebbek — a lizin, a metionin és a triptofán. Ezeket a természetben előforduló sajátságos korlátokat a genetikai módszerek segítségével és a biokémiai genetika törvényszerűségeinek felhasználásával szüntették meg. A specifikus biokémiai reakciók blokkolása a megfelelő gének mutációs megváltoztatásával lehetőséget adott arra, hogy kitenyésszünk olyan törzseket, amelyek óriási mennyiségben halmozzák fel a kérdéses terméket. Éppen ily módon kapták a lizintermelő törzseket, melyeket ma világszerte használnak. Ezek a biokémiai mutánsok 300—400-szor több lizint termelnek, mint a kiindulási (vad típusú) formák. A triptofánt és más aminósavakat termelő törzseket is a fenti módszerrel nyerik. Ilyen sikereket a „közönséges" mutációk alkalmazásával nem lehet elérni.

A bioszintézis normális útjainak megváltoztatása más esetben is sikerrel járt. A mikroorganizmusok oxigént gazdaságosabban hasznosító törzseinek előállítására alkalmas a biooxidáció némely specifikus reakciójának megzavarása mutációk segítségével. Ezzel a módszerrel laboratóriumunkban a lizinképző baktériumok olyan törzseit állítottuk elő, melyek levegőztetést csökkent mértékben igényelnek, ami a termelésben határozott előnyt jelent.

Más példa. Kitenyésztettek olyan aktinomyces-mutánsokat, melyek megváltozott kémiai szerkezetű antibiotikumokat termelnek. Így az amerikai kutatók egy csoportjának, majd nekünk is olyan aktinomyces-mutánsokat sikerült nyerni, amelyek dimetilklórtetraciklint termelnek. Ez az antibiotikum a klórtetraciklintől (biomicintől) abban különbözik, hogy a tetraciklin molekulában hiányzik egy metilgyök; az antibiotikumot produkáló mutánsok pedig a metilálási reakció megzavarásával jellemezhetők. Végeredményképpen a klórtetraciklin (végtermék) helyett a dimetilklórtetraciklin (közti termék) képződik, amely értékes terápiai tulajdonságokkal bír.

Az 50-es évek végén és a 60-as évek elején született számos genetikai felfedezés között fontos helyet foglal el az enzim-szintézis genetikai regulációjának felfedezése, amely megmagyarázza a mikrobiális sejt alkalmazkodó reakcióinak mechanizmusát — a szüntelenül változó környezeti feltételekhez. A reguláció szerepét külön gének — a regulátor-gének játsszák. A regulátorgének mutációi a sejtben lejátszódó biokémiai folyamatok szigorúan összehangolt kölcsönhatását zavarják meg. A reguláció megzavart rendszerével bíró mutánsok feleslegben halmozzák fel a bioszintézis végtermékeit, mivel az érintett reakciókat katalizáló specifikus enzimek szintézise depresszió alatt van. Nem kell nagy fantáziával bírni ahhoz, hogy megjósolhassuk, hogy a közel-

jövőben a bioszintetikus folyamatok megzavart regulációjával rendelkező mutánsokat olyan törzsek előállítására fogják használni, amelyeknek gyakorlati jelentősége lesz. Az ilyen mutánsok minden bizonnyal jelentős szerepet játszanak majd az enzimek mikrobiológiai előállításában.

Így például elképzelhető, hogy értékes eredményeket azok a törzsek fognak adni, amelyek a kiindulási törzsek induktív enzim-szintézise helyett konstitutív enzim-szintézissel bírnak.

A sejtmetabolizmus genetikai regulációjának megfejtése leegyszerűsíti a szuperproduktív törzsek előállításának feladatát. Ezekben az esetekben elég, ha a kutató leblokkolja a bioszintézis egyik stádiumát. Oly módon, hogy a szelektív közegből biokémiai mutánsokat izolál. Így tehát elesik a „specifikus" mutagének bonyolult keresésének szükségszerűsége, vagy az ún. „kis" mutációk „vak" felhalmozásának szükségszerűsége a kiválasztódás számos „lépése" folyamán.

A mutagén problémája sok tekintetben a szintézis-gátlás problémájának adja át a helyét. Ezen az úton már vannak gyakorlati eredmények. A lizint, glutaminsavat, inozinsavat termelő törzsek biokémiai, azaz úgynevezett „nagy" mutációkat képviselnek, melyek 30—40 gr/l aminósavat szintetizálnak, míg a sok éves és sok vonatkozásban empirikus munka, mely az antibiotikum-producensek „kis" mutációinak szelektálására irányult mutagének felhasználásával, csak 3—5—10 gr/l antibiotikumot termelő törzseket eredményezett (39).

Előadásomban a mikroorganizmusok genetikájának, valamint szelekciójának csupán legfontosabb kérdéseit tudtam érinteni. Egy rövid előadás keretében lehetetlen ismertetni mindazokat a kutatásokat, melyek világszerte folynak. Egy dolog azonban világos: a sejtben lejátszódó anyagi folyamatok lényegéig hatoltunk. Ismerjük most már az olyan jelenségek molekuláris mechanizmusát, mint a mutáció, a rekombináció, a metabolizmus regulációja. Ismerjük a gén kémiai természetét és szintézisének kémiai mechanizmusát. Más szavakkal: az élőt jellemző legfontosabb makromolekulák, a gének önreprodukciójának mechanizmusát fejtettük meg.

Ez a felfedezés nem korlátozódik a genetikai kérdések területére és hatalmas általános biológiai jelentőséggel bír. Az említett eredmények, amelyek a sejt molekuláris apparátusát érintik, arra adnak lehetőséget, hogy céltudatosan megváltoztassuk azt, és alárendeljük akaratunknak. Így képzeljük el a molekuláris genetika óriási jelentőségét.

Állíthatjuk, hogy a genetikai jelenségek tanulmányozásának molekuláris szakasza számos problémát oldott meg. Sok genetikai jelenséget megértettünk és jelentős mértékben elsajátítottuk azok hasznosítását. Mégis helytelen volna azt képzelni, hogy a molekuláris kutatásoknak ezen a szintjén ki is merült a genetika szerepe. A genetika előtt nagy feladatok állnak a genetikai apparátusban zajló folyamatok molekuláris szintje, valamint a sejt, szövet, szervezet és a populáció szintjén lejátszódó jelenségek közötti folytonosság tanulmányo-

zásában. Másképpen fogalmazva: a genetikusok előtt a génhatás tanulmányozásának feladata a gén, valamint az egész sejt, a szervezet és a populáció közötti bonyolult függőségek tanulmányozásának feladata áll.

Sajnos, mi elmaradtunk a molekuláris genetika problémáinak kidolgozásában. Sokat kell dolgoznunk, hogy elmaradásunkat pótolhassuk és újra kezünkbe vehessük a tudományos kezdeményezést a genetika területén.

IRODALOM

1. Spirin A. S.: The problem of protein biosynthesis. — Vestnik AMN, **4**, 57—64 (Russ.) (1965).
2. Jacob F., Brenner S., Cuzin F.: On the regulation of DNA replication in bacteria. — Cold Spring Harbor Symp., **28**, 329—348 (1963).
3. Pritchard R. H. and Lark K. V.: Induction of replication by thymine starvation of the chromosome origin in *Escherichia coli*. — J. Mol. Biol., **9**, 288—307 (1964).
4. Lark C. and Lark K.: Evidence for two distinct aspects of the mechanism regulating chromosome replication in *E. coli* J. Mol. Biol., **10**, 1 120—136 (1964).
5. Jacob F., Monod J.: Determination and specific regulation of protein synthesis. — Proc. 5th Int. Congr. Biochem., Vol. **1**, (1963).
6. Davies R.: An enzymatic difference among pyr-3 mutants of *N. crassa*. Proc. Nat. Acad. Sci. US, **46**, 677 (1960).
7. Davies R.: Suppressor of pyrimidine-3 mutants of *N. crassa* and its relation to arginine synthesis. Science, **134**, 470 (1961).
8. Davies R.: Consequences of a suppression gene effective with pyrimidine and proline mutants of *Neurospora*. — Genetics, **47**, 351 (1962).
9. Davies R.: Studies on the ribosomes of streptomycin-sensitive and resistant strain of *E. coli*. Proc. Nat. Acad. Sci., US, **51**, 659 (1964).
10. Davies R. et al.: Streptomycin, suppression and the code. Proc. Nat. Acad. Sci. US, **51**, 883 (1964).
11. Reissig I.: Spectrum of forward mutants in the pyr-3 region of *Neurospora* I. — J. Gener. Microbiol., **30**, 327 (1963).
12. Suskind S. and Kurek L.: On a mechanism of supressor gene regulation of tryptophane synthetase activity in *Neurospora crassa*. Proc. Nat. Ac. Sci. US, **45**, 193 (1959).
13. Hayes W.: The genetics of bacteria and their viruses. — Blackwell Scientific Publications, Oxford. (1964).
14. Kvitko K. V.: Induced variability in chlorella. Dissertation work, (Russ.) (1963).
15. Inge-Vechtomov S. G.: The supression. Yerovan Symp. Mol. Biol. (Russ.) (1965).
16. Benzer S.: The elementary units of heredity — Chemical Basis of Heredity. The Johns Hopkins Press, Baltimore, (1957).
17. Tessman J.: Genetic ultrafine structure in the T4 rII region, Genetics, **51**, 63—76 (1965).
18. Yanofsky C., Henning U., Helinski D., Carlton B.: Mutation alteration of protein structure. Fed. Proc. **22**, 75 (1963).
19. Meselson M.: On the mechanism of genetic recombination between DNA molecules. J. Mol. Biol., **9**, 734—735 (1964).
20. Clark A. I., Margulies A. D.: Isolation and characterization of recombination-deficient mutants of Escherichia coll. Proc. Nat. Acad. Sci. US. **53**, 451—459 (1965).
21. Snarashi T., Strauss B.: Relation of the repair of damage induced by a monofunctional alkylating agent to the repair of damage induced by ultraviolet light in Bacillus subtilis. Bioch. Bioph. Res. Comm., 28, **6**, 680, (1965).
22. Sarabhai A. S., Stretion A. O. W., Brenner S., Bolle A.: Co-linearity of the gene with the polypeptide chain. Nature, **201**, 4914, 13—17 (1964).
23. Ames B., Hartman P.: The histidine operon. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. **28**, 349—356 (1963).
24. Ames B.: The biosynthesis of hystidine: intermedier products, enzymes, genes and regulation. Genetika. **5**, 3, (1965).
25. Weigert M. G., Garen A.: Base composition of nonsense codons in E. coll. Nature, **206**, 4988, 992—994 (1965).

26. BRENNER S., STRETTON A., KAPLAN S.: Genetic code: the „nonsense" triplets for chain termination and their supression. Nature. **206,** 4988, 994—998 (1965).
27. CAMPBELL A.: Sensitive mutants of bacteriophage lambda. Virology, **14,** 22—32 (1961).
28. EPSTEIN R. H., BOILE A., STEINBERG C. M., KELLENBERGER E., BOY DE LA TOUR E., CHAVALLEY R., EDGAR R. S., SUSMAN M., DENHARDT C. H., LIELAUSIS A.: Physiological studies of conditioned lethal mutations of bacteriophage T4D. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **28,** 375 (1963).
29. BÀUTZ-FREESE E., FREESE E.: Induction of reverse mutations and cross reactivation of nitrous acid treated phage T4. — Virology, **13,** 1 19—30 (1961).
30. ALIKHANIAN S. I. and MERTUMIAN N. M.: The induction of hostmutations in extracellular phages without preliminary replication in sensitive cells. Mutation Res. **1,** 355—361 (1964).
31. DRAKE J. W.: Spontaneous mutations accumulating in bacteriophage T4 in the complete absence of DNA replication. Proc. Nat. Acad. Sc. US., **55,** 4, 738 (1966)
32. SETLOW R. B.: The disapearence of thymine dimers from DNA. An error-correcting mechanism. Proc. Nat. Acad. Sci., US, **51,** 226—231 (1964).
33. SETLOW R. B.: Physical changes and mutagenesis. Symp. Mol. Act. Mut. Carci. Agents, April 6—9 1964. from J. Cell. and Comp. Physiol., vol **64,** Suppl. 1, 51—68 (October 1964).
34. NOVICK A. and SZILARD L.: Experiments with the chemostate on spentaneous mutations of bacteria. Proc. Nat. Acad. Sci., US **36,** 708—719 (1950).
35. NOVICK A. and SZILARD L.: Experiments on spontaneous and chemically induced mutation of bacteria growing in the chemostat. Cold Soring Harbor Symp. Quant. Biol., **16,** 337—343 (1951).
36. KUBITSCHEK H. E. and BENDIGKEIT H. E.: Mutation in continuous cultures. I. Dependence of mutational response upon growth-limiting factors. Mutation Res. **1,** 2 (1964).
37. KUBITSCHEK H. E. and BENDIGKEIT H. E.: Mutation in continuous cultures. II Mutations induced with activated light and 2-aminopurine. Mutation research **1,** 3 (1964).
38. SPEYER Y. F.: Mutagenic DNA polymerase. Bioch. Bioph. Res. Comm., **21,** 1, 6—8 (1965).
39. ALIKHANIAN S. I.: Induced mutagenesis in the selection of microorganisms. Advances in Applied Microbiol., **4,** 1—50 (1962).

A DIFFERENCIÁLÓDÁS TANULMÁNYOZÁSA MIKROORGANIZMUSOKON*

SZABÓ GÁBOR, VITÁLIS SÁNDOR és BÉKÉSI ISTVÁN

Debreceni Orvostudományi Egyetem Biológiai Intézete

A biológiában újabban elért jelentős eredményeket, elméleteket és alkalmazott, meglehetősen exakt módszereket: molekuláris biológia névvel foglaljuk össze.

A genetikai kód, a fehérjeszerkezet, a fehérjeszintézis, az anyagcsere reguláció területén dolgozók közül azonban egyre többen érzik és mondják, hogy a megismerésben, a jelenleg szokásosan vizsgált életjelenségek viszonylagos egyszerűsége és kevés számuk, pl. az enzimszintézis, és a leggyakrabban használt objektum ugyancsak kis száma, pl. a *E. coli*, ma már korlátozzák az igazán perspektivikus új eredmények napfényrehozását. Ennek figyelembevételével, valamint a genetikai szemlélet nagy térhódításával, a differenciálódás problémájának kísérletes kutatása egyre jobban az érdeklődés középpontjába került.

A differenciálódás alatt az azonos eredetű sejtek specializálódását értjük eltérő biokémiai, fiziológiai, morfológiai funkciók elvégzésére. A differenciálódás jelensége az evolúció különböző szintjein eltérő módon nyilvánul meg a magnélküli, kevés morfológiai jellel rendelkező baktériumoktól felfelé a sokféle sejtműködésű emlősökig. De mindez nem zárja ki azt, hogy — amint a kontrakciós működés molekuláris modellje, vagy az energiatermelés, permeabilitás stb. általános érvényű, éppúgy — fundamentális azonosságot ne találjunk a differenciálódás jelensége mögött a fejlődés valamennyi lépcsőfokán.

Az eltérő működésű sejtek genotípusa legtöbbször nem különbözik egymástól. Az epét elválasztó máj és az izomfibrillumot képző sejt azonos számú, alakú és összetételű kromoszómával rendelkezik. Az embrionális fejlődés során az exogén tényezők váltakozásának kizárásával bizonyítható, hogy a differenciálódás viszont főleg endogén szabályozás alatt áll. Lennie kell tehát egy belső programozásnak, mely megfelelő módon térben és időben szabályozza a fejlődést. A differenciálódás tehát lényegét tekintve regulációs probléma, a sejttevékenység szabályozásának egyik megnyilvánulása.

* Az előadás elhangzott a Magyar Mikrobiológiai Társaság 1966. évi vándorgyűlésén Debrecenben.

A sejttevékenység szabályozásában feltárt endogén tényezők nagy részét, főleg baktériumok segítségével azonos fiziológiai állapotban levő sejteknél vizsgálták. Ez vonatkozik az enzimműködés, ill. az enzimtermelés szabályozására is. A Novick—Szilárd és a Jacob—Monod szabályozási séma jól megmagyarázza bizonyos fiziológiás állapotban levő baktériumok alkalmazkodását a változó külső körülményekhez. A Jacob—Monod rendszer univerzális jelentősége viszont abban is mutatkozik, hogy külső faktorok regulációs kapcsolatát és lehetőségét tárta fel az endogen szabályozás fontos tényezőjével, a DNS-val. Már a baktériumok individuális élete során is fel kell azt tételezni, hogy életük különböző szakaszaiban nem minden gén egyszerre és egyforma mértékben aktív. Ha ennek endogen programozása van, úgy ez a differenciálódás kezdeti formáját jelentené. A differenciálódás fejlettebb formáját mutatnák a spóraképző bacillusok.

A differenciálódás egyes fázisait ezeknél már jól megkülönböztethető morfológiai jegyek jelzik, amelynek egyik szélső stádiuma a spóra, a másik a vegetatív sejt. Bár a külső tényezők reguláló lehetőségét ki lehet mutatni, ezek kizárása mellett az endogen szabályozás anyagait is tanulmányozni lehetett. Így eltérő m-RNS-eket tudtak kimutatni a fejlődés különböző fázisaiban. (ARONSON a *Bacillus cereus* spórázásában specifikus stabil m-RNS-t mutatott ki 1962—1965-ben. BALASSA a *B. subtilis* spórázása közben a messengerképzés gátlásával specifikusan a differenciálódás folyamatát állította le.)

A differenciálódás tanulmányozására még kedvezőbbnek tartanánk olyan egyszerű élőlényt, amely rendelkezik a baktériumok tulajdonságából származó előnyökkel, de több morfológiai jeggyel bírván, a differenciálódás tanulmányozásának további lehetőségét nyitná meg. Ilyenek a *Streptomyces*ek. Ezek a baktériumokhoz tartozó maghártyával nem rendelkező, de életciklusuk során myceliumot képező mikroorganizmusok, amelyeknek fonalai eltérő irányban fejlődnek, morfológiailag sok jellegzetességet mutatnak. Fejlődésük kevésbé befolyásolható egyszerű exogen beavatkozásokkal, megnő az endogen programozás szerepe.

További lényeges különbségek tételezhetők fel a sejtmaggal rendelkező élőlényeknél, ahol sejtmaghártya, kromoszómában való rendeződés stb. is látható. Valószínűleg jelentős regulációs különbségek várhatók a szövetekkel nem rendelkező és szövetekkel rendelkező élőlények között. Valószínűnek látszik, hogy pl. a tojáson belül már minimális az exogen tényezők regulációs szerepe, és háttérbe szorul a belső meghatározottság mellett. Belső alatt viszont itt nemcsak a mag, vagy plazma, de a környezetet jelentő sejteket és a sejt közötti állományt is érteni kell.

A differenciálódás úgy is felfogható, mint a genetikus információ meghatározott részének belső programozású dekódolása. A differenciálódás tanulmányozásának alapkérdése tehát azon mechanizmusok és körülmények feltárása, amelyek során a genetikai információ, a DNS-ről elkerülhet a riboszomához.

A differenciálódás kutatása során érthető, hogy ennek a problémának a tanulmányozása lépett előtérbe, hiszen a genetikai kód, az információ átmásolása és aminósav szekvenciába való átfordítása az utóbbi évek impresszionáló eredménye.

A DNS-nek azt a képességét, ill. azt a lehetőségét, hogy róla információ továbbítódjék, a sejtek *eltérő mechanizmussal* gátolják meg. A *represszió* az a jelenség, amely során a regulátor gén hatására, megfelelő külső faktor jelenlétében egy operator gén gátlás alá kerül. Sajnos a represszor kémiai természetét nem ismerjük. *Az aporepresszor esetleges kémiai megismerése és működésének befolyásolása igen fontos lépés lenne tehát.* A DNS aktivitásának gátlását jelenti a valódi maggal rendelkező élőlények magjából izolált heterochromatin állomány izolálása során észlelt és kimutatott csökkent templát aktivitás. A heterochromaticus állomány inaktivitását bizonyítják az autoradiografiás kísérletek is. Így derült fény a régóta ismert kromoszóma alakváltozások biológiai jelentőségére is.

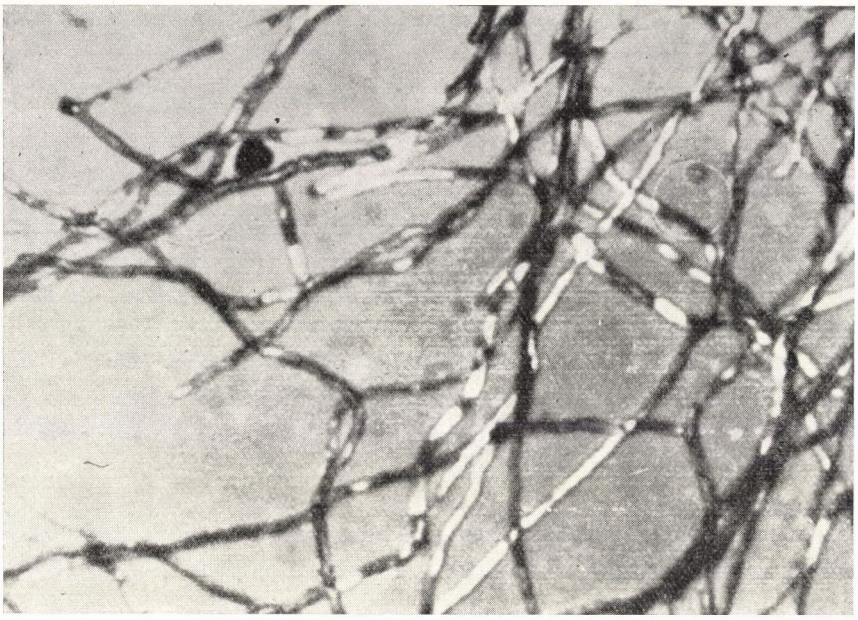
Berman (1956), Kroeger (1960), Becker (1959) és mások vizsgálatai tisztázták, hogy a *Drosophilá*k kromoszómáin a „Balbiáni gyűrűk" képződése az adott kromoszómarészlet aktivitását jelzi és az ontogenezis különböző stádiumaiban a kromoszómák más-más régióján jelennek meg és tűnnek el a „Balbiani-gyűrűk".

Ez arra mutatna, hogy a DNS struktúrájának, a helicalis formából történő tertier, ill. quaterner átalakulásai az aktivitás változásával járnának együtt. *A DNS struktúrájának megváltozásait tanulmányozva lehetne a differenciálódás regulációjára mélyebb bepillantást nyerni.*

A DNS a sejtekben hisztonokkal és más proteinnel együtt fordul elő. Ezek egy része gátolja in vitro kísérletekben a DNS templát aktivitását. Kérdés az, hogy ezen anyagok reguláló szereppel bírnak-e? Sokan feltételezik, hogy a spermiumban található protaminok, a kromoszómákban levő hisztonok a DNS inaktivitását hoznák létre és a differenciálódás ezen represszáló anyagok aktuális és szabályozott eltávolítását jelentené. *A derepresszálás tanulmányozása modelljének megtalálása tehát igen fontos lenne.*

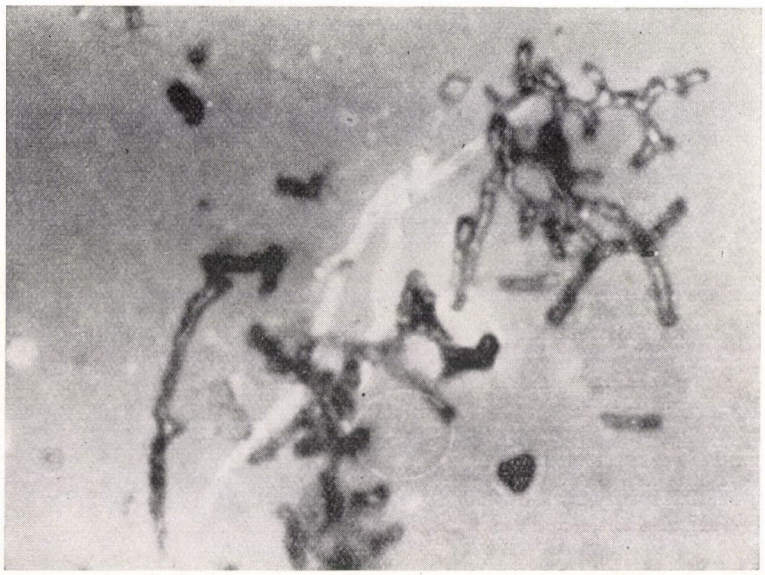
Ezek előrebocsátása után néhány saját kísérleti adatunkat kívánom ismertetni. Intézetünkben a differenciálódást két *Streptomyces griseus* variánson tanulmányozzuk. Két olyan törzzsel dolgozunk, melyek közül egyik a másiknak mutánsa. Az eredeti törzs nem képez konidiumot, míg a mutációval keletkezett variáns konidiumot képez. *Streptomyces*eknél a konidiumképzés jelenti a normálisan lezajló differenciálódás végső eredményét. Kimutattuk, hogy a konidiumtermelő törzs fermentleve, ill. annak egy meghatározott frakciója a nem spórázó törzs tenyészetéhez adva, abban is elindítja a konidiumképzés folyamatát. (1., 2. és 3. ábra).

Ez a morfogenetikai hatás specifikus, más fehérjékkel és antibiotikumokkal nem hozható létre. Azt a következtetést kellett tehát levonnunk, hogy



1. ábra. A konidiumot nem termelő variáns. Idősebb vegetatív fonalak láthatók, köztük csak kevés és jelentéktelen eltérés van. Sem reproduktív fonalat, sem konidiumot nem találunk

2. ábra. A konidiumképző variáns képe látható falfestéssel és immerziós nagyítással. A vastagfalú kerek vagy ovális képletek a konidió-spórák. A vastagfalú konidiumképző reproduktív fonalak mellett halványan tűnnek elő a vegetatív fonalak



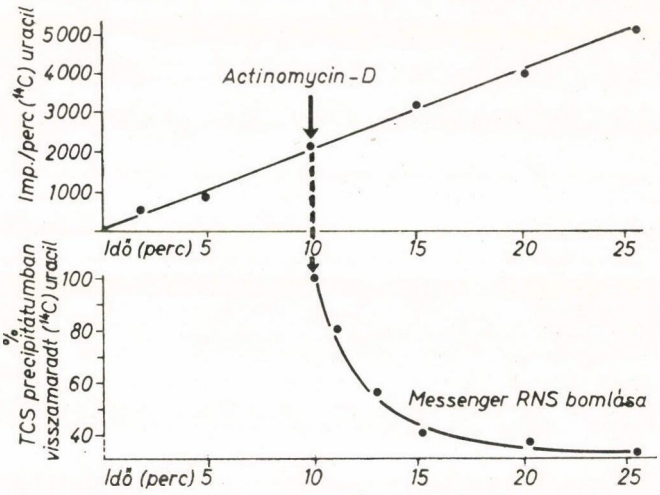
3. ábra. Konidiumot nem képező variáns a konidiumképzést kiváltó faktor hozzáadása után egymástól nagyfokban eltérő fonalakat hoz létre. Határozottan felismerhetők a reproduktív fonalak és kész konidiumokat is találunk. Azt, hogy ilyenkor szabályos lefolyású konidiumképzés következik be, más citokémiai-morfológiai vizsgálatokkal is bizonyítani tudtuk

ez a faktor a differenciálódás egy specifikus lépcsőjét determinálhatja. Hatóanyagunkat „C-faktornak" neveztük el. Az anyag peptid természetű. Hő hatására denaturálódik. Tripszines emésztés hatástalanná teszi, más enzimek hatását nem befolyásolják. Még nem egységes. A morfogenetikus hatás biokémiai analízisére megvizsgáltuk a C-faktor hatását a törzs nukleinsav anyagcseréjére és részletesebben a m-RNS anyagcserére.

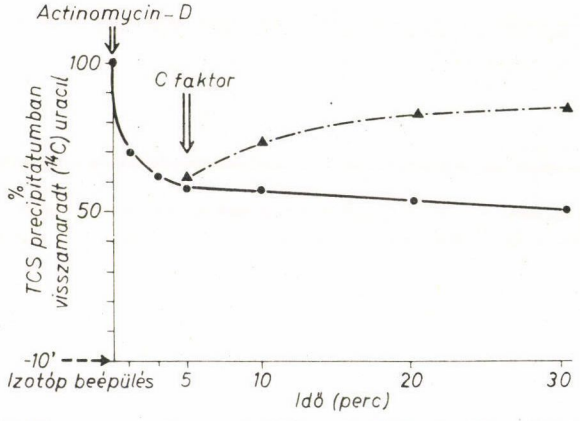
Mint ahogyan már említettük, ARONSON, BALASSA és mások magasabbrendű sejtek differenciálódásának szabályozásában is a m-RNS-t, annak mennyiségi, ill. minőségi változásait a sejten belül, központi jelentőségűnek tulajdonították. Ezért fordítottuk figyelmünket a m-RNS-re mi is a C-faktor hatásmódjának tanulmányozása során. A m-RNS anyagcseréjét LEVINTHAL (1964) módszerével vizsgáltuk. (4. és 5. ábra).

Következő kísérletünkben azt kívántuk bizonyítani, hogy az actinomycin D-vel kezelt tenyészetnél a „C-faktor" hatására ismét meginduló izotóp beépülésének legalább egy része messenger szintézis eredménye. (6. ábra).

Kísérleteink bizonyították feltételezésünket, hogy a C-faktor hatása kapcsolatban van a messenger szintézissel. A C-faktor által szabályozott messenger szintézisnek a differenciálódásban betöltött szerepére mutat az a megfigyelésünk, hogy a C-faktor által indukált konidiumképzés sem gátolható actinomycin D-vel. A C-faktorhoz hasonló regulációs anyagok elterjedtek lehetnek az élő világban. Emellett szól, hogy *E. coli*n és *B. subtilis*en a C-fak-

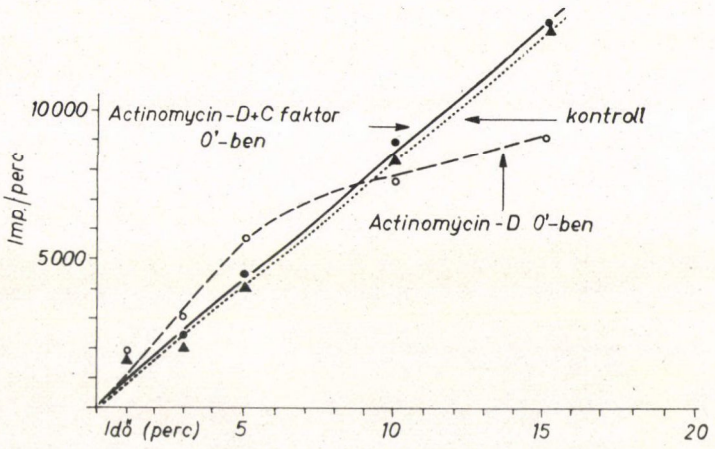


4. ábra. A mosott micéliumhoz 0 időpontban C^{14} uracilt adtunk. Az uracil beépülési ütemét mutatja a folyamatos vonal. LEVINTHAL adatai szerint a generációs idő 1—2%-át jelentő rövid idő intervallumon belül az uracil főleg a messenger RNS-be épül be. Ha a tenyészethez actinomycin D-t adunk (nyíllal jelölve), az uracil további beépülése megszűnik és a beépült izotóp egy része újra felszabadul mutatván, hogy a DNS templáton a messenger szintézis megszűnik és a meglevő messenger bomlik

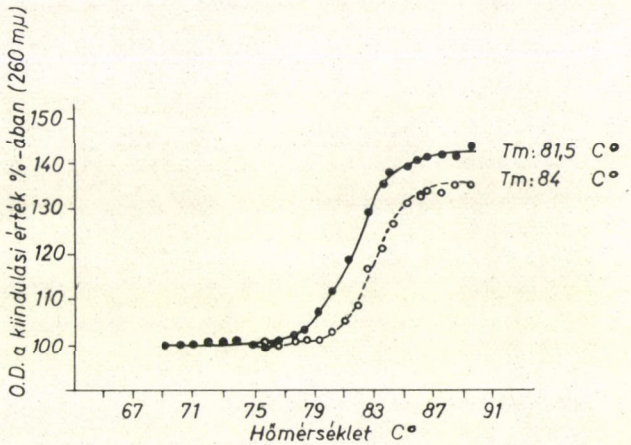


5. ábra. Az ábrán a 0 időpont az actinomycin D hozzáadásának pillanatát jelöli. Ezt 10 perc C^{14}-uracil beépítés előzte meg. Folyamatos vonal jelzi az actinomycin D hatását. A szuszpenzióhoz a nyíllal jelzett időpontban C faktort adtunk, melynek hatására az uracil beépülése ismét megindult, tehát a „C-faktor" az actinomycin D hatását antagonizálta akkor is, ha azt az actinomycin hatás kifejlődése után alkalmaztuk

tornak a fentiekkel egyező hatását tudtuk kimutatni. Mi lehet a m-RNS sejten belüli koncentrációja megváltozásának a mechanizmusa? Több lehetőség közül megvizsgáltuk azt, hogy vajon a C-faktor specifikusan kötődik-e a DNS-hez és hogy ez a kötődés megváltoztatja-e a DNS-fizikokémiai struktúráját, térbeli szerkezetét. Utóbbiról éppen az actinomycin D-vel végzett kísérletekből nyert direkt bizonyítékok (REICH 1964) alapján tudjuk, hogy hatással van a DNS templát aktivitására, m-RNS képzésre. (7. ábra).



6. ábra. Az ábrán a kezeletlen szuszpenzió által beépített C^{14} leucin mennyiségét a pontozott vonal jelzi. Actinomycin hatására az izotóp leucin beépülése — azaz a fehérjeszintézis — fokozatosan megszűnik (szaggatott vonal). Actinomycin D és C-faktor együttes adagolása után a beépülés mértéke gyakorlatilag azonos volt a kontrollal. (Folyamatos vonal)



7. ábra. Ismeretes, hogy hő hatására a DNS kettős spirálja lecsavarodik szimpla fonallá. Ezt a lecsavarodást az oldat 260 mμ-nál mért abszorpciójának fokozódása kíséri. Kísérletünkben törzsünk saját DNS-ének Tm-pontját 81,5 C°-nak találtuk. C-faktor jelenléte a lecsavarodást hátráltatja, erre mutat, hogy a Tm-pont 84 C°-ra emelkedik. A Tm-pont ilyen változása elmarad akkor, ha előzetesen felfőzéssel denaturáljuk a C-faktort. Azaz a polipeptid specifikus térszerkezete szükséges a DNS-hez való kötődéshez

Összefoglalás

A differenciálódás vizsgálatára viszonylag egyszerű és könnyen áttekinthető mikrobiológiai modellt választottunk. A differenciálódás folyamata az általunk vizsgált *Streptomyces*ek esetében lényegesen egyszerűbb és könnyebben áttekinthető, mint a soksejtű élőlényeknél. A primitívebb modelltől,

a *Bacillus*ok spóraképzésétől megkülönbözteti, hogy különböző irányba differenciálódó fonalak egymás mellett és egymással kölcsönhatásban fejlődnek. Ezt a különbséget lényegesnek tartjuk az általánosabb következtetések lehetősége szempontjából. Egy konidiumot képező és egy konidiumot nem képező *Streptomyces griseus* mutáns összehasonlító vizsgálatánál megismert citomorfológiai változások alapján olyan vizsgálati módszert dolgoztunk ki, melynek segítségével igen-nem alapon vizsgálhatjuk a különböző tényezők jelentőségét, azok hatását a differenciálódásra. A konidiumot képző törzs fermentlevéből sikerült izolálnunk egy polipeptid természetű anyagot, melyről feltételezhető, hogy az adott törzsnél részt vesz a differenciálódás szabályozásában. Ezt a feltételezést alátámasztja, hogy ez az anyag DNS-val kapcsolódni képes és befolyásolni tudja a sejtek m-RNS és fehérje anyagcseréjét. Szoros összefüggés állapítható meg a hatására bekövetkező morfológiai változások és a molekuláris szinten lejátszódó események között. Ellentétben az eddigi várakozásokkal ez a valószínűleg differenciálódásban közreműködő anyag derepressor hatásúnak mutatkozik. Nem zárható ki, hogy más élőlények differenciálódási folyamataiban is hasonló polipeptidek, illetve fehérjék játszhatnak közre. Lehetséges, hogy magasabbrendűeknél bizonyos hisztonféleségek töltenek be hasonló funkciót a differenciálódásban. Az általunk izolált peptid talán ezek előfutárának tekinthető a filogenezisben.

A további terveinkben homogén C-faktor előállítása, a hatásmód újabb részleteinek tisztázása mellett a magasabbrendűek sejtjeire kifejtett hatás vizsgálata is szerepel.

IRODALOM

1. Aronson, A. J.: Characterization of Messenger RNA in Sporulating Bacillus cereus. J. Mol. Biol., **11**, 576 (1965).
2. Balassa, G.: Renouvellement de l'acide ribonucleique an cours de la sporulation de Bacillus subtilis. Biochim. biophys. Acta. **76**, 410 (1963).
3. Becker, H. J.: Die Puffers der Speicheldrüsen-chromosomen von Drosophila melanogaster. I. Chromosoma, **10**, 654 (1959).
4. Bermann, N.: Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **21**, 217 (1956).
5. Fan, D. P., Higa and C. Levinthal: Messenger RNA Decay and Protection. J. Mol. Biol. **8**, 210 (1964).
6. Jacob, F., and J. Monod: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. **3**, 318 (1961).
7. Kroeger, H.: The induction of new puffing patterns by transplantation of salivary gland nuclei into egg cytoplasm of Drosophila. Chromosoma, **11**, 129 (1960).
8. Reich, E.: Actinomycin: Correlation of Structure and Function of Its Complexs with Purins and DNA. Science, **143**, 684 (1964).

A II. MAGYAR NÖVÉNYANATÓMIAI SZIMPOZIUM

SÁRKÁNY SÁNDOR

ELTE Alkalmazott Növénytani és Szövetfejlődéstani Tanszék, Budapest

A Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Tudományok Osztályának rendezésében és az ELTE Alkalmazott Növénytani és Szövetfejlődéstani Tanszék szervezésében, 1966. szeptember 6—8-ig, Budapesten, az MTA székházában folyt le a II. Magyar Növényanatómiai Szimpozium. (Az elsőt 1958-ban tartottuk.)

A Biológiai Tudományok Osztálya nevében Zólyomi Bálint akad. lev. tag nyitotta meg a Szimpoziumot, amely Hollendonner Ferencről, a század első felében működő magyar növényanatómusról való megemlékezés jegyében indult. Ennek megfelelően egyrészt a Szimpozium elnöke, Sárkány Sándor méltatta a neves tudós értékes tudományos és pedagógiai munkásságát, kiváló emberi tulajdonságait, másrészt a még ma is forrásmunkaként jól használható főművét: „A fenyőfélék fájának összehasonlító szövettaná"-t (1913) értékelően elemezte Stieber József, a Szimpozium titkára. — A két előadáshoz kiegészítően illeszkedett Hollendonner Ferenc tudományos hagyatékából, özvegyének és Halmai J. professzornak közreműködésével rendezett, demonstratív kiállítás.

A haladó hagyományok ápolását célzó fenti bevezetés mellett a Szimpozium megrendezése hármas célt szolgált. Az egyik az volt, hogy összefoglalóan áttekintsük az elmúlt öt évre vonatkozóan a hazai finomszerkezeti, sejttani és szövettani kutatások helyzetét és fontosabb eredményeit. Erről a Szimpozium elnöke tartott referátumot. (Megjelent az MTA Biol. Tud. Oszt. Közleményeiben, 9, 301—308, 1966.) — A másik cél annak vázolására irányult, hogy a Magyar Tudományos Akadémia támogatásával megjelenő „Magyarország Kultúrflórája" c. kiadványsorozat szövettani munkálatai az utóbbi években milyen mértékben haladtak előre, kerültek megjelenésre és a további években melyek a legfontosabb teendők. Mindezeket a Szimpozium záró motívumaként (a harmadik nap délutánján), a kiadványsorozat főszerkesztője, Máthé Imre akad. lev. tag tárta a hallgatóság elé. — A Szimpozium súlypontos célkitűzése és egyben nemzetközi jellegű részlete a determináció és differenciáció néhány időszerű, sejttani, szövettani, szervszövettani kérdésének felvetésére és megvitatására terjedt ki. — Ennek keretében, a bejelentett 50 tudományos előadás közül 46 előadás és számos hozzászólás hangzott el a programban sze-

replő nyolc témakörön belül. — Az első témakörben a vegetatív hajtás és a gyökér szövetdifferenciálódási kérdései hét előadásban, a második témakörben az anyagkiválasztás szövetfejlődéstani vonatkozásai négy előadásban, az első nap harmadik témakörében pedig az anyagszállítással összefüggő szövetdifferenciálódás néhány problémája négy előadásban szerepelt a napirenden. — A második nap délelőttjére beállított további két (4., 5.) témakör közül az egyik a növényi sejtdifferenciálódás kérdéseivel foglalkozott nyolc előadásban, a másik pedig öt előadás keretében a reproduktív fázisban megfigyelt, különböző jellegű differenciálódási jelenséget tárgyalt. — A harmadik napon, délelőtt az előadások száma (11) tekintetében legnagyobb témakör következett, amelyben összehasonlító, ill., kísérletes alapon a fatörzs szöveti differenciálódásának számos kérdése került ismertetésre és megvitatásra. — Délutánra maradt egyrészt az a négy előadás, amely, a 7. témakörben, főleg a lomblevél-anatómián belül, elsősorban az epidermisz, ill. a sztómák kvalitatív és kvantitatív alakulását elemezte, másrészt a 8. témakör határterületen mozgó három előadása, melyek a szövettenyészetben észlelt differenciálódási jelenségekkel foglalkoztak. — Mindegyik témakörben az előadások többségét kitűnően sikerült demonstrációs anyag (pl. színes mikrofotók, szemléletes grafikonok, egy esetben pedig (Url, Wien) mikroszkópos mozgófilm) kísérte.

A Szimpozium szervezésére és munkamódszerére nézve megemlíthető, hogy egy-egy témakör, vagy azonos témájú előadáscsoport bevezetését célzó főreferátum megtartására neves külföldi szakembereket kértünk fel; így az első témakörben, az ELTE vendégeként H. Guttenberg és B. Kaussmann professzorokat (Rostock), a negyedik témakörben egyrészt az MTA vendégeként A. Frey-Wyssling professzort (Zürich), másrészt az ELTE vendégeiként K. Mühlethaler professzort (Zürich) és W. Url docenst (Wien), a hatodik témakör bevezetésére pedig Münchenből B. Huber (MTA meghívású) és Leningrádból A. A. Jacenko-Hmelevszkij (ELTE meghívású) professzorokat. Utóbbi kettő az utolsó napokban, betegség miatt lemondta részvételét. Jacenko-Hmelevszkij professzor felesége, L. A. Lebedenko azonban eljött és az első témakörben előadást is tartott. — Huber professzor pedig még időben elküldte összefoglaló referátumának teljes szövegét, melyet a program szerinti időpontban a Szimpozium titkára ismertetett. E helyen is őszinte kegyelettel emlékezünk meg a 94 éves B. Nemec akadémikusról (Prága), aki az MTA meghívását örömmel elfogadva: „A gyökér csúcsmerisztémáinak autoregulációs jelenségei" címen jelentette be nagy érdeklődéssel várt főreferátumot. Erre azonban már nem került sor, mert a világhírű tudós az év tavaszán, tüdőgyulladás következtében elhúnyt.

A Szimpoziumot egyébként mind hazai, mind külföldi vonatkozásban nagy érdeklődés előzte meg és önköltséges alapon 80 magyar és 30 külföldi szakember vett azon részt. (Az MTA és ELTE vendégeivel együtt 35 külföldi.) — A külföldi résztvevők közül 16 a Német Demokratikus Köztársaságból,

6 Csehszlovákiából, 6 a Német Szövetségi Köztársaságból, 3 Svájcból, 1 a Szovjetunióból, 1 Lengyelországból, 1 Ausztriából érkezett, 1 pedig mint hazánkban dolgozó aspiráns az Egyesült Arab Köztársaságból vett részt. Ami a Szimpoziumon elhangzott összes (általános és témakörönkénti) előadások megoszlását illeti, 29 előadást hazai szerző, ill. szerzők, 21 előadást pedig külföldiek tartottak (NDK-ból 8, Csehszlovákiából 5, NSZK-ból 4, Svájcból 2, Szovjetunióból és Ausztriából 1—1 előadás hangzott el). — Az ülések látogatottsága jól tükrözte a széles körű érdeklődést; a megnyitó napján 100-nál többen voltak jelen, a többi napokon 50—80 között ingadozott a hallgatóság létszáma. — A kérdésfelvetésekre és hozzászólásokra egy-egy témakör előadásainak elhangzása után, vagy a nagyobb témakörön belül az azonos témájú előadáscsoport befejeződését követően volt lehetőség. Ily módon sikerült egyfelől az ülésszak felaprózódását elkerülni, a folyamatosabb menetet biztosítani, másfelől az egyes témakörök, ill. témacsoportok eredményeinek átfogó megvitatását, összehasonlító elemzését lehetővé tenni. — Mind a hazai, mind a külföldi résztvevők, a témakörök legtöbbjében igen aktív vitakészségről tettek tanúságot, amit az is elősegített, hogy a magyar —, külföldiek esetében pedig a főleg német–nyelven tartott előadások kivonatait sokszorosított formában, mindkét nyelven a részvételi díj ellenében mindenki, a Szimpozium kezdetén kézhez kapta s így az egyes előadások s a vonatkozó demonstrációs anyag lényegét követni tudta. Ez egyben hozzájárult ahhoz is, hogy egyrészt a nemzetközi összetételű hallgatóság és előadók között minél közvetlenebb tárgyalásmód alakuljon ki, másrészt minél többen vegyenek részt a vitákban. Emellett a résztvevők névjelzőt, emlékjelvényt is kaptak.

A fentiekben vázolt általános jellegű ismertetés után a továbbiakban a Szimpozium tudományos eredményeiről, a felmerült problémákról és vitaanyagról nyújtunk témacsoportonként összefoglaló tájékoztatást.

Az első témakörben főreferátumként szóba kerültek (H. Guttenberg) a *harasztok hajtásának és gyökerének differenciálódási folyamatai*, melyek végső fokon két típusra vezethetők vissza. Az egyikben egyetlen tetraederes vezérsejt működik a csúcson és csak később, áthaladó periklinfalak fellépésével, másodlagosan keletkeznek azok a sejtköpenyek, melyek további szövettáji, ill. fiziológiai elkülönülést eredményeznek a hajtástengelyben. Ezzel szemben a másik típusban (a harasztoknak csupán néhány képviselőjében) a csúcson állandóan 2—4 iniciális sejt működik s ezek antiklin, ill. periklin falakkal történő osztódások révén, kezdettől fogva sejtköpenyeket produkálnak, amelyeknek folyamatos differenciálódásából a hajtástengely jellegzetes szövettájai kialakulnak. Az ontogenezis során különösen a páfrányok egy része *(Leptosporangiatae)* mutat érdekes viselkedést, amennyiben szárukban kezdetben centrális protosztéle van s ezt követi szolenosztélén át a diktiosztéle, egykörös szállítónyalábokkal. — E kérdésekhez szervesen kapcsolódott a másik főreferátum (B. Kaussmann) anyaga, amely *a hajtáscsúcs zonációjának problematikájára* ter-

jedt ki és rámutatott arra, hogy a múlt századi, Hanstein-féle hisztogén koncepció óta, a századunk első évtizedeiben bevezetett (Buder—Schmidt-féle) tunika-korpuszra való tagolás mellett milyen további zonációs elméletek, megállapítások és finomítások születtek elsősorban a nyitva- és zárvatermő növények hajtáscsúcsára vonatkozóan. — Más jellegű vizsgálatokról és eredményekről számoltak be azok az előadások, melyek a csúcsmerisztémáknak, ill. növekedő szerveknek egyrészt szövettani és szövetkémiai differenciálódásával (L. A. Lebedenko, Leningrad), másrészt mitózisgyakoriságával (G. Meinl—J. Schreiter, Gross-Lüsewitz) és a differenciálódás sejttani mutatóival (Maróti M., Bp.) foglalkoztak. Közülük az első arra hívta fel a figyelmet, hogy a feketefenyő, lúcfenyő és vörösfenyő *hajtáskezdeményének csúcsmerisztémáiban, a szöveti differenciálódás és a sejt-anyagcsere közötti viszony* hogyan alakul abban az időszakban, amikor a rügyek a vegetatív, ill. generatív fejlődés útjára lépnek. Megállapítást nyert, hogy a csúcsmerisztéma-sejtek magas légzési aktivitása egyrészt a növekedés intenzitásával, másrészt a növekedéssel közvetlenül nem összefüggő szintetikus folyamatokkal korrelációban van. A citokromoxidáz az erőteljesen növekedő, fiatal szövetekben, a szukcinhidráz pedig a potenciálisan embrionális (merisztémás) szövetekben mutatható ki. A már specializálódott és fenolvegyületeket halmozó szövetek fenoloxidázt tartalmaznak. A csúcsmerisztémák sejtmagjainak szabad és kötött deoxiribonukleinsav (DNS) aránya tükrözi azok merisztematikus aktivitását; nagyobb szabad DNS tartalom esetében fokozott mitotikus aktivitás volt észlelhető. A nukleinsav lokalizációja és anyagcsere-aktivitása tekintetében különbségek mutatkoztak a vegetatív és generatív merisztéma-tájban. Hisztokémiai vizsgálatok lehetővé teszik továbbá a rügyek kezdeti fejlődésének korai szakaszaitól kezdve a morfogenezis (a női-, ill. hímjelleg determináció) irányának előjelzését is. — *A mitózisgyakoriságról* szólva, az említett szerzők többek között azt észlelték, hogy a *Vicia pannonica* magjának csírázásakor, az 1-től 20 mm-es gyökérhosszúságig, a gyökércsúcsmerisztémákban a sejtosztódások intenzitása emelkedik, majd a maximum elérése után nagyjában konstans marad. A napi ritmus tekintetében pedig azt találták, hogy a 20 mm hosszúságú gyökerek csúcsaiban (kétóránkénti gyűjtés, fixálás, feldolgozás és átlagadatok alapján) a sejtosztódás intenzitása naponta kétszer ér el maximumot, éspedig először 2^{00} h—8^{00} h, második alkalommal pedig délután, 16^{00}-tól 20^{00} h között van. Ez a ritmika azonban módosulhat a táplálkozási viszonyoktól függően. — Ami a *szöveti differenciálódás sejttani mutatóit* illeti, erre nézve azt a konklúziót lehetett levonni, hogy a vizsgált fajok gyökércsúcsának 1 mm-es szegmentjeiben, az idő és a csúcstól való távolság függvényében mind a fejlődés (hossznövekedés, súlygyarapodás, sejtszám, kvalitatív szerveződés), mind az anyagcsere-folyamatok (RNS-P- és protein-N tartalom, enzimek aktivitása) tekintetében olyan változások következnek be, amelyek a szöveti differenciálódás aktív mutatóinak is tekinthetők. — Az első témakörnek további részleteként

ismertetésre került (F. Kubjatko—A. Göbö, Nyitra) az a vizsgálatsorozat, amelynek során kísérleti edényekben, különböző tápanyagszint alkalmazásával felnevelt *őszi búzák hajtástenyészőkúpjának anatómiai és morfológiai megváltozásait* tanulmányozták, s kezelésenként kisebb eltéréseket mutattak ki. — Részben hasonló tendenciát tükrözött az a beszámoló is (S. Wolcsánszky E., Gödöllő), amely a *kukoricahajtás morfológiai-anatómiai tulajdonságainak* kialakulásával kapcsolatban a különböző agrotechnikai (ökológiai) tényezők hatásáról adott számot s utalt arra, hogy e hatások befolyása egyes morfológiai bélyegek esetében az érés kezdetéig is eltarthat. Egyébként a morfológiai-anatómiai megfigyelések alapján, az előadó részéről vitatható kérdésként merült fel az internodiumok akropetálisnak tartott differenciálódása. — Az első témakör előadásaihoz fűzött kérdések és reflexiók megválaszolásával a délelőtti program befejeződött.

Az anyagkiválasztás szövetfejlődéstani vonatkozásai című témakörben a Szimpozium olyan kérdésekkel foglalkozott, amelyek nemzetközi vonalon is egyre inkább az érdeklődés középpontjába kerülnek. Így többek között szó volt az *illóolaj képződésének, kiválasztódásának* sajátos módjáról, a merisztémás működéssel való kapcsolatáról, lokalizációjának értelmezéséről a *Valeriana collina* differenciálódó lomblevél-epidermiszében (R. Szentpétery G.—Sárkány S., Bp.). — Az illóolaj- és más váladéktartók iniciálódásáról és szövetfejlődési folyamatairól is érdekes és új megállapítások hangzottak el. Ennek során egyfelől a *skizogén illóolajjáratok* kétféle típus szerinti szerveződésének jellegzetes vonásait ismerhettük meg, az *Umbelliferae* egyik képviselőjének, a *Heracleum mantegazzianum* fejlődő termőjében (Kovács A.—Sárkány S., Bp.); másfelől a *lizigén* módon kialakuló (illóolaj- nyálka- stb.) váladéktartók gyakoriságáról, dedifferenciálódással összefüggő iniciálódásának és fejlődésének körülményeiről, két főtípus elkülönítéséről tájékozódhattunk, a vegetatív, ill. reproduktív szervek köréből, jól megválasztott példák alapján (Dános B.—D. Juhász G., Bp.). — Figyelmet keltettek a továbbiakban azok a megfigyelések és részben korrelatív összefüggések, amelyek a vizsgált *Lamium*-fajok *nektáriumainak* szöveti felépítésére és a kiválasztott nektár sűrűségének nagyfokú napi ingadozására, illetőleg a nektárprodukció fajra jellemző cukorértékére vonatkoztak (Gulyás S., Szeged). — A megküldött előadáskivonat alapján nagy várakozással tekintettünk a növényi szekréciós szövetek szubmikroszkópos morfológiájának néhány kérdésével foglalkozó előadás elé. Ennek témája ugyanis az utóbbi években megindult és kibontakozóban levő új kutatási metodika területét érinti. A kivonatban közölt eredmények arra mutatnak, hogy a tanulmányozott fenyőfélék gyantajáratainak kiválasztó sejtjei, valamint a *Populus suaveolens* levelének mirigyszőrsejtjei finomszerkezetileg nagymértékben eltérnek a szomszédos sejtektől; bennük, aktív állapotban elsősorban az endoplazmatikus retikulum, a nagyszámú leukoplasztisz feltűnően dominál, a Golgi-rendszer diktioszómái és vezikulumai pedig aktív és inaktív

állapotban formailag és mennyiségileg nem változtak meg jelentősen. — A korszerű szemléletben és módszerekkel kidolgozott téma bejelentőjének (A. E. Vasziljev, Leningrad) személyes megjelenését sajnos nélkülöznünk kellett, mert néhány nappal a Szimpozium előtt lemondta részvételét. — Egyébként az egész témakör záró mozzanataként, több kérdés tekintetében hasznos és a kutatómunka kiszélesítését, élettani-rendszertani irányú elmélyítését célzó eszmecsere alakult ki, amely a program szerinti szünetben is folytatódott.

A délutáni ülésszak második részében (3. témakörben) az *anyagszállítással összefüggő szövetdifferenciálódás*nak néhány, különböző jellegű részlete került megtárgyalásra. Ezek egyike, a mintegy 40 *Cycas*-féleség törzsének xylotomiai vizsgálata volt. Ennek során, többek között mód nyílt a transzfúziós sejtek alaki változatosságának, működésének, egyedfejlődésének és fejlődéstörténetének elemzésére, valamint a régebbi szakirodalom téves adatainak felderítésére. Megállapítást nyert az is, hogy a transzfúziós sejtek morfológiája az egyes fajokra általában elég jellemző (Greguss P., Szeged). — Az anyagszállítás másik nagy rendszerének, a *háncstestnek funkcionális alaktaná*val foglalkozó előadásban (R. Kollmann, Bonn) a toboztermők *Taxodiaceae* családjába tartozó *Metasequoia glyptostroboides*en végzett fényoptikai, mikroautoradiográfiás és elektronoptikai vizsgálatokról volt szó. Ezek arra az eredményre vezettek, hogy a legfiatalabb, kambium-közeli rostsejtek anyagszállításra már képesek, jóllehet még átmeneti fejlődési állapotban vannak; plazmájuk jellegzetes, az asszimiláták transzportjára nézve jelentős finomszerkezetet mutatnak. — Más irányú, s részben gyakorlati nézőpontból is figyelmet érdemlő és felhasználható eredményekről értesültünk a különböző minőségű nyárfadugványok hajtáseredetű gyökereinek kvantitative eltérő szállítónyaláb-fejlődésével kapcsolatban; ezek szerint a fiziológiailag fiatal anyagból szerveződő hajtáseredetű gyökerek szállítónyaláb-ellátottsága gazdagabb, mint a kifejlett fák dugványaiból származó gyökereké (A. Lux, Bratislava). — Az ökológiai, ill. kísérleti szövettan területéről merítette témáját a délutáni ülésszak utolsó előadása, amely a *fény színképi összetételének hatásá*ról számolt be a borsó (a kinyomtatott programban tévesen a bab) és a szója *szárának szöveti szerkezetére* vonatkozóan. A kondicionált körülmények között, kisfitotronban végzett kísérletek és vizsgálatok alapján megállapítható volt, hogy a fény spektrális energiaeloszlása a szár szövettájainak nagyságára és egymáshoz való arányára jól kimutatható hatást gyakorol s ez többek között különösen a farész és a szilárdító szövetrendszer arányának jelentős nagyobbodásában tükröződik (Horváth I.—Gulyás S.—László G., Szeged). — A harmadik témakörben ismertetett vizsgálatok és eredmények csaknem mindegyike jól demonstrálta a növényanatómia korszerű művelésének, további fejlesztésének néhány irányát, perspektivikus lehetőségeit. — A kapcsolódó hozzászólások és kérdésfeltevések is ilyen jellegű meggondolásokkal hangzottak el.

A Szimpozium második napján a szakmai program (két témakörrel) csupán délelőttre korlátozódott, mert a délutáni órákban külföldi résztvevőinket autóbuszos városnézésre vittük. Különben pedig a reggel először sorrakerült negyedik témakör, a *növényi sejtdifferenciálódás* néhány kérdését (sejtfal, plasztiszok, endoplazmatikus reticulum fény-, ill. elektronoptikai vizsgálatát) ölelte fel, az ötödik témakörben pedig a reproduktív fázisban megfigyelt differenciálódási jelenségeket s a levont tanulságokat vetettük egybe. — *A növényi sejtfalak ultrastruktúrájának differenciálódásáról* A. Frey-Wyssling zürichi professzor tartott nagy érdeklődéssel kísért főreferátumot. Ebben többek között utalt arra, hogy a sejtfal általánosan egy amorf (hemicelluloz- és pektin-anyagokat tartalmazó) matrixből áll, amely a Golgi-hólyagocskák terméke, s amelyben szubmikroszkópos nagyságrendű, elemi cellulóz fonalak, vagy ilyen elemi fonalak kötegeiből alakuló mikrofibrillumok vannak beágyazva; ezeket nagy valószínűséggel a plazmalemma választja ki. Hangsúlyozta továbbá, hogy a különböző sejttípusok falában a fibrilláris elemeknek az elrendeződése nem egyforma, s így különböző ultratextúrákat kell megkülönböztetni, amelyeket már az elektronmikroszkóp bevezetése előtt, polarizációs vizsgálatok alapján egyértelműen leírtak ugyan, de struktúrák és textúrák között még nem tettek különbséget. A továbbiakban részletesen elemezte az elemi fibrillumoknak a sejttengelyre vonatkoztatott orientációs lehetőségeit, valamint a párhuzamos és szórt textúrák különböző típusait, azok kialakulását, módosulásait és fejlődéstörténeti vonatkozásait; végül a vermes gödörkék ontogenezisével foglalkozva bemutatta, hogyan történik a gyűrűs textúrák berakodása a csöves textúrák területének közepén. Ez utóbbi kérdéshez kapcsolódtak azok az elektronoptikai megfigyelések (D. Fengel, München), melyek egyrészt a *Pinus-félék vermes falvastagodásai*ban, a gödörke membrán kialakulásának a fatest egyes szövettájaira vonatkozó nagy változatosságára derítettek fényt, másrészt a *Fagaceae* bélsugárparenchimájának egyszerű gödörkéire és azok membránjaira mutattak ki sajátos alakulásviszonyokat. Mindezeket ultravékony metszetekről készített, kitűnően sikerült elektronmikroszkópos felvételek támasztották alá. — Ugyancsak a főreferátum témájához illeszkedtek azok a vizsgálati eredmények is (Fridvalszky L., Bp.), amelyek a *Characeae* néhány alcsaládjában az *internodialis* sejtek, valamint a szomszédos *nodális sejtek falának rétegzettségére*, fibrilláltságának sajátos vonásaira, a közös falon észlelhető *porus-rendszer* kifejlődésére és a plazmodezmás kapcsolatok képződésére vonatkoztak. — A következő előadás a *farostok* fásodott sejtfalainak *szubmikroszkópos szerkezeté*hez szolgáltatott adatokat (Filló Z., Bp.). Közelebbről a cser, bükk és feketenyár normál- és G-rétegű farostjainak finomszerkezeti sajátosságairól és a bükk G-rétegű rostjában levő hasítékszerű gödörke szubmikroszkópos morfológiájáról volt szó. — A sejtfal ultrastruktúrájának differenciálódására vonatkozó eredmények ismertetését és rövid megvitatását a program szerinti szünet követte, utána pedig a témakör második része követ-

kezett, amely elsősorban a kloroplasztiszok finomszerkezeti viszonyaira, funkciójára, valamint az endoplazmatikus reticulum fénymikroszkópos megfigyelési lehetőségére terjedt ki. — A *plasztiszok thylakoid-membránjá*ról szóló főreferátum (K. Mühlethaler, Zürich) kitűnő összefoglalását adta a kloroplasztiszok membráncisternáinak (stroma- és granatilakoidjainak) finomszerkezetére és funkciójára vonatkozó új megállapításoknak. Ezek szerint a „mélyfagyasztásos" technikával feldolgozott plasztiszok elektronoptikai vizsgálatából kiderült, hogy a thylakoidmembránok középső (lipid?) rétegének mindkét oldalán számos részecske, ún. kvantaszóma helyezkedik el; a külső felületen levő részecskék átmérője 120 Å, míg a belső felületen levőké csupán 60 Å. Negatívkontraszt eljárás alkalmazásával megfigyelhető volt, hogy egy-egy kvantaszóma legalább négy alegységből áll. Ezek a multi-enzim-komplexek a fotoszintézis legkisebb egységeinek tekinthetők. — A további két előadás is főképpen a kloroplasztiszok finomszerkezeti kérdéseivel foglalkozott. Az egyik (Nagy T.-né, Bp.) a *Botrydium granulatum*ban észlelt viszonyokat taglalta, rámutatva *a thylakoid-rendszer*nek sajátos összetettségére s a sejtmagmembránnal való szoros kapcsolatára, amiből a két organellum közötti kölcsönös anyagvándorlásra lehet következtetni. A másik előadás egy (meghatározatlan) *Euglena faj finomszerkezeti sajátságai*ról számolt be a funkcióval kapcsolatban (Lovas B., Bp.); a pellikula szerveződése és működése mellett rámutatott az asszimiláló és éhező szervezet kloroplasztiszai közötti jellegzetes különbségekre. — Nagy érdeklődés előzte meg a témakör utolsó beszámolóját, amelyben az előadó (W. Url, Wien) rövid visszapillantást nyújtott az 1945-ben elektronmikroszkóppal felfedezett *endoplazmatikus retikulumnak fénymikroszkópos kimutatását* célzó kísérletekre és az elért első eredményekre (1958). Majd saját vizsgálatainak tapasztalatait, sikeres megfigyeléseit ismertette, mozgófilm bemutatással. — Mind evvel, mind az előző témákkal kapcsolatosan több kisebb kérdés, ill. rövid hozzászólás hangzott el, melyekre azonban nem térünk ki.

A következő témakör (5.) anyaga a *reproduktív fázis* néhány differenciálódási jelenségéről, így a *paradicsom* és a *hagyma hímsterilitásának cito-hisztológiai* vonatkozásairól (Andrásfalvy A., Bp.), az *árpa megtermékenyítésé*ről és annak energiaforrásairól (M. Luxová, Bratislava), az *árpa antipodsejtjei*nek differenciálódásáról (O. Erdelska, Bratislava), a *mák endospermiumá*nak képződéséről és kezdeti szerveződéséről (Sárkány S., Gracza P., Paál H., Bp.), valamint az *Oleaceae-család termőszerveződésé*ről (Gracza P., Bp.) szerzett tapasztalatokat és megfigyeléseket foglalta magában, gazdag demonstráció kíséretében. — Az előadások lényegével kapcsolatos eszmecserében, többek között arra a megközelítő egyezőségre mutattak rá, amely egyfelől az árpa, másfelől a mák poláris magvainak, megtermékenyítés után vagy közvetlenül az előtt az antipod-sejtekhez való vándorlásában és ottani továbbszerveződésében nyilvánul meg; hasonlóság tapasztalható továbbá abban is, hogy mindkét

növénynél az antipodok magvaiban már a megtermékenyítés előtt, de utána is intenzív endomitotikus folyamatok játszódnak le, amelyek magasszintű poliploidát és ennek folytán nagyfokú DNS felhalmozódást eredményeznek. Feltételezhető, hogy az endospermiumkezdemény első elemeinek képződése (az antipodiális polus körüli lokalizációja) az antipodok magasfokú endopoliploidiájával, energia- és tápanyagközvetítő szerepével összefüggésbe hozható. — E témakör késő délelőtti lezárásával a Szimpozium második napjának szakmai programja befejeződött.

A harmadik nap délelőttjét, a legtöbb témát magában foglaló, a *fatörzs szöveti differenciálódásával* kapcsolatos összehasonlító, ill. kísérletes vizsgálatokat tárgyaló, hatodik témakör töltötte ki. Ennek keretében először a betegség miatt távol levő B. Huber müncheni professzornak: „*A nemzetség- és fajmegkülönböztetés határai a faanatómiában*" című főreferátumát ismertette Stieber József. Majd ugyanő, saját vizsgálatai és a vonatkozó gazdag szakirodalom alapján figyelmet keltő és vitát kiváltó előadást tartott az európai *Larix- és Picea*-fajok xilotómiai diagnosztikájának kérdéseiről, rámutatva arra, hogy a szövettani módszerrel történő megkülönböztetés megnyugtató módon s egyértelműen még ma sincs megoldva. A továbbiak során nagy érdeklődés kísérte azokat a beszámolókat is, amelyek különböző nézőpontból, részben természetes, ill. mesterséges behatásokra bekövetkező megváltozásokról nyújtottak tájékoztatást az egész fatestre, vagy elsősorban a húzásfára, vagy pedig a faelemek, főleg a farostok differenciálódására, nemkülönben egyes paleohisztológiai jellegű kérdésekre vonatkozóan. Így igen meggyőző és a legkorszerűbb módszerrel készült (színes fénymikroszkópos, vagy elektromikroszkópos) demonstrációs anyag kíséretében hangzott el a legtöbb előadás; szó volt az *erdei fák évgyűrű szerkezete* kialakításának néhány tényezőjéről (Gencsi L., Sopron), a *megvilágítás hatásáról* a másodlagos xylem és a sejtfalak képződésével kapcsolatban (W. Necessany, Bratislava), a *növekedési anyagok hatásáról* a faelemek differenciálódásában (G. Casperson, Berlin-Teltow), *a húzásfa* eloszlásáról és előfordulásáról különböző nyárfafajták törzseiben (R. Zenker, Eberswalde), a *reakciós szövet* sejttani vizsgálatáról (R. Höster, — W. Liese, Hamburg-Reinbek), egy növekedési periódus folyamán a *farostok hosszúságának változásáról* (H. Süss, Potsdam), a *rosthosszúságot befolyásoló tényezők*ről, toboztermő fajokban (G. Schultze-Dewitz, Eberswalde), a *libriform-hányados* és a *hajlító-szilárdsági értékek* közötti összefüggésekről (Filló Z., Bp.), végül a *Quercoxylon* mesterséges nemzetség *fosszilis tölgyfái*nak anatómiai variációszélességéről (E. Mädel, Potsdam). — E témakör gazdag és változatos programja keretében igen élénk vita és gyümölcsöző tapasztalatcsere alakult ki, ami azzal magyarázható, hogy a xilotómia hazai képviselői mellett, a külföldi résztvevőknek csaknem a fele a fatest szerveződésével, fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatával, diagnosztikájával és gyakorlati vonatkozásaival foglalkozó szakember volt. Így az ismertetett eredmények legtöbbjéhez érdekes és konkrét reflexiók,

kérdésfelvetések, kiegészítő vagy ellentmondó megjegyzések fűződtek; különösen a *Larix-Picea* kérdést kísérte élénk vita.

A kora délután kezdődő hetedik témakör súlypontosan a *lomblevélanatómia* területén mozgott s részben kvantitatív, részben összehasonlító szövettani jellegű kérdéseket tárgyalt, elsősorban az epidermiszre, ill. a sztómák alakulására s annak diagnosztikai felhasználására vonatkozóan. — A termőhelyi viszonyokkal, ill. az ökológiai tényezők hatásával kapcsolatban, 15 *Solanum-faj levélepidermiszé*nek kvantitatív tanulmányozása értékes megállapításokat tett lehetővé (Juhász M. Szeged); a *Datura stramonium* és a *Vinca minor* lomblevelein, kvantitatív alapon végzett *sztómamegoszlási* vizsgálatok pedig a levélen belüli, továbbá a levélszintenkénti (egyeden belüli) viszonyokra és diagnosztikai felhasználhatóságra derítettek fényt (Verzárné Petri G., Bp.); kiterjedt és türelmes munkát tükrözött a *Schizaeales összehasonlító levélanatómiájá*ról szóló beszámoló, amelyben négy nemzetségből származó 41 faj levélszövettani elemzésének tapasztalatai, a sporangiumok, valamint a sztómák s azok záró- és melléksejtjeinek szerveződési eltérései és megegyezései, lokalizációjuknak fejlődéstörténeti jellegű megváltozásai kerültek tárgyalásra; ez azzal a konklúzióval zárult, hogy indokoltnak látszik a vizsgált négy nemzetség fajainak magasabb rendszertani kategóriába, mégpedig három családba történő besorolása (Maróti J., Szeged). — A témakör befejező előadása kórszövettani tárgyú és gyakorlati fontosságú volt, amennyiben az *őszibarack* levelén, hajtásán és termésén fellépő, a *Taphrina deformans* okozta *kóros szövetelváltozások*, jellegzetes deformálódások kialakulási viszonyaival, változatosságával foglalkozott (Varga I., Szederkény). — Ez a témakör is több hozzászólás, ill. felvetett kérdés megbeszélésével zárult.

A soron következő nyolcadik s egyben utolsó témakörben néhány hazai kutatási eredményről volt szó, a *növényi szövettenyészetekben megfigyelt sejt-, szövet-, illetve szervdifferenciálódási* jelenségekkel kapcsolatban. — Így a *Daucus carota* gyökeréből nevelt különböző korú és származású szövettenyészetek tanulmányozása arra a megállapításra vezetett, hogy lényeges fejlődési különbségek mutathatók ki a természetes körülmények között keletkezett és a mesterségesen (táptalajon) nevelt kallusz szövetdifferenciálódási folyamatai között; előbbi esetben ugyanis az egyszerű parenchima dominál s csak elvétve alakulnak hálózatos falvastagodású tracheidák, ezzel szemben a másik típusú szövettenyészetben kezdetben szintén homogén parenchimatömeg van, majd ebben intenzív tracheidaképződés indul, ezt követően pedig kambium s annak működésével háncselemek jelennek meg, valamivel később egyszerű sztélék, a szervek közül pedig elsőnek a gyökér szerveződése figyelhető meg (Görgényi L.-né—Maróti M., Bp.). — Hasonlóan komoly érdeklődés kísérte a *Convolvulus arvensis* továbbboltható szövettenyészetek regenerációjának hormonális (IES-kinetin—gibberellinnel történő) szabályozásáról és a szervformálás kérdéséről elhangzott beszámolót (Klujber L., Pécs) ugyanúgy, mint az utána következő

témát is, amely a *Nicotiana hibridek* tumoreredetű szövettenyészeteiben észlelt szövet- és szervdifferenciálódás néhány jellegzetességét, pl. a hajtáskezdemény, epidermisz, sztómák, mirigyszőrök, szabályos szállítónyalábok alakulását elemezte (Kovács E., Bp.). — A témakör anyagának rövid megvitatását követő szünet után a kizárólag hazai vonatkozású programponttal, a bevezetőben már említett akadémiai kiadványsorozat („Magyarország Kultúrflórája") szövettani munkálatainak értékelésével és az ahhoz csatlakozó elnöki zárszóval fejeződött be a Szimpozium munkája.

Összefoglalva a Szimpozium résztvevőinek háromnapos szakmai tevékenységét, megállapítható, hogy a hármas célkitűzést mind elvileg, mind tartalmilag sikerült megvalósítani, amennyiben egyfelől átfogó képet kaptunk az elmúlt öt évben elért hazai eredményekről, kutatási irányokról és a legfontosabb további feladatokról, másfelől a növényi testszerveződés folyamatai közül a determináció és differenciáció számos részletkérdését korszerű megvilágításban, neves külföldi szakemberek közreműködésével megtárgyaltuk és megvitattuk; ennek során sok hasznos tanulságot vontunk le, több irányú eredményes tapasztalatcserét folytattunk, ami a még Budapesten maradt külföldiekkel kapcsolatban, a Szimpozium utáni napokra is kiterjedt. Egyébként rámutatunk még arra, hogy a Szimpoziumon a közép-európai növényanatómiai kutatás csaknem minden jelentős ország vonatkozásában képviselve volt. — A teljesség kedvéért végül megemlítjük, hogy a Szimpozium első napján este, a Gellért-szállóban fogadást rendeztünk, a második nap délutánján a külföldiek városnéző körúton vettek részt, a harmadik nap estéjén pedig a Mátyáspincében barátságos búcsúvacsorát tartottunk. Mindhárom rendezvény kitűnően sikerült.

Befejezésül annyit, hogy a hazai és külföldi résztvevők többszöri megnyilatkozása alapján is, elfogultság nélkül megállapítható, hogy a II. Magyar Növényanatómiai Szimpozium mind szakmailag, mind technikai és adminisztratív kivitelezés tekintetében a legteljesebb elismerést váltotta ki és eredményesen zárult.

AZ IZOMSZIMPOZIUM

TIGYI JÓZSEF

POTE, Biofizikai Intézet

Közvetlenül a bécsi Nemzetközi Biofizikai Kongresszus után (1966. szept. 12—17) tartottuk meg ezt az összejövetelt 14 országból érkezett kb. 50 és kb. 20 itthoni szakember részvételével (az International Union of Pure and Applied Biophysics védnökségével).

Straub röviden köszöntve a résztvevőket a Magyar Tudományos Akadémia Elnöksége nevében, megtartotta bevezető előadását. Ebben tárgyilagosan ismertette a hazai izomkutatás eredményeit a nemzetközi teljesítmények keretében. Ez jól alátámasztotta számos külföldi kolléga levélben kifejezett helyeslését a budapesti rendezést illetően, hiszen — mint írták — igazán helyénvaló az Izomszimpoziumot Magyarországon tartani, ahonnan olyan sok kezdeményezés indult ki és oly sok eredmény született e tudományterületen. Straub bevezető előadása kifejtette továbbá, hogy milyen meggondolás alapján történt a rendezés (Ernst javaslatának megfelelően), hogy ti. minden egyes főfejezethez csak 1 előadás hangozzék el, az egész többi időt pedig a szóban forgó főtéma szabad vitájának tartsuk fenn.

Mielőtt a főfejezetek tartalmi leírására térnénk rá, megjegyezzük, hogy a bátor (és eleinte bizony kockázatosnak látszó) kezdeményezés, hogy ti. 1 előadáson kívül csak vitával töltsük ki az egyes ülések idejét, lett szimpoziumunk legáltalánosabb és legnagyobb sikere. Helyesnek bizonyult az a nemzetközi tapasztalatokon alapuló felmérés, amely a 10 perces kiselőadások dömpingjét nem tartotta már a tudományos haladást előmozdító módszernek. Érdekes volt tapasztalni a résztvevők örömét és aktivitását, ahogy szinte felszabadultan vetették magukat a vitákba és szinte élvezték azt. (Nem is jött létre olyan helyzet: bent előadás, a folyosókon beszélgetés.)

Négy főtéma alkotta a szimpozium anyagát:

1. A harántcsíkos izom mikro- és submikrostruktúrája. Az előadásra felkért R. Couteaux professzor (Párizs) „A harántcsíkos izom strukturális aspectusai" címen tartott előadásában nem összefoglaló képet nyújtott a kérdés mai állásáról, hanem inkább saját utóbbi eredményeit ismertette. Ezek a békaizom gyors, ill. lassú rostjainak különbségeire vonatkoznak, éspedig a lassú rost vastagabb ($d \sim 50\mu$), post-synaptikus membránjainak gyűrődései

jelentéktelenek, sokkal kevesebb kolineszterázt tartalmaznak; viszont az izomin kapcsolatokban több van belőle. A kontrakció lassúbb lefolyására nem áll citokémiai adat rendelkezésre. Ehhez a kérdéshez kapcsolódó vitában részt vettek közül — e beszámoló korlátozott terjedelme miatt* — csak Gutmann adatait említjük, melyek szerint a fő különbséget az ún. gyors, ill. lassú rostok között az anyagcsere különlegességei teszik ki.

Azonban annak ellenére, hogy a bevezető előadás nem az általános helyzetről adott képet, mégis ez a kérdés került a diskussziók középpontjába az első napon. Nevezetesen *a harántcsíkos izomfibrilla* szubmikroszkópos szerkezetének és az ezzel kapcsolatos működési mechanizmusnak megbeszélése foglalta el a legtöbb időt. Talán nem hivalkodás rámutatni, hogy a pécsi Biofizikai Intézet eredményei is szerepet játszanak abban, hogy a nemzetközi kutatás már szinte magától értetődően a fibrillára összpontosítja a figyelmét, mint a harántcsíkos izom funkcionális egységére.

A fibrilla szubmikroszkópos szerkezetének és az ezzel kapcsolatos rövidülési mechanizmusnak nagy nemzetközi irodalmában H. E. Huxleynak közismert sliding hypotézise foglal el központi helyet. Tulajdonképpen direkt vagy indirekt vonalon e probléma körül forgott a fő vita, amelyben *30-an vettek részt, mégpedig 53 hozzászólással.* A kérdések és válaszok cikázása végre egyszer produkálta azt a valóban tudományos légkört, amelyet annyiszor és oly sokan hiányoltak a nemzetközi tudományos megbeszéléseken. Persze maga a vita sem lehet öncélú, tehát az a lényeges, hogy mit eredményezett. Természetesen nem részletezhetjük e rövid beszámolóban a hozzászólások tartalmát, de egy körülményt mégis meg kell említeni. Itthon már évekkel ezelőtt fellépett Ernst, aztán Garamvölgyi és Guba is a Huxley koncepció egyeduralma ellen és hasonló értelemben szólaltak fel ezúttal is. Hadd jelezze a helyzetet az izomszimpozium előtt Huxleynek bécsi (1 héttel korábbi) előadásából vett idézet: „Kontrakció alatt az aktin fonalaknak aktív sliding mozgását a miozin fonalak mentén azok a folyamatok hozzák létre, melyek a miozin fonalaktól oldalt kinyúló kereszthidakon levő aktív helyeken játszódnak le." Nos, az Izomszimpozium utolsó plenáris ülésén ugyanaz a Huxley így vélekedett: „A sliding hipotézis nem arra való, hogy mindent megmagyarázzon . . . a kereszthidak feltételezett működése nem tartozik e hipotézis keretébe." A későbbiekben meglátjuk, mi idézhette elő e változást.

Az előadón kívül szerepeltek (idősorrendben): Huxley (Anglia), A. G. Szent-Györgyi (USA), Edman (Svédország), Aubert (Belgium), Hasselbach (Ny. Németorsz.), Davies (USA), Rinaldi (USA), Hanson (Anglia), Gergely (USA), Guba, Rice (USA), Biró, Strickholm (USA), Dydynska (Lengyelorsz.), Ivanov (SzU), Tregear (Anglia), Garamvölgyi, Maruyama (Japán), Hoyle (USA), Ernst, Laki (USA), Wilkie (Anglia), Drabikowski (Lengyelország),

* Az Izomszimpozium teljes anyaga meg fog jelenni nyomtatásban.

Johnson (USA), Gutmann (Csehszlov.) Sreter (USA), Kövér, Csillik, Virágh, Varga.

2a) Az Izomszimpozium második napja az izom biokémiájának jutott, ha ugyan el lehetne választani egymástól a biokémiai és a biofizikai adatokat az izomprobléma területén. Mindenesetre a második nap délelőttjét Ebashi (Japán) és Ivanov (Szovjetunió) referátumai és az azokról folytatott vita töltötte ki. E cikk szerzője nem vállalkozhat a kérdés szakszerű értékelésére, annyit azonban talán helyénvaló kiemelni, hogy az izomfehérjék biokémiai tárgyalása sok új részlettel gyarapodott ugyan az utóbbi két évtizedben, de a Szent-Györgyi—Straub koncepció nívóján nem jutott túl. Sőt, a miozin-aktin-ATP hypotézis világos útmutatása mintha olyan miozin-részletekbe veszne el, amelyek jelentősége többé-kevésbé homályban marad a fő izomproblematika szempontjából.

Ebashin és Ivanovon kívül részt vettek a vitában (idősorrendben): Hanson (Anglia), Gergely (USA), Drabikowski (Lengyelország), Maruyama (Japán), Guba, Kominz (USA), A. G. Szent-Györgyi (USA), Edman (Svédország), Huxley (Anglia), Pepe (USA), Garamvölgyi, Pinaev (Szovjetunió), Szőr. (Összesen 36 hozzászólás 15 vitatkozó részéről.)

2b) Az Izomszimpozium második napjának délutánját az izom anorganikus alkatrészeinek megbeszélése foglalta le; a bevezető előadást az utolsó hetekben súlyosan megbetegedett Fleckenstein helyett felkért Page (USA) tartotta. Ez bizonyos eltolódást eredményezett az eredeti programtól, amennyiben az emlős szív képezte előadásának gerincét, azonban a vita mégis megtárgyalta az izom anorganikus alkatrészeit is. Mindenesetre Page előadása is tartalmazott adatokat, amelyek szoros vonatkozásba hozhatók az izommal. Eszerint a mai membrán elmélet nem feltétlen egyedül helyes, hiszen az ún. nyugalmi áram változásai nem mutatnak időbeli quantitatív megegyezést a K-tartalom változásaival; továbbá a K-tartalomnak 12—25%-a elütően viselkedik a többi K-tól. Említve a Hodgkin—Huxley elméletet hangsúlyozta: növekvő Na-influx és K-efflux eddig nem nyert egyértelmű bizonyítást emlős szívizmon.

A kialakult széles körű vitában 46 hozzászólás hangzott el 16 résztvevő részéről: Tigyi, Gergely (USA), Hoyle (USA), Wilkie (Anglia), Ebashi (Japán), Varga, Sleator (USA), Strickholm (Svédország), Aubert (Belgium), Dydynska (Lengyelország), Benson (USA), Ernst, Bowen (USA), Edman (Svédország), Sreter (USA). A vita élénkségét jelzi, hogy Page és Tigyi 7—7-szer, Wilkie és Strickholm 4—4-szer, Sleator, Bowen, Varga és Ernst 3—3-szor szóltak. A K-probléma azonban nyitott kérdés maradt.

3. Az Izomszimpozium 3. napjának tervezett főkérdése „A harántcsíkos izom mechanikus tevékenysége" helyett Jöbsis (USA) bevezető előadásában a mechanikus tevékenységgel együttjáró kemizmusról, illetőleg ezen belül is néhány kérdésről beszélt. Főleg a varangyos- és a kecskebéka sartorius izmával

dolgozott. Bár ily módon eltért az előadás anyaga a megvitatandó alapkérdéstől, így is nagy érdeklődést keltett és igen élénk vitát váltott ki a Ca-, a pH és különösen az energiaforgalomra vonatkozó megállapításaival; ez utóbbiak között a Hill-féle „aktivációs hő" és „aktív állapot (active state)" egyértelmű tagadásával. Végül hadd idézzem következő mondatát: „A feszülés nagysága közvetlen kapcsolatban van az enzim-szubsztrat komplex koncentrációjával, viszont a rövidülés úgy tekinthető, mint a reakció-sorozat végterméke." Ez pedig egyértelműen két különböző folyamatnak tekinti az izom feszülését, ill. rövidülését.

Az 58 hozzászólásból álló vitának részleteit ez alkalommal is mellőzöm helyhiány miatt, de nem hallgathatok el a vita közben felmerült két adatot. Az egyiket Davies (USA) hozzászólásából idézem: „ . . . lehetetlen, hogy a rövidülési hő közvetlenül az ATP-bomlásból jöhetett volna" . . . továbbá: „a külső munkára vonatkozó hatásfok olyan nagy értékeket ér el, mint 90%". A másik Bowen (USA) adata, mely szerint bizonyos módon előkezelt nyúl psoas rost elvesztette ATP-áz aktivitását, de nem azt a képességét, hogy ATP-re rövidüljön"; ez alapon kiemeli az elektromos töltésváltozás szerepét a rövidülésben. Bárki fellapozhatja pl. Ernst és munkatársai közléseit és megtalálja bennük ezeket vagy az ezekhez hasonló megállapításokat egy vagy több évtizeddel korábbról.

A felsorolt három kollégán kívül még 18-an vettek részt a vitában: Ebashi (Japán), Huxley (Anglia), Tigyi, Strickholm (Svédország), Kövér, Hasselbach (Nyugat Németország), Gergely (USA), Bendall (Anglia), Hanson (Anglia), Edman (Svédország), Brinley (USA), Wilkie (Anglia), Spronck (Belgium), Johnson (USA), Dydynska (Lengyelország), Aubert (Belgium), Tregear (Anglia), Vorobjev (Szovjetunió).

4. A negyedik főtéma bevezető előadását Wilkie (Anglia) tartotta „Az izomműködés energetikai szempontjai" címen. A monojódecetsavval mérgezett izomban az összenergia termelést munka + hő értékben az elbomlott phosphocreatin mennyiségével hozta quantitatív kapcsolatba (0 C°, N_2-atmoszféra). A hőtermelést termoelektromosan mérte. Hivatkozott Davies már korábban citált adatára — mely szerint 2,4-dinitrofluorobenzollal mérgezett izomban csak ATP lebomlás folyik és ennek így mért mennyisége nem magyarázhatja sem az aktivációs, sem a rövidülési hőt, — s arra a felfogásra jut, hogy „a gyorsan rövidülő izomban a hőnek csak kis részéről adhat számot az ATP- vagy a PC-bomlás". Megkísérli ugyan a bizonytalan energetikai helyzetképet megjavítani az irreverzibilis folyamatok termodinamikájára vonatkozó megfontolások segítségével, de végeredményként a bizonytalanságot és a további experimentális munka szükségességét hangsúlyozva.

Az élénk vita 47 hozzászólásából megemlítem Tregear (Anglia) adatát, amely szerint ATP lebomlást végző helyek aktivizálódnak glicerinezett izomrost feszítése folytán. Vorobjev (Szovjetunió) hasonló adaton kívül kiemelte,

hogy „miozin vagy aktomiozin oldat ATP-áz aktivitása fokozódik hidrodinamikus tér hatására". Itt helyénvaló idézni Davies említett hozzászólásából az ATP tevékenységi lebomlásának mennyiségére vonatkozólag: „ennek 25%-a az utolsó inger leadása után lépett fel (50 pulses/sec)". Ezek az adatok röviden 2 pontban fogalmazhatók: 1. mechanikus behatás kontrakció nélkül ill. után is fokozza az ATP lebomlást; 2. aktomiozin ill. miozin *oldat* is ATP-áz hatású, vagyis Huxley kereszthídjainak submikrostrukturás funkciója nem feltétele az ATP lebomlásának (Vorobjev nem említette Engelhardt-ot). Aki foglalkozott e kérdéssel, minden nehézség nélkül felfoghatja mindezeket Ernst ismételt állásfoglalása igazolásaként is; hiszen felismerhetően kezd hasonlítani a helyzet a tejsav-kontrakciós elmélet történetéhez, mikoris kiderült, hogy van tejsavképződés kontrakció nélkül és kontrakció tejsavképződés nélkül.

A vitában az említetteken kívül részt vettek: Tigyi, Wilkie (Anglia), Aubert (Belgium), Ernst, Hoyle (USA), Gergely (USA), Page (USA), Oplatka (Izrael), Jöbsis (USA), Rüegg (Nyugatnémetország), Bowen (USA), Hasselbach (Nyugatnémetország), Huxley (Anglia), Strickholm (Svédország), Rinaldi (USA).

5. Az utolsó plenáris ülés bevezető előadását Ernst tartotta: „Tények, feltevések, távlatok" címen. A formális üdvözlések és köszönetnyilvánítások után különösen 3 pontot emelt ki: 1. Experimentális tények keresését nem helyettesítheti feltevések, koncepciók, analógia-képek, modellek bármilyen tetszetős leírása. 2. Noha nélkülözhetetlenül szükségesek szubmikroszkópos, sőt molekuláris adatok az izomműködés exakt leírásához, de ezek nem szabad elfedjék a tényt, hogy az izom makroszkópos munkavégző apparátus, amelynek makroszkóposan igazolt adataival nem ellenkezhetnek a szubmikroszkópos vagy molekuláris dimenziókra vonatkozó feltevések. 3. Az Izomszimpozium résztvevői vitassanak meg *néhány* megtárgyalt kérdést és próbálják röviden megszövegezni akár egyetértésüket, akár főbb ellentéteiket. Ennek alapján ki lehetne tűzni a következő nemzetközi izomszimpozium 1—2 vitatémáját kiselőadások sorozata helyett.

Az előadást követően 18 résztvevő 38 felszólalásban boncolgatta a szóban forgó kérdéseket. Davies (USA) az előadás alapgondolatának továbbfejlesztéseként javasolta, hogy állíttassék össze egy lista a fontosabb experimentális tényekről (ő már meg is kezdte); kéri, hogy mindenki írásban küldje be neki a tényeket (irodalmi adattal megjelölve), amelyek magyarázatra szorulnak. A végső listát aztán közölje le az Egyesült Államok-beli Information Exchange Group szerkesztősége és küldje szét. Egyébként egyetértett az előadóval a feltevések elburjánzását illetően, mert az egészet nem képes átlátni „még egy olyan okos ember sem, mint Huxley". (Huxley szerény és szimpatikusan mértéktartó állásfoglalását — az ezután következő vitában — már említettem.) Érdekesen reagált Bendall (Anglia); hivatkozott a szimpozium Empedokles-i jelmondatára: „Mindenki csak arra gondol, amire rátalált sok-

féle bolyongásai közben, mégis mindenki azzal büszkélkedik, hogy az egészet találta meg" és mintegy helyeslésül idézte Occamnak, a középkor végefelé élt és akkori viszonyok között materialistának tekinthető angol filozófusnak mondását: „Az entitásokat ne szaporítsuk a szükségen túlmenően."

A vitában szerepeltek még: Guba, Kominz (Japán), Szent-Györgyi (USA), Hoyle (USA), Gergely (USA), Hanson (Anglia), Rinaldi (USA), Wilkie (Anglia), Sleator (USA), Garamvölgyi, Benson (USA), Edman (Svédország), Aubert (Belgium), Gutmann (Csehszlovákia), Bowen (USA).

6. Az eredeti elgondolásnak megfelelően a szimpozium egész ötödik napját kirándulásra fordítottuk, ekképpen módot adva a résztvevőknek arra is, hogy a jelenlevők közül azzal tárgyalhassanak meg egyes kérdéseket, akivel éppen akarnak. Ezzel a lehetőséggel éltek is bőségesen a résztvevők, de természetesen nem áll módomban erről beszámolni. Viszont tudom, hogy Ernst és én magam is hosszasan megtárgyaltuk Wilkievel az izomműködés energetikájából különösen a hőtermelés jelenségét. És ha az előadások, ill. hozzászólások tapintatosan kezelték negatív módon a Hill-féle „alapvető" myotermikus adatokat, akkor a beszélgetésekben Wilkie minden kertelés nélkül elismerte, hogy az említett hőadatokat nem lehet az izom mechanikus működésére vonatkozó energetikai helyzet kvantitatív leírására felhasználni. Ez pedig tulajdonképpen egyezik a pécsi biofizikai iskola több évtizedes állásfoglalásával. (Nem került viszont döntésre a használt mérési metodikák: termoelektromos, ill. kalorimetriás mérés megbízhatóságának kérdése.)

Összegezve talán annyit mondhatunk minden elfogultság nélkül, hogy kitűnően bevált az a kezdeményezés, hogy a nemzetközi szimpozium csak néhány alapvető problémával foglalkozzék, vitával igyekezzék azokat tisztázni és ne szétágazó kiselőadások áradatával szolgáljon. Ez a koncepció mindenkinek tetszett, de nem tartotta magát mindenki szigorúan ehhez, amennyiben elfoglalták az idő egy részét előadásszerű „hozzászólások", amelyek nem irányultak a főprobléma tisztázására. Az is igaz, hogy tapintatból nem közöltük a felkért előadókkal, hogy a kérdés összefoglaló ismertetését nyújtsák, és így a bevezető előadások inkább foglalkoztak az előadó személyes eredményeivel. Annál inkább igazolja a szervezési elgondolás helyességét, hogy mégis legtöbbször a főkérdésre terelődött a vita, amelyben méltón vették ki részüket a hazai izomkutatók is.

KÖNYVISMERTETÉS

G. ERDTMAN: *Pollen and Spore Morphology (Plant Taxonomy. — Gymnospermae, Bryophyta (Text) 1965. — Almqvist and Wiksell) Stockholm p. 1—191. és 24 fényképtábla.*

G. Erdtman svéd professzor, a palynológia egyik legkiválóbb képviselője, könyvtárnyi munkásságát új kötettel gazdagította. Ez a kötet egy sorozat 3. tagja. Az első kötet az „Angiosperms (An Introduction to Palynology I.)", amelyben 539 oldalon az általános palynológiai, alapismereteket közlő bevezető után, alfabetikus sorrendben számos zárvatermő család pollenjét ismerteti. A családok rövid, általános jellemzése után az általa vizsgált fajok rövid jellemzése következik. Az illusztrációk — családonként általában 2—3 db. — jó minőségű, vonalas rajzok.

A második kötet 1957-ben jelent meg „Gymnospermae, Pteridophyta, Bryophyta (An Introduction to Palynology II.)" címmel. Itt 151 oldalon pollenek — spórák ábráit közli, mégpedig 1—44. oldalon Gymnospermae pollenekről, 45—97. oldalon Pteridophyta, 98—124. oldalon Bryophyta spórákról.

Az ábrák zöme szintén vonalas rajz, azonban főleg a Gymnospermae rajzok egyes részeit, pollenek struktúráját feltüntető fényképrészletekkel egészítette ki. Ezeken az ábrákon kívül — a pollenekről igen jó minőségű 4000× — fáziskontraszt felvételek, valamint helyenként igen erős nagyítású elektronmikroszkópi felvételeket közöl.

Két fontos rövid cikk egészíti ki a kötetet:

B. M. Afzelius: „On new methods in physical cell research and their application in studies of pollen grains and spores" című cikkében elektronmikroszkópi, polarizációs mikroszkópi, röntgen difractio, UV és interferencia mikroszkópok alkalmazását ismerteti. J. R. Praglowski: „On the cutting of ultra — thin section" című közleményében — rajzokkal illusztráltan — ismerteti az ultravékony metszetek készítését spórákból, pollenekből.

A második kötet kiegészítője a 3. (Az Introduction to Palynology III.) A kötetben uralkodó a szöveg. Először a Gymnospermae családok leírásai vannak — 9—82. oldalon — hasonlóan az Angiospermae családok leírásaihoz (az első kötetben).

Következnek a 83—156. oldalon a Bryophytákról szóló leírások. Majd bőséges bibliográfia — 157—191. oldalon — zárja a szöveges részt.

A szövegközti kiegészítő ábrák (Gymnospermae 20 db, Bryophyta 8 db) azonban már nem vonalas rajzok, hanem igen jó minőségű 750×-től 2500× nagyítású fényképek. 1—1 ábra általában egész oldalas fényképtáblázatot jelent. A felvételek olajimmerzióval, 1,40 apertúrával, fáziskontraszt mikroszkóppal, különböző színű szűrőkkel, ill. elektronmikroszkóppal filmlevonatról készültek. A kötetet lezáró 24 egész oldalas fényképtáblázat kizárólag Gymnospermae pollenekről — az előzőkhöz hasonló módszerekkel — készült, rendkívül jó minőségű fényképeket foglal magában.

A recens pollenek, spórák leírásánál utal bizonyos fosszilis formákra is, illetve különös figyelemmel azokat a recens genusokat közli, amelyekre a legújabb palynológiai irodalom fosszilis anyaggal kapcsolatban utal.

A palynológusok legfőbb kívánságát fejezi ki Erdtman e műben tett ígérete, hogy a IV. kötetben a Pteridophyta spórák mellett az Angiospermae pollenek kiegészítését is tervezi.

NAGY LÁSZLÓNÉ

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója

Műszaki szerkesztő: Farkas Sándor

A kézirat nyomdába érkezett: 1967. II. 15. — Terjedelem: 7 (A/5) ív, 14 ábra

67.63480 Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György

15,— Ft

TARTALOM

THOMA ANDOR: Az Előember nyakszirtcsontja a vértesszőllősi őstelepről 1
PINTÉR MIKLÓS: Baktériumok rendszerezése számítógéppel 21
ALIKHANIAN SZ. I.: A molekuláris genetika kutatásainak fő irányzatai 35
SZABÓ GÁBOR—VITÁLIS SÁNDOR és BÉKÉSI ISTVÁN: A differenciálódás tanulmányozása mikroorganizmusokon 53

BESZÁMOLÓK

SÁRKÁNY SÁNDOR: A II. Magyar Növényanatómiai Szimpozium 61
TIGYI JÓZSEF: Az Izomszimpozium 73

KÖNYVISMERTETÉS

G. ERDTMAN: Pollen and Spore Morphology (Plant Taxonomy. — Gymnospermae, Bryophyta (Text) 1965. — Almqvist and Wiksell, Stockholm p. 1—191. és 24 fényképtábla. (Nagy Lászlóné) 79

Megjelent 1967. V. 31.

Index: 26.496

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK

KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTI

STRAUB F. BRUNÓ

X. KÖTET 2. SZÁM

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

1967

BIOL. OSZT. KÖZL.

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK
KÖZLEMÉNYEI

A SZERKESZTŐ BIZOTTSÁG TAGJAI
DUDICH ENDRE, GYŐRFFY BARNA, SOÓ REZSŐ,
SZENTÁGOTHAI JÁNOS, TÖRŐ IMRE, ZÓLYOMI BÁLINT

SZERKESZTI
STRAUB F. BRUNÓ

TECHNIKAI SZERKESZTŐ
DÉZSI LÁSZLÓ

SZERKESZTŐSÉG: MTA BIOLÓGIAI OSZTÁLYA BUDAPEST V., NÁDOR U. 7.

KIADÓHIVATAL: BUDAPEST V., ALKOTMÁNY UTCA 21.

A Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Osztályának Közleményei változó terjedelmű füzetekben jelennek meg. Négy füzet alkot egy kötetet. Évenként egy kötet jelenik meg.

Az MTA Biológiai Osztályának Közleményei részére kéziratok a következő címre küldendők:

Budapest V., Nádor u. 7., Dézsi László technikai szerkesztő.

Minden szerzőt 100 különlenyomat és nyomtatott ívenként 400 forint tiszteletdíj illet meg megjelent munkájáért. Közlésre el nem fogadott kéziratokat a szerkesztőség lehetőleg visszajuttat a szerzőhöz, de felelősséget a beküldött kéziratok megőrzéséért vagy továbbításáért nem vállal.

A Közlemények előfizetési ára kötetenként belföldi címre 40 forint, külföldi címre 60 forint. Megrendelhető belföldre az Akadémiai Kiadónál (Budapest V., Alkotmány u. 21. Bankszámla: 05-915-111-46 sz.) külföldre a „KULTÚRA" Könyv- és Hírlap-Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest I., Fő utca 32. Bankszámla: 43-790-057-181 sz.) vagy annak külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

A Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Tudományok Osztálya és Orvosi Tudományok Osztálya a következő idegen nyelvű folyóiratokat adja ki:

Acta Biochimica et Biophysica
Acta Biologica
Acta Botanica
Acta Chirurgica
Acta Medica
Acta Microbiologica
Acta Morphologica
Acta Paediatrica,
Acta Physiologica,
Acta Zoologica

E lapok hivatottak a magyar biológiai és orvosi tudományok eredményeinek legjavával a külföldet megismertetni.

A cikkek angol, német, francia vagy orosz nyelven jelennek meg, a szerző kívánsága szerint, összefoglaló pedig további egy ill. két nyelven. A dolgozatot magyar vagy a megfelelő idegen nyelven az alábbi címekre kell beküldeni:

Acta Biochimica et Biophysica szerkesztősége, Budapest XI. Karolina út 29. (Dr. Boross László).

Acta Biologica szerkesztősége, Budapest IX. Tűzoltó u. 58. (Dr. Bernád Irén).

Acta Botanica szerkesztősége, Budapest XIV. Vajdahunyadvár, Növénytár (Dr. Allodiatoris Irma).

Acta Chirurgica szerkesztősége. Budapest VIII. Üllői út 78/b. Urológiai Klinika (Dr. Rényi-Vámos Ferenc).

Acta Medica szerkesztősége, Budapest VIII. Szigony u. 43. KOKI (Dr. Stark Ervin)

Acta Microbiologica szerkesztősége, Budapest IX. Gyáli út 4. OKI (Dr. Dömök István)

Acta Morphologica szerkesztősége, Budapest IX. Tűzoltó u. 58. Szövet- és Fejlődéstani Intézet (Dr. Bernád Irén).

Acta Paediatrica szerkesztősége, Budapest VIII. Bókay János u. 53. I. sz. Gyermekklinika (Dr. Véghelyi Péter).

Acta Physiologica szerkesztősége. Pécs, Rákóczi út 80. (Dr. Korányi Lajos).

Acta Zoologica szerkesztősége, Budapest VIII. Baross u. 13. Természettudományi Múzeum (Dr. Soós Árpád).

A TALAJZOOLÓGIA FELADATAI*

BALOGH JÁNOS

Akadémiai székfoglaló előadás

A Föld florisztikai és faunisztikai kikutatása napjainkig lényegében befejeződött. Óvatos becslések szerint legalább kétmillió növény- és állatfajt írtak le s bár ez a szám még ma is minden évben növekedik: nagy meglepetésekre, a Föld élővilágáról megalkotott képünk lényeges módosulására nem számíthatunk.

Az élővilág számbavételét tehát nagyjából elvégeztük, de egészen a legutóbbi időkig nagyon keveset tudunk arról, hogy Földünk bioszférája, mint anyag- és energiaforgalmazó rendszer miképpen működik. Kevéssel a második világháború befejezése után az Egyesült Nemzetek Szervezetének kezdeményezésére megindult az emberiség potenciális energiakészleteinek felmérése. Az első lépések megtétele után azonban kiderült, hogy egy sor létfontosságú kérdésben — mint például a szűz területek művelésbe-vétele, vegyianyagok mezőgazdasági alkalmazása — nem tudnak megnyugtató megoldásokat találni mindaddig, amíg egy sereg biológiai alapkutatást el nem végeznek. Ezek az alapkutatások szinte kivétel nélkül az élővilág előbb említett szervesanyag- és energiaforgalmazásával vannak kapcsolatban. Más szóval kiderült, hogy az úgynevezett produkciósbiológia, amely a második világháborút megelőző évtizedben látszólag mint teljesen elméleti diszciplína született meg, a Föld biológiai hasznosításának egyik legfontosabb tudományos elméletévé vált.

A Föld élelmezésével foglalkozó szakemberek többé-kevésbé egyértelműen meg is fogalmazták azokat a kérdéseket, amelyeknek megoldását a biológusoktól várják.

1. Első helyen az a kívánság merült fel, hogy a Föld természetes fotoszintetikus potenciálját becsüljük fel és igyekezzünk megközelítőleg megállapítani, hogy a fő vegetációtípusok, az ún. biomok, mennyi szerves anyagot, és milyen hatásfokkal produkálnak.

2. Ezt követően próbáljuk megállapítani, hogy a fotoszintézis útján

* Elhangzott a Magyar Tudományos Akadémián 1967. ápr. 19-én.

megtermelt biomassza milyen biológiai energiapályákon, milyen mennyiségben és mekkora veszteségek árán kerül a természetben fogyasztásra.

3. Végül hasonló módon mérjük fel a talajba jutó szerves hulladék biomasszáját és igyekezzünk azokat a folyamatokat kideríteni, amelyek természetes viszonyok között a talajok biológiai leromlását megakadályozzák.

A kérdések feltevéséből világosan látszik, hogy a világ élelmezésének szakemberei azoknak az új utaknak kereséséhez kérték a produkciósbiológusok segítségét, amelyeken az elkövetkező ötven évben a létszámának kétszeresére növekedő emberiség élelmezését akarják megoldani.

A magyar biológia a háború és az azt követő gazdasági nehézségek okozta kényszerű szünet után két okból is kedvező helyzetben indulhatott el ezen az úton. Egyrészt a magyar szakkörökben: biológusaink, mezőgazdasági szakembereink soraiban élénk érdeklődés és nagy segítőkészség nyilvánult meg törekvéseink iránt. Eszmecserékkel, vitákkal, bírálattal jöttek segítségünkre és ezekben a kérdésekben szinte állandó szellemi érintkezés alakult ki Budapest, Debrecen, Vácrátót, Sopron, Tihany, Szeged rokonterületen vagy határterületen dolgozó tanszékeivel, intézeteivel. Ezeknek a szellemi partnereknek egy része már távozott sorainkból, így csak emlékük előtt hajolhatok meg. Sokan mások itt vannak közöttünk, úgyhogy személyesen is megköszönhetem azt a segítséget, amelyet munkánkban nyújtottak. Kérem, engedjék meg, hogy ne soroljam fel neveiket: a névsor hosszúra nyúlnék. De egy nevet, mesterem és professzorom: Dr. Dudich Endre Kossuth-díjas akadémikus nevét megtisztelő kötelességemnek tartom külön megemlíteni. Az ő kezdeményezésének köszönhettem, hogy már fiatalon ezek felé a kérdések felé fordult a figyelmem. Később szárnyai alá vette az induló Talajzoológiai Kutatócsoportot és minden lehetőséget megadott munkánk kibontakozására. Így hálánk mellett magáénak mondhatja azokat az eredményeket is, amelyeket mi, mint az ő tanítványai értünk el.

A másik ok, ami a produkciósbiológia háború utáni fejlődésének kedvező feltételeit biztosította, hogy az újjászervezett Magyar Tudományos Akadémián felismerték ezeknek a kutatásoknak a jelentőségét és a munkához szükséges támogatást folyamatosan biztosították.

Én és a körülöttem csoportosuló kutatók a produkciósbiológiával, annak főképp egyik fejezetével: a talajzoológiával foglalkoznak. Ez a fejezet azt a szerepet vizsgálja, amelyet a talajállatok a talajba kerülő szerveshulladék lebontásában visznek. A Magyar Tudományos Akadémia két alkalommal is módot adott arra, hogy eredményeinkről ezen a fórumon számoljunk be [8, 3], ezért most felmentve érzem magamat az alól, hogy részeredményekről beszéljek, vagy ismétlésekbe bocsátkozzam. Ehelyett a világ talajzoológiai kutatásának pillanatnyi helyzetét és soron levő feladatait vázolom, a megrajzolt képbe beleillesztve saját tudományos eredményeimet és azokat az ered-

ményeket, amelyeket a velem közel két évtizede együtt dolgozó tudományos kollektíva produkált.

* * *

Néhány kevéssé fontos kivételtől eltekintve minden földi élet alapja a fotoszintézis. Ennek során — mint ismeretes — a Nap sugárzó energiája a növényben tárolt, potenciális energiává alakul át. Közvetlenül vagy közvetve ez az energiaforrás az állati és az emberi élet fenntartója. Különféle becslések és számítások alapján a Nap földünkre érkező energiája évente $5 \cdot 10^{20}$ kilogrammkalóriára tehető. Az óceánok és a szárazulatok területi arányának megfelelően az $5 \cdot 10^{20}$ kilogrammkalória sugárzó energiából $3{,}6 \cdot 10^{20}$ jut az óceánokra, $1{,}4 \cdot 10^{20}$ a szárazulatokra. Ma már eléggé megbízható adatok állnak rendelkezésünkre ahhoz, hogy a különböző éghajlati övek, földrészek és növénytakarók szervesanyagprodukciója alapján elfogadható megközelítéssel számíthassuk ki a szárazulatok összprodukcióját. Ez az érték évi $30 \cdot 10^9$ tonna szárazanyagra tehető. Ennek legalább egyharmada: évi $10 \cdot 10^9$ tonna szárazanyag kerül bele Földünk talajába, hogy ott bonyolult és ma még hiányosan ismert biológiai, kémiai és fizikai folyamatokon keresztül dekomponálódjék. A talaj élővilága tehát ilyen hatalmas tömegű szerves hulladék feldolgozásában vesz részt. A nagyságrend érzékeltetésére megemlítem, hogy a Föld egész vegyi, kohászati és bányászati ipara ennek egytizedét: évente 10^9 tonna anyagot mozgósít, ill. termel.

Ezek az átlagértékek azonban nem adnak reális képet a Föld szervesanyagkészletének területi megoszlásáról, mert a különböző éghajlati és növényzeti övek produkciója között nagyok az eltérések. A Föld sivatagjai és gyérfüves területei mindössze 0,1 gr(m^2)nap produktivitással rendelkeznek. Sajnos, ebbe a zónába tartozik a szárazulatoknak 45%-a, ha az Antarktiszt, a Föld többi jéggel fedett területeit és az ember által teremtett mesterséges sivatagokat-ipartelepeket, beépített területeket — is ideszámítjuk. Ennek a mennyiségnek tízszeresét : 1 gr(m^2)nap szárazanyagmennyiséget produkálnak a Föld sztyeppes és szavannás területei azokon a részeken, ahol a körülmények mostohasága miatt legfeljebb csak időszakos mezőgazdaság űzhető. Ezek a területek a Földnek mintegy 17%-át borítják. Ismét tízszeresére: 10 gr(m^2)napra, felső értékként 25 gr/napra, ugrik az erdővel és az örökzöld rétekkel borított, valamint az intenzív mezőgazdaság alá vont területek hozama. Ide tartozik a Földnek erdőségekkel borított, mintegy 28%-a és az intenzív mezőgazdaság alatt álló 10%-nyi terület. Látjuk tehát, hogy a Föld szárazanyag-produkciójának kereken 80%-át intenzív mezőgazdasági művelés alatt álló és az erdőkkel borított területek adják. A világszerte folyó kutatások — köztük a mi talajzoológiai vizsgálataink is — éppen ezért ezekre a területekre koncentrálódnak.

Amilyen megdöbbentően magas a talajba kerülő szerves hulladék évi mennyisége, éppen olyan nagy a talajállatok biomasszája is. Ezeknek az értékeknek megközelítésével magam és munkatársaim két évtizede foglalkozunk. Első eredményeinket 1946 és 1952 közötti időben publikáltuk; a használt metodikát 1953-ban [1] és 1958-ban [2] megjelent könyveimben közöltem. Számos újabb eredményt, adatot közöl LOKSA nemrég megjelent nagy munkája is [14]. Főbb eredményeinket a nemzetközi irodalom átvette; módszereink — részben továbbfejlesztve — azóta is használatban vannak. Vizsgálataink, és a Föld különböző részein végzett hasonló kutatások eredményeinek kiértékelése alapján kiszámítható, hogy a Föld mezőgazdasági művelés alatt álló és erdőkkel borított területeinek talajfaunája hússzorosát teszi ki a ma élő 3 milliárd ember biomasszájának.

A talajállatok óriási biomasszája mindössze néhány állatcsoportban inkarnálódik. Legnagyobb része — mintegy 80 súlyszázalék — gilisztákkal van képviselve. Ezek az állatok a Föld trópusi és mérsékelt égövi talajaiban erdőkben és mezőgazdasági talajokban egyaránt nagy mennyiségben élnek. Jóval kisebb, de még mindig nagyon számottevő az ikerszelvényesek, a talajlakó rovarlárvák, a hangyák és a termeszek mennyisége. Végül, bár súlyuk az előbbi két csoportnál ismét jóval kisebb, óriási példányszámuk és tömegükhöz mérten nagy aktív felületük következtében nagyon fontos energiaforgalmazó szerepet töltenek be az úgynevezett mezofauna képviselői: a fonálférgek, a talajatkák és az ugróvillás rovarok is. Ezek az állatok a Föld minden talajában előfordulnak, kivéve azokat a területeket, ahol vízhiány vagy örök fagy gátolja életüket. Ez az a néhány állatcsoport, amely a talajban élő mikroorganizmusokkal együtt részt vesz az évi $10 \cdot 10^9$ tonna talajba kerülő szárazanyag feldolgozásában. Ezért ezeknek az állatcsoportoknak produkciósbiológiai vizsgálatára koncentráltuk mi is erőinket.

A régebben használt produkciósbiológiai felosztás szerint az élővilágnak három fő anyag- és energiaforgalmazó típusát különböztetjük meg: 1. termelőket, producenseket, amelyek fotoszintézis útján az élővilág élőanyagkészletét növelik; 2. fogyasztókat, konszumenseket, amelyek az előanyagkészletet csökkentik és 3. lebontókat, reducenseket, amelyek az élővilág-termelte szerves hulladékot lebontani segítik vagy lebontják. Nyilvánvaló, hogy a talajállatok legnagyobb része ebbe a harmadik csoportba tartozik. Ez a hármas felosztás, mint legtöbb tipológiai felosztás, csak tökéletlenül tükrözi a valóságot. Már 1953-ban [1] rámutattam arra, hogy az anyag- és energiaforgalmazást lebonyolító élelmi láncok az egész Földön két egymástól alapvetően eltérő energiabázisra épülnek fel. Ennek megfelelően a talajállatokat is két típusba sorolhatjuk: élőanyagból és szerves hulladékból táplálkozó élőlényekre. Az élőanyagból táplálkozó szervezetek — ahogyan azt korábban is helyesen látták — a Föld élőanyagkészletét csökkentik; a szerves hulladékból táplálkozó élőlényeknek azonban nem egyedül a lebontás a funkciója. Ebben a

típusban két altípust különböztethetünk meg. Az egyikbe igen kis méretű és nagy anyagcsereintenzitású élőlények: a mikroorganizmusok és részben a mezofauna tagjai tartoznak. Ezek a Föld szerves hulladékhoz kötött energiakészletét rohamosan csökkentik. A másik altípusba nagyobb termetű élőlények tartoznak, amelyek viszonylag jóval kisebb energiafelhasználás mellett testükben számottevő mennyiségben raktároznak is. Ezen kívül viszonylag nagy mennyiségű ürüléket termelnek, amelyet a koprofág szervezetek tovább fogyasztanak és saját testükbe beépítve ismét raktároznak. Nyilvánvaló, hogy a mikroorganizmusok és az itt említett nagyobbtestű, hulladék- és ürülékfogyasztó állatok antagonista hatást fejtenek ki. Az utóbbiak lassítják a szerves hulladék energiaveszteségét és a rendszer energiakészletének egy részét a baktériumok elől mintegy visszaszerzik az élő biomassza energia lépcsőjére. A hulladék- és ürülékevő szervezeteknek ezt a funkcióját rekuperációnak neveztem el [1, 4].

A rekuperációs folyamatok jelentőségének felismerése után módosítani kellett azt az anyag- és energiaáramlási schémát, amelyet korábban LINDEMAN [13] állított fel. Eszerint az Elton-féle számpiramis úgy tekinthető, mint egymás fölé rendezett élelmi láncszemek összessége. Minden láncszem egy úgynevezett energia-lépcsőnek fogható fel, amely anyagot és energiát ad át a következőnek. Az első energialépcső, amelyet LINDEMAN az angol „level" szónak megfelelően a görög lambdával (λ_1) jelölt, a fotoszintézist végző növényeket foglalja magába. A λ_2 szint a növényeket közvetlen fogyasztó állatokat, az úgynevezett elsődleges fogyasztókat, primer konszumenseket jelöli; a λ_3 az elsődleges fogyasztókat evő másodlagos konszumenseket, és így tovább. . . . Anélkül, hogy a kérdést tovább részletezném, nyilvánvaló, hogy az élőanyagbiomasszát jelképező Elton-piramist minden életközösségben egy szerves hulladékot jelképező második piramissal kell kiegészíteni, amelynek egyes-energia-lépcsőit λ'_1, λ'_2, és így tovább energia-lépcsőknek jelölhetjük. A Lindeman-féle piramisos ábrázolást tehát egy csúcsával egymásra állított kettős piramissal kellett helyettesíteni, amely a Földön folyó energiaáramlást a rekuperáció figyelembe vételével a valóságnak megfelelően mutatja be.

A rekuperációval kapcsolatos általános megállapításokat követően munkatársaimmal együtt a kérdés mennyiségi oldalával kezdtünk foglalkozni. Egyrészt azt akartuk megtudni, hogy a hullott lombot evő talajállatok beépítése és üledéktermelése mekkora; másrészt célul tűztük ki, hogy a főbb magyarországi erdőtípusok alomfogyasztóinak sűrűségét megállapítsuk. Ebből a két adatból kívántuk kiszámítani a magyarországi erdők talajfaunájának lebontó és rekuperációs tevékenységét. A kettős feladatnak megfelelően egyrészt tenyésztési kísérleteket kellett végezni, másrészt az egész országra kiterjedő, intenzív talajfauna-vizsgálatokat. Kutatócsoportunk ennek megfelelően osztotta fel a feladatokat, sőt a munka később a mezőgazdasági talajok vizsgálatával is kibővült. Fiatal munkatársaim: Loksa Imre, And-

rássy István, Gere Géza és Zicsi András kandidátusok, nagyrészt töretlen úton jártak és többnyire maguk voltak kénytelenek kidolgozni az állatcsoportjukhoz, kísérleteikhez szükséges methodikát is. Munkájuk nyomán néhány év leforgása alatt négy értékes kandidátusi értekezés született meg és a nemzetközi figyelem is egyre jobban kutatásaink felé fordult. Ekkor már több európai országban folytak a miénkhez hasonló kutatások, úgyhogy alkalom nyílt az eredmények összehasonlítására is. A különböző helyeken, egymástól nagyrészt függetlenül folyó vizsgálatok azt bizonyították, hogy a szerves hulladékot fogyasztó talaj állatok ürüléktermelése rendkívül magas. Száz rész felvett táplálékból 85—95 részt ürülék formájában juttatnak vissza a talajba.

A rekuperációval kapcsolatos eredmények egyre inkább az ürülékprodukció mennyiségének vizsgálatára terelték a figyelmet. Így került sor a primer konszumens növényevők ürülék-biomasszájának és az azzal kapcsolatos rekuperációs jelenségeknek vizsgálatára is. LAURENCE angol kutató az angliai legelők produkciós-biológiai vizsgálata során megállapította, hogy a legelőkön évente 19-szer annyi marhaürülék termelődik, mint az ürüléket termelő állatok súlya [12]. Az ürüléket fogyasztó koprofág rovarok pedig a rekuperáció során évente a tehenek súlyának egyötödét reinkarnálják. Ez más szóval azt jelenti, hogy egy 500 kg súlyú tehén után évente 100 kg koprofág rovar keletkezik, kereken 10 000 kg ürülék elfogyasztása árán.

Ezek az arányok meglepő összefüggésekre mutattak rá. A Föld különböző részein végzett biomasszamérések összehasonlítása után kiderült, hogy például Afrika nagy nemzeti parkjaiban az évi ürüléktermelés szárazanyagmértékben hektáronként 40 métermázsát tesz ki [11]; többet, mint a középeurópai lomberdők évi avarprodukciója. A maximumot a hollandiai intenzíven kezelt legelőkön találták, 250 métermázsa/hektár; a minimumot az argentin pampákon, 10 métermázsa/hektár értékekkel. Az ürülék: koprofág-rovar 1%-os évi arányát véve alapul kiderült, hogy az afrikai nemzeti parkokban 40 kg/hektár, a holland legelőkön 250 kg/hektár, az argentin pampákon 10 kg/hektár az évente keletkező rekuperáns koprofág rovarok súlya. Ezekkel az adatokkal kapcsolatban emlékeztetni szeretnék a talajállatok összsúlyára, amelyet bevezetőmben közöltem. Ez az érték 60 kg/hektár volt, vagyis megközelítően annyi, mint az afrikai nemzeti parkokban a koprofág rovaroké. A koprofág állatok biomasszája tehát az egész Földön — a talajállatokéhoz hasonlóan — többszörösen felülmúlhatja az emberiség biomasszáját.

Az eddig elmondottak azzal a meglepő végkonklúzióval járnak, hogy az állati élet a Földön a talajban, elsősorban az erdőtalajban, és ürülékekben éri el a legnagyobb koncentrációt. Ez a koncentráció a talajban 500 kg/hektár érték körül mozog, tehát több mint kétszeresen felülmúlja azt a legmagasabb értéket, amelyet a Föld természetes viszonyok között pl. nagyvadakban, az afrikai rezervátumokban produkál.

Kétségtelen, hogy ezek a megdöbbentő számadatok alaposan átalakítják azt a képet, amely az állati élet eloszlásáról bennünk élt. Megállapításainknak azonban fontosabb tanulságai is vannak. Olyan területeken, ahol az emberi beavatkozás következtében az élettelen szervesanyagok mennyisége hirtelen csökken, ezzel együtt megsemmisül a koprofág fauna vagy a talajfauna nagy része is. Kérdés: milyen hatással jár ez a talaj életére és ezen keresztül az ember táplálkozására. Közismert példa erre India esete. Indiában — hasonlóan sok más, tüzelőanyagban szegény területhez — a tehéntrágyát tüzelésre használják. Az évente elégetett trágya 65 millió tonnát, az egész trágyatermelés 25%-át teszi ki. Ezzel a trágyamennyiséggel potenciálisan olyan hatalmas koprofág rovarmennyiséget semmisítenek meg, amely 10 millió ember súlyának felel meg. Sokáig azt hitték, hogy a trágyaégetés pusztán mint szervesanyagveszteség jelent kárt, de újabban kiderült, hogy a koprofág fauna potenciális megsemmisítése is súlyos következményekkel jár. Ennek a feltevésnek bizonyítására a véletlen óriási méretű szabadföldi kísérletet állított be Ausztráliában.

Ausztrália eredeti állatvilágából — mint ismeretes — hiányoznak az igazi emlősök. Nagy termetű növényevők csak a kengurufélék; ezek azonban a kérődzőktől eltérő módon emésztenek és más jellegű ürülléket termelnek mint pl. a szarvasmarha. Ezért a jellegzetes ürülékevő ganéjtúró bogarak Ausztrália állatvilágából majdnem teljesen hiányoznak. Ez a hiány a szarvasmarha meghonosítása, de főképpen tömeges elszaporítása után az ausztráliai legelőkön meglepő jelenségekhez vezetett. Az ürülék a rendkívül kedvezőnek látszó, nedves, meleg időjárás ellenére sem bomlik el, hanem felhalmozódik és egyre nagyobb területet von el a legeltetéstől. 1965-ös ausztráliai utamnak egyik célja volt, hogy ezt a kérdést a helyszínen tanulmányozhassam. A kérdés kiváló szakértőjével, a magyar származású dr. Bornemissza Györggyel közel 3000 kilométeres utat tettem meg és a legelőket a mérsékelt övi részektől egészen az észak-ausztráliai trópusi területekig tanulmányozhattam. Az ausztráliai legelők helyzete megdöbbentőnek mondható. Előrebocsátom, hogy a világ egyik legfejlettebb, legkorszerűbben kezelt legelőterületéről van szó. Különösen Queenslandben, a brisbanei körzetben produkálnak igen magas húshozamot. A legelőkön azonban évente 33 millió tonna szárazsúlynak megfelelő ürülék marad azért, mert beásásukhoz, elfogyasztásukhoz hiányoznak a ganéjbogarak. A kár, amely a területet éri, több tényezőből tevődik össze. A felszínen maradó trágya kilúgozódik, értékes tápanyagai nagyrészt elpusztulnak. Gyakorlatilag a 33 millió tonna trágyát majdnem százszázalékos tápanyagveszteségnek lehet tekinteni. A visszamaradó, vázszerű tömeg hosszú ideig, becslések szerint 2—3 évig a felszínen marad, az alatta levő fű elpusztul, felszínét és közvetlen környékét legelésre alkalmatlan gyomnövények növik be. Évente mintegy 1000 km² terület esik így ki a legeltetésből és hozzávetőleges számítások szerint egyedül a tej- és húshozam potenciális kiesé-

sével évi 10 millió dolláros kár keletkezik. A talaj egészséges biológiai egyensúlyának visszaállítására koprofág bogarakat kell betelepíteni és mintegy 300 000 tonna évi összsúlyra felszaporítani [5]. Az arányok érzékeltetésére megemlítem, hogy a szükséges bogármennyiség 5 millió ember, a mai ausztráliai lakosság fele súlyának felel meg.

* * *

Fontos tudományos célokat tűztek maguk elé azok az expedíciók is, amelyet Afrika és Dél-Amerika trópusaira tettünk. Ezekre az expedíciókra — mint ismeretes — az UNESCO támogatásával került sor, hogy a szóban forgó területeken a trópusi őserdők talajfaunáját összegyűjtsük és az érintetlen, a művelés alá vont és a degradált területek talajfaunáját összehasonlítsuk. A kutatások tehát eredetileg feltáró, adatgyűjtő céllal indultak; távolabbi célkitűzéseink azonban túlmutattak ezeken a közvetlen célokon. A trópusi őserdők majdnem háromszor annyi szervesanyagot termelnek, mint a legjobb mérsékelt övi erdők. Az utóbbi években elvégzett, eléggé kisszámú és ötletszerű vizsgálat azt mutatta, hogy a trópusi őserdők talajfaunája fajban ugyan gazdag, de meglepően alacsony biomasszát képvisel. A többnyire becsléses adatok szerint ezeknek az erdőknek avarszintje nagyon vékony és nem áll arányban azzal a hatalmas fa- és levéltömeggel, amelyet a fotoszintézis ezekben az erdőkben produkál.

Valószínűleg ezzel a kis szervesanyagtartalékkal van összefüggésben, hogy az őserdők helyén telepített trópusi mezőgazdaság sok esetben nem váltja be a hozzáfűzött reményeket. A kezdetben magas hozamok néhány év alatt csökkennek és a talaj néha annyira degradálódik, hogy a mezőgazdasági művelésre teljesen alkalmatlanná válik.

Lényegesen kedvezőbbnek látszik a helyzet egyes helyeken, ahol a kiirtott őserdő helyére állandó legelőt telepítenek. Főképpen az ausztráliai Queenslandben lehet jól gondozott, kiváló állapotban levő, magashozamú trópusi legelőket találni. Ausztrália mezőgazdasági szakemberei joggal büszkék az itt elért gyakorlati eredményekre és ottlétemkor nem minden célzatosság nélkül mondották, hogy íme a mezőgazdasági szakemberek minden talajbiológia: a talajfauna vagy a mikroorganizmusok tanulmányozása nélkül is sikeresen oldották meg a feladatukat.

Az igazság az, hogy az ausztráliaiak a legelők létesítése során többékevésbé különféle produkciósbiológiai szempontokat érvényesítettek. Ezeknek a megértéséhez azonban vissza kell térnünk azokra a vizsgálatokra, amelyeket intézetünkben a talajállatok anyagcseréjére, anyagcsereintenzitására vonatkozóan végeztünk. Ismeretes, hogy a különböző nagyságú állatok anyagcsereintenzitása változatlan külső körülmények között is eltér egymástól. Az eltérés az állat felületének és tömegének viszonyából adódik. Az alak tekintetében megközelítőleg megegyező nagy és kis állatok felületének egymáshoz való

viszonya a $3\sqrt{g^2}$ aránynak felel meg, ahol g az állat súlyát jelenti. Ez az arány azt jelenti, hogy minél kisebb egy állat, annál élénkebb az anyagcseréje; vagyis annál nagyobb a lebontó működése a talajban. Ennek következtében táplálékfogyasztása is az előbbi összefüggéssel arányosan növekedik. VAN DER DRIFT holland kutató két avarevő állatra nézve elvégzett már egy ilyen kísérletet; a kísérlet azonban éppen csak az értékelhetőség határán volt [7]. A szóban forgó avarevő ikerszelvényesek laboratóriumi tenyésztése tulajdonképpen még nem volt megoldva; munkatársamnak, GERE GÉZÁNAK kellett a methodikát kidolgozni [10]. Az új metódussal elvégzett hosszú tartamú kísérlet igazolta elképzeléseinket: a Van der Drift-féle állandó: $3\sqrt[c]{g^2}$, ahol c az időegység alatti fogyasztást jelenti, különböző fajú, különböző életkorú avarevő állatok esetében is érvényes.

Az elmondottak alapján két különböző nagyságrendbe tartozó állatfaj vagy állatcsoport egymáshoz viszonyított oxigén- ill. táplálékfogyasztását kiszámíthatjuk, ha ismerjük a két faj testsúlyát és egyedsűrűségét. Ezek a számítások magyarországi lomberdők makrofaunájának és mezofaunájának súlyviszonyát 6 : 1-től 10 : 1-ig arányúnak; oxigénfogyasztásukat viszont a testnagyságbeli különbség alapján a $3\sqrt{g^2}$ arány szerint 1 : 20-tól 1 : 40 arányúnak mutatták [1, 8]. Bebizonyosodott tehát, hogy a mezofauna nagy anyagcsere-intenzitása következtében jelentéktelen tömege ellenére is fontos szerepet visz az erdei avar lebontásában.

Trópusi kutatásaink megkezdésekor abból a feltevésből indultam ki, hogy azok a törvényszerűségek, amelyeket az előbb magyarországi vizsgálataink alapján fő vonásokban ismertettem, trópusi talajokban is érvényesek. A talajállatok anyagcsereintenzitását azonban egy tényező: a hőmérséklet, trópusokon döntően befolyásolja. Mivel a hőmérsékleti tényezőt trópusi talajokkal kapcsolatban eddig még nem tanulmányozták, a hidrobiológiában kerestem analógiákat. DIETRICH és KALLE [6] számításokat végeztek arra vonatkozóan: miképpen befolyásolja a hőmérséklet a tengeri állatok biomasszáját. Szerintük azt a közismert tényt, hogy a sarki tengerek állatvilága gazdag, a trópusi tengereké szegény, jórészt hőmérsékleti különbségekkel lehet magyarázni. A két tenger közötti, mintegy 25° C-os, hőmérsékletkülönbség a trópusi vizekben az anyagcsereintenzitás olyan nagyfokú növekedést idéz elő, hogy a raktározás teljesen háttérbe szorul és az állatvilág kénytelen a biomassza 9/10 részét felemészteni.

A jelek szerint hasonló esettel állunk szemben a trópusi őserdőkben is. A magas hőmérséklet rendkívül felfokozza a talajállatok anyagcseréjét és valószínűleg ugyanígy hat a mikrobiológiai folyamatokra is. Ez a felfokozott anyagcsere a talajba kerülő élettelen szerves anyagokat szinte teljesen felemészti, annak ellenére, hogy a trópusi őserdők mintegy háromszor akkora szervesanyag-mennyiséggel rendelkeznek, mint a mérsékelt égöviek. Ennek

eredményeképpen a talajélet a trópusi őserdőkben igen vékony aktív rétegre s abban az európainál nem nagyobb biomasszájú talajfaunára szorítkozik, amely alatt, szinte átmenet nélkül, biológiai szerkezet nélküli laterit következik. Az őserdők talajának számottevő szervesanyag-tartaléka — olyan értelemben, mint a mérsékelt égövi lombhulló erdőkben — nincsen, mert a rendszer szervesanyagkészlete az élő növények testében található meg. Éppen ezért az őserdők kiirtása vagy felégetése majdnem az egész szervesanyagkészlet megsemmisítését jelenti: sokkal nagyobb kataklizmát, mint a mérsékelt égövi erdőkben.

* * *

A produkciósbiológiai vizsgálatok azt is beigazolták, hogy a természetben a hosszú élelmi láncok sokkal rosszabb hatásfokkal működnek, mint a rövidek. A növények a sugárzó energiának csak 0,1%-át hasznosítják; a primer konszumensek és a további lépcsők legfeljebb 10%-át a növényben tárolt energiának. Ez azonban csak durva megközelítése a valóságnak. Az állatok nagyságával és anyagcsereintenzitásával kapcsolatban elmondottak azt is nyilvánvalóvá teszik, hogy a kistermetű állatok sokkal rosszabb hatásfokkal raktároznak, mint a nagyobbak: az ilyen tagokra felépített élelmi láncok tehát igen rossz hatásfokúak. A trópusi őserdők élelmi láncai mindkét hátrányt egyesítik magukban: így nem meglepő, hogy a hosszú élelmi lánc végén elhelyezkedő nagy állatok: madarak, emlősök a nyugat-afrikai őserdőkben sokkal kisebb biomasszát képviselnek a szavannák rövid-élelmiláncos biomasszájával szemben. A tapasztalat általában azt bizonyítja, hogy a háromtagúnál hosszabb élelmiláncok az emberi táplálkozás szempontjából csak egészen kivételesen használhatók fel. Ilyen kivétel a halászat, amely négy-, sőt öttagú élelmilánc végén álló biomasszát: a ragadozó halak biomasszáját is hasznosítja. A ragadozó halak húsa azonban természetes viszonyok között rendkívül rossz hatásfokú energiatároló. Két évtizedes halászati adatok alapján kiszámították, hogy az Egyesült Államok parti halászata a $3 \cdot 10^6$ gr kalória/m^2/nap sugárzó energiából az élelmi lánc végén levő halhúsban 5 gr kalória/m^2/nap energiát ad az ember táplálkozásához. Ennek a rendszernek mindössze 0,00015% a hatásfoka. Ezek után könnyű megérteni; hogyan lehetséges, hogy a Föld 71%-át elfoglaló óceánok, bár növényi szárazanyag értékben éppúgy évi $30 \cdot 10^9$ tonnát produkálnak, mint a szárazulatok, miért csak 1%-kal járulnak hozzá az emberiség élelmezéséhez. A halászati példánál maradva érdemes megnézni: mi történik akkor, ha az ember ezt a hosszú élelmi láncot mesterségesen megrövidíti. Így történik a halastavakban, ahol 4-, illetőleg háromtagú élelmi láncokon át folyik a halhústermelés. Az évi halhúshozam ilyenkor a hektáronkénti több mázsás hozamot is könnyen túllépheti, sőt a szemünk előtt folyik a sikeres kísérlet, amely hínár- és más makrofitaevő ázsiai halak Magyarországra való betelepítésével az édesvízi élel-

miláncot kéttagúra rövidítette le és ezzel új perspektívát nyitott meg a gyors halhústermelés előtt. A halhústermelés ezen a kéttagú élelmi láncon át ezerszer jobb hatásfokú, mint a tenger természetes élelmiláncaiban, s ráadásul szárazföldi eredetű növényi takarmány adagolásával elméletileg majdnem korlátlanul fokozható.

Szándékosan vettem a példákat a hidrobiológiából, mert ez a tudományág fejlődésben a talajbiológia előtt áll és eredményei a múltban is sokszor irányt mutattak a talajbiológia számára. Így az elmondottak is egyértelműen azt az utat mutatják helyesnek, ha az őserdők helyére telepített mezőgazdaság a szokásos rövid élelmi láncokat építi ki. A tapasztalat szerint azonban az ültetvények pár év alatt kimerülnek, hiszen az előbb már láttuk, hogy az őserdők talajának bujaságáról és kimeríthetetlenségéről szóló hiedelem a mesék világába tartozik. Mint már említettem, kedvezőbb eredménnyel járt a trópusi állattenyésztés, vagyis az az eljárás, amelynek során a kiirtott őserdő helyére trópusi legelőt és húsállatokat, többnyire szarvasmarhát telepítenek. Queenslandben ezt a munkát a jelek szerint sikeresen végezték el. Megfelelő pillangóskeverék összeállításával sikerült elérni, hogy az a hatalmas fotoszintetikus potenciál, amely az eredeti növénytakaró Eucalyptus-erdőit építette fel, a trópusi legelőbe koncentrálódik és igen jó hatásfokú hústermelést biztosít. Úgy látszik, hogy a talaj hosszú háborítatlansága, amelyet a trópusi legelők az ültetvényekkel szemben biztosítanak, döntő körülmény a regeneráció és az új biológiai egyensúly szempontjából.

Bevezetőmben elmondottam, hogy a világ élelmezéséért dolgozó szakemberek három kérdést tettek fel a világ produkciósbiológusainak. Az első a Föld fotoszintetikus potenciáljának felmérését, a második a főbb természetes élelmi láncok hatásfokának felderítését, a harmadik a talajba jutó szerves hulladék sorsának nyomon követését kérte. A kutatók mind a három kérdésre megpróbáltak feleletet adni, de ezekben a feleletekben sok a feltevés és még több a hézag. Nagyjából és megközelítően meg tudjuk mondani, hogy hol vannak a fotoszintetikus termelés határai. Biztosan tudjuk, hogy a Föld biológiai tartalékai bőségesen elegendők egy mainál többszörösére megnövekedett emberiség éhségmentes ellátásához még akkor is, ha az élelmiszertermelést a hagyományos mezőgazdaságra, azaz fotoszintetikus élelmiszertermelésre építjük fel. Megismertük az élelmi láncokon át történő energiaáramlás főbb törvényszerűségeit és ennek alapján sikerült néhány olyan élelmiánc-modellt felépíteni, amelyen keresztül a természetesnél sokkal jobb hatásfokú energiakoncentrációt biztosíthatunk. Megismertük az európai talajok faunáját; nagyjából felmértük a világ talajába kerülő, dekomponálódó szerves hulladék tömegét és a dekomponálásban részt vevő talajállatok biomasszáját. Kiderítettünk néhány törvényszerűséget, amely a dekompozíció folyamán érvényesül. Végül a legutóbbi néhány évben megtettük az első tájékozódó lépéseket a biológiailag majdnem teljesen ismeretlen trópusi talajok irányába is.

Ez a rövid felmérés rendkívül nyugtalanító képet ad a produkciósbiológia s ezen belül különösen a talajzoológia helyzetéről. Szinte hihetetlenül hangzik az a tény, hogy az egész világon négy vagy öt olyan kutatócsoport működik, amely a mi öttagú csoportunkhoz hasonlóan, tervszerűen és következetesen, a talajban folyó dekompozíció elméleti kérdéseivel és a talajállatok ebben játszott szerepével foglalkozik. Azok, akik az egész Földön ilyen alapkutatásokkal foglalkoznak, kényelmesen elférnének egy kisebb előadóteremben. Mindössze ennek a maroknyi csapatnak a munkája igyekezik azokat a folyamatokat tisztázni, amelyeknek során a Föld talajaiban évente $10 \cdot 10^9$ tonna szárazanyag: az emberiség évi bányászati, kohászati és vegyiipari anyagvolumenjét tízszeresen meghaladó szervesanyagtömeg dekomponálódik és részben az élelmiszertermelés vonalára terelődik. Ötven vagy száz év múlva az emberiség valószínűleg teljesen értetlenül fog állani azzal a ténnyel szemben, hogy elődei a huszadik század elején Európa területét többszörösen felülmúló trópusi erdőségeket, amelyek potenciálisan az egész akkori emberiség élelmiszerszükségletét megteremtették volna, a pillanatnyi haszonért felégettek és a helyére a legelemibb talajbiológiai ismeretek nélkül ültetvényeket telepítettek, amelyeknek nagy része hasznavehetetlen bozóttá degradálódott. Ugyanekkor — néhány jövőbe látó lelkes zoológustól, a világ bírálojosaitól eltekintve, az emberiség sorsát döntően befolyásoló talajfaunával nem foglalkozott senki. De nemcsak a jövő, hanem a ma embere számára is hihetetlenül hangzik az az adat, hogy 1958-ban például abban a talajállat-csoportban, amellyel én foglalkozom, a négy világrész trópusairól kevesebb fajt ismertünk, mint ahányat kezdő zoológuskoromban egy egynapos talajmintavétellel a Mátra hegységből kimutattam. Ebben a helyzetben a világ talajzoológusai — s velük együtt mi, magyarok is — elődeink helyett, mellékfeladatként kénytelenek vagyunk vállalni azt a feladatot, hogy évtizedünkben, amikor a molekuláris biológia az anyag legfinomabb szerkezetét, a produkciósbiológia a Föld anyag- és energiaforgalmának nagy összefüggéseit igyekszik megállapítani; faunákat gyűjtsünk össze és írjunk le. Ma már ugyanis a világ minden talajbiológusa egyetért abban, hogy ennek elvégzése nélkül a trópusi talajbiológia egyetlen lépést sem tud előrehaladni.

Mialatt első expedíciónk Brazzaville-Kongó területén az UNESCO által jóváhagyott cirkumtropikus tudományos programot, ebben első helyen az ismeretlen afrikai talajfauna feltárását megkezdte, Párizsban a Föld több mint harminc országának biológus-képviselői egy nemzetközi tudományos világterv előkészítéséről tanácskoztak. A megbeszélések eredményeképpen létrejött a Nemzetközi Biológiai Program, amely a világ biológiája számára hét fő feladatot jelölt meg. Ezek közül egyik a Föld százazföldi életközösségeinek produktivitását s ezen belül a talaj anyag- és energiaforgalmának vizsgálatát tűzte ki. Így expedíciónk és vele együtt Magyarországon folyó, botanikusokkal, talajkutatókkal, mikroklimatológusokkal közös talajbiológiai kutatásaink a

Nemzetközi Biológiai Program megszületésének pillanatában annak szerves részévé vált és ebben az értelemben folyik ma is. A program a tudományos célokon kívül egy nagy jelentőségű egyetemes elvet szögezett le. Kimondotta, hogy a biológiának az emberiség jólétéért, az emberi élet megjavításáért kell munkálkodnia. Ez a megállapítás más szóval azt jelenti, hogy a világ biológusai tudományukat termelőerőnek tekintik és ebben az értelemben kívánják továbbfejleszteni. Biztos vagyok benne, hogy a talajzoológiának ebben a vonatkozásban napról napra növekedő feladata és felelőssége lesz.

IRODALOM

1. Balogh, J.: A zoocönológia alapjai — Grundzüge der Zoozönologie. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1—248 (1953).
2. Balogh, J.: Lebensgemeinschaften der Landtiere, ihre Erforschung unter besonderer Berücksichtigung der zoozönologischen Arbeitsmethoden. Akadémiai Kiadó — Akademie Verlag, Budapest—Berlin, 1—560 (1958).
3. Balogh, J.: A talajzoológiai kutatások eredményei és feladatai hazánkban. MTA Biológiai Csoportjának Osztályközleményei, **2**, 79—93 (1958).
4. Balogh, J.: On some problems of production biology, Acta Zool. **4**, 89—114 (1958).
5. Bornemissza, G. F.: Could dung eating Insects improve our pastures? Journ. Austral. Inst. Agric. Science, **26**, 54—56 (1960).
6. Dietrich, G. et Kalle, K.: Allgemeine Meereskunde. Berlin (1957).
7. Van der Drift, J.: Analysis of the animal community in a beech forest floor, Wageningen, 1—168 (1950).
8. Dudich, E.—Balogh, J.—Loksa, I.: Erdőtalajok ízeltlábúinak produkciósbiológiai vizsgálata. MTA Biológiai és Agrártudományi Osztálya Közleményei, **3**, 505—532 (1952).
9. Gere, G.: Élőlények produkciósbiológiai csoportosítása és szerepük az életközösségekben, Állatt. Közl. **46**, 71—78 (1957).
10. Gere, G.: Methode zur Lebendhaltung und Zucht von Arthropoden der Waldböden, Acta Zool. Hung. **3**, 225—231 (1957).
11. Huxley, J.: Les bases ecologiques en Afrique Orientale, Endeavour, **82**, 98—107 (1962).
12. Laurence, B.: The larval inhabitants of cow pats, J. Anim. Ecol. **23**, 234—260 (1951).
13. Lindemann, R. L.: The trophic-dynamic aspect of ecology, Ecology, **23**, 399—428 (1942).
14. Loksa, I.: Die bodenzoozönologischen Verhältnisse der Flaumeichen-Buschwälder Südostmitteleuropas. Budapest (1966).

GENETIKAI KÉRDÉSEK KÍSÉRLETES MEGKÖZELÍTÉSE*

GYŐRFFY BARNA
MTA Genetikai Intézet, Budapest

Napjainkban mind gyakrabban esik szó az öröklődésről, a genetikáról. Mindenesetre örvendetes, hogy — bár megkésve — az érdeklődés a genetika iránt egyre inkább kezd szélesebb körökben elterjedni. De még távol vagyunk attól, hogy általánosan tudatosuljon is, mi haszna lehet annak, ha ismerjük a ma már hat évtizede világszerte intenzíven folytatott genetikai kutatások eredményeit. Mert ma még csak kevesen látják világosan, hogy a tudomány és az élet legkülönbözőbb területén felmerülő számos kérdés eredményes megoldásában a genetika ismerete sok segítséget nyújthat.

A jelek azonban eléggé biztatóak és az, hogy szinte divatossá vált genetikáról írni, genetikáról beszélni, mind hozzájárul ahhoz, hogy a különböző szakkörök, majd egyszer azután a szélesebb társadalmi rétegek is rádöbbenjenek arra, hogy ha az ember a genetika eredményeit, megállapításait nem veszi figyelembe, csak felelőtlenül néz saját jövője elé.

Ha a genetikának mi tulajdonítanánk kulcshelyzetű jelentőséget — szakmai elfogultság lenne. De hogy valóban mily sok területen találkozunk genetikai kérdéssel, némi tájékoztatást nyújthat abból az ismertetésből néhány szemelvény, ami a genetikának aranyjubileumán, 1950-ben mutatta be a genetika és a többi tudományterületek közös kérdéseit.[1]

A klasszikus mendeli genetika az öröklődés átadása tényének statisztikai megoldásában és a kísérleti eredmények előrejelzésében egyszerű quantitativ fogalmakat alkotott, a későbbi genetika számos ötletével a *biometriának* nyitott meg új kutatási területeket. Az állat- és növényfajok elkülönültsége ellenére meglevő rokonsági összefüggések felderítése, a fajok eredete és a populációk változásai a *rendszertan*nak és a genetikának közös kérdései. Ugyanígy közös az *ökologiá*ban a környezethez alkalmazkodás, a psychologiában az alkat kérdése, az *anthropologia* és a *medicina* területén a vércsoportok vizsgálata. Az összehasonlító *morphologia* és *anatomia* területén a kialakult jellegek vizsgálata és úgyszintén az egész rekapituláció kérdése mutációs meg-

* A Magyar Tudományos Akadémia 1967-ik évi Nagygyűlésén május 4-én elhangzott előadás.

közelítésében mind genetikai kérdés, miként az *embryologiá*ban is a növekedés és differenciálódás szabályozása. A növények és állatok genetikai elemzése számos *botanikai* és *zoologiai* kérdést oldott meg és a közös problémákkal e két tudományág között áthidalást teremtett. Morphologiai és biokémiai (biofizikai) sejttani vizsgálatok vezettek el a chromosoma elmélethez; már a korai mendelezési eredmények utaltak *biokémiai* összefüggésekre és a klasszikus pigmentvizsgálatokkal elkezdődött az első nagyobb méretű együttműködés. Az *agrikultúra* területén a keresztezés és szelekció kérdése a genetikával szintén közös.

Tehát olyan kérdések és megoldandó feladatok a legkülönbözőbb területeken felmerülnek, amelyek megoldásához vagy legalábbis megközelítéséhez kívánatos, szükséges vagy éppen elengedhetetlen a genetikai szemlélet és/vagy a genetikai eredmények felhasználása, módszerek alkalmazása. De ugyanígy a genetika szűkebb területén felmerülő kérdések eredményes vizsgálatában szükséges és nélkülözhetetlen az egyéb tudományterületek megsegítő igénybevétele. Sőt az interdisciplinalis kutatásokra jellemzően igen sokszor nem is lehet éles elhatárolást tenni, hogy egy-egy kérdés tulajdonképpen hova is tartozik, mert a genetika és a biokémia vagy biofizika, illetve a morphologia vagy rendszertan és így tovább a többi tudományágak határterületei egymást erősen átfedik.

De akkor mégis mit tekinthetünk *genetikai kérdés*nek? Mikor beszélhetünk *genetikai megközelítés*ről? Akkor, ha egy vizsgálandó kérdés genetikai vonatkozásait helyezzük előtérbe és a megismerésben elsődlegesen a genetikai módszereket alkalmazzuk. De egy ilyen jól vagy rosszul körülírt meghatározás helyett jobb felvilágosítást nyújthat az, ha végignézzük, hogy a genetika kibontakozásában egymást követően milyen kérdések merültek fel és ezek megismerésére törekvésben hogyan alakultak ki a genetika főbb kutatási irányai.

A biológia előrehaladásának vitális fontosságú funkciója maga a kutatás. Ez lehet inkább megfigyelő, *leíró* jellegű, függetlenül attól, hogy a megfigyelés, vizsgálódás a természetben szabad szemmel vagy távcsővel, avagy a laboratóriumban mikroszkóp esetleg ultracentrifuga felhasználásával, tehát instrumentálisan történik. Lehet a kutatás *kísérletes* jellegű, amikor előző ismeretekből felállított feltevés alapján, ellenőrizhető körülmények között ismételjük meg egy már megfigyelt jelenség újból bekövetkezését és az ötlet, a gondolat, a feltevés a kísérletes vizsgálatokat megelőzi.

A biológia előbbrejutásában nélkülözhetetlen azonban — eredeti, saját megfigyelési adatok vagy kísérletek nélkül is — a különböző területek látszólag össze nem függő tényeinek és ötleteinek sorozatát úgy egybevetni, hogy azok új értelemmel, új feltevés felállításával a kérdések újszerű és ezzel eredményesebb megközelítéséhez vezethessenek. Így nemcsak az egyes területek fejlődnek tovább, hanem újabb biológiai irányok is kezdetüket vehetik.

DARWINnál a leszármazás gondolata volt az elsődleges és ennek alapján rendszerezte a különféle tényezőportokat, összefüggéseik kimutatásával, mesteri módon egy egységbe és — kísérletes vizsgálat nélkül — alkotta meg az evolúció elméletét.

Nyilvánvalóan MENDEL sem a véletlen tapasztalat útján jutott el az öröklődés alaptörvényei felfedezéséhez. Ő maga írja:[2]

„Az a feltűnő szabályszerűség, amellyel (ezek) a hibridalakok mindannyiszor visszatértek, valahányszor a termékenyítést hasonló fajok között végezték, további kísérletekre ösztökélt, amelyek feladata volt, a hibridek fejlődését utódaikban követni . . . a számos kísérlet közül egyet sem végeztek olyan terjedelemben és módon, hogy lehetséges lenne a különböző alakok számát megállapítani, amelyekben a hibridek utódai megjelennek, hogy ezeket az alakokat az egyes nemzedékekben biztosan rendszerezni és a kölcsönös számviszonyokat megállapítani lehetne." Megvolt tehát a gondolat: az elődök bizonyos eltérő tulajdonságainak az utónemzedékekbeni megjelenésében az arányokat kell megkeresni — és ez a mendeli gondolat volt a legfontosabb, az újszerű, amivel a kísérletek elkezdődtek.

A genetika klasszikus első szakaszának három fő kérdése: 1. mi és hogyan öröklődik, 2. mi a genetikai megváltozás és 3. miben és hogyan nyilvánul meg a genetikai anyag működése.

A klasszikus mendeli technika egyszerű statisztikai módszer alkalmazásával egzakt mérhető alapokra egyszerűsítette le az öröklődés jelensége vizsgálatát: kifinomultan a mai molekuláris genetikának is ez az elemző alapmódszere. A mendelezést nem, vagy csak alig mutató fokozati jellegek elemzéséhez már bonyolultabb biometriai módszerek nyertek bevezetést, ami kiindulása lett a *biometriai* genetikai iránynak és ahol a nem-genetikusok sokszor elfeledik JOHANNSEN figyelmeztetését: „az örökléstant matematikával, de nem mint matematikát kell művelni".

A mikroszkópos cytologiai vizsgálatok egybevetése a genetikai eredményekkel vezetett el az öröklődés chromosoma elméletéhez és ezek a kísérletes *cytogenetikai* vizsgálatok tisztázták az öröklődési faktor, a gén kérdését.

A mutációk felismerése és különösen azok mesterséges kiváltásának a lehetősége a génelmélet megalapozása mellett, mint külön kutatási terület vezetett el a mai — elég szerencsétlen elnevezésű — „sugárzásgenetiká"-hoz. A mendeli alapelveknek populációkban érvényessége és a mutációknak a természetben gyakori előfordulása kimutatásával kezdődött el az evolúció okainak és mechanizmusának vizsgálata; a legkülönfélébb módszereket alkalmazva a genetikai megközelítésben, kialakult a *populációgenetika* illetve *evolúciógenetika*.

Bár a legelső vizsgálatok elsősorban kifejlett szervezetekkel történtek, az öröklött tulajdonságok egyedi kialakulásával összefüggésben már korán gondoltak a kémiai vonatkozásokra, ami azután a *kémiai genetiká*nak lett

közvetlen vizsgálati kérdése. Ugyanígy a génelmélet és a fejlődő szervezetben a differenciálódás kérdéseinek összekapcsolásával kezdődtek el azok a szintén sokféle módszert felhasználó kutatások, amelyek az *élettani*, ill. *fejlődési genetikai* irányt megalapozták.

A genetika első fejlődési periódusának három kérdéscsoportja körül így alakult ki végeredményben a három, *módszertanilag részben elkülöníthető fő kísérletes irány:* a *formális* (átviteli), a *populáció-* és a *fejlődésgenetika*. És mindez tulajdonképpen rövid két évtized alatt.

Hogy látszott akkor a további fejlődés?

Thomas Hunt MORGANT megkérték, hogy mint az 1932-es VI. Nemzetközi Genetikai Kongresszus elnöke, fejtse ki véleményét, hogy mit tart a közeljövő legfontosabb örökléstani problémáinak.[3]

„Elhatároztam, hogy megpróbálok eleget tenni ennek a felszólításnak, ámbár jól tudom, hogy az én véleményem csak arra szolgálhat, hogy a jövő nemzedékeknek megmutassa, hogy milyen vakok voltunk (vagy voltam legalábbis magam) a saját korunk fontos felfedezéseinek felismerésében."

Először is a gének növekedésének és kettőződésének fizikai és fiziológiai folyamatai. „Hogy ennek a problémának a megoldása sejtbúvárok, genetikusok és vegyészek együttes frontális támadásából, vagy átkaroló hadműveletekből fog-e megszületni, azt nehéz megjósolni, bár azt hiszem, az utóbbi eshetőség többet ígér." Másodszor: a chromosomák konjugációja alkalmával és azután végbemenő változások fizikai értelmezése. „Itt biológiai problémákkal állunk szemben, amelyeknek megoldása előreláthatólag öröklésbúvárok és cytologusok kombinált támadására következhet be." Harmadszor: a gének viszonya a bélyegekhez. Ez a génekben rejlő belső erő külső megnyilvánulási módjának a megismerése. Ez a nagy űr az ismereteinkben. Negyedszer: a mutációs folyamat természete. Ötödször: az örökléstan alkalmazása a kertészetben és állattenyésztésben.

„Ha mindezek után azt kérdeznék tőlem, hogy hogyan kellene ezeket a felfedezéseket valóra váltani, ingadozóvá válnék és általánosságokhoz folyamodnék. Azt mondanám, hogy szorgalommal, bízva a szerencsében, hogy új utak fognak nyílni számunkra, továbbá okosan használva a munkahipotheziseket, azután kedvező kísérleti anyag kiválasztása révén, ami sokszor fontosabb mint a jól kitaposott úton való poroszkálás, abban a reményben, hogy valami csekély különbség mégis adódhat."

És a „szerencse" hamarosan új utakat nyitott. MORGAN tanítványa H. J. MULLER már 1921-ben egy symposionon meglepő párhuzamot állított fel a génmutációval összefüggésben a gén és a négy évvel ezelőtt felfedezett bakteriophag között.[4] „Mindkettőnek megvan az öröklődő variáció igen jellemző sajátsága. Ha a bakteriophagok valóban gének lennének, alapjában hasonlóak a mi chromosomalis génjeinkhez, ez számunkra a génkérdés megtámadására teljesen új lehetőséget adna. Szűrhetők, részben izolálhatók,

kémcsövekben kezelhetők és így sajátságaik kezelés után is vizsgálhatók lennének. Elhamarkodott lenne máris géneknek nevezni, de kategórikusan nem tagadhatjuk,hogy talán képesek leszünk a géneket mozsárban széttörni és utána pohárban megfőzni. Szükséges, hogy mi genetikusok egyben bakteriológusok, fiziológiai-kémikusok és fizikusok is legyünk egyidejűleg, hogy zoológusok és botanikusok is vagyunk. Reméljük, hogy így lesz." Jellemző, hogy a tekintélyes evolucionista, a 64 éves H. F. OSBORNE az egészet tisztán a hallgatóság beugratásának tartotta és gúnyosan csak azt jegyezte meg: „jó dolog, hogy van humorérzéke, DR MULLER". De ez a „beugratás" valóban eredményes is volt: először a *Drosophila* hegemóniája tört meg, új és kedvezőbb objektumok, élesztő, penészgombák, majd baktériumok és bakteriophagok bevonásával. Majd váratlanul kimutatják, hogy a baktériumok transzformáló agense a DNS, a gomba és baktérium mutánsok összehangolt genetikai és biokémiai vizsgálatával e két tudományág több vonatkozásban szinte egybeolvad, fizikokémiai módszerekkel kimutatható lesz a génmutációra megváltozott protein képződése, majd következik a DNS modell, az operon modell, röviden kibontakozik a molekuláris genetika.

Ez a molekuláris fázis a kódolás és regulálás meggyőző modelljeivel pedig előkészítette a genetikának most kezdődő új fázisában az egyik iránynak, az organizációgenetikainak az útját, amelyen a következő évtizedekben most már elsődlegesen biológiai szemlélettel, az embryologia, genetika, biokémia, virologia és molekuláris biológia közös összefogásával irányulnak a vizsgálatok az élősejt szerveződése a magasabbrendűek differenciálódása megismerésére.

A genetika múltjából és jelenéből így összeállított rövid áttekintés részben választ adhat a felvetett kérdésre: mit is tekinthetünk hát genetikai kérdésnek és hogyan közelíthetjük meg azt.

A kísérletes genetikai kutatásban a kérdés felvetésének formális két lehetősége: adott szervezetnél felmerült kérdést kell genetikailag (is) tisztázni és ilyenkor inkább az elemzés, kialakult feltevések és módszerek alkalmazása jön elsősorban számításba, vagy egy genetikai kérdés megismeréséhez kötetlenül lehet a legalkalmasabbnak ígérkező élőlényt megválasztani és a vizsgálat elsősorban kísérletes. A kérdés felvetését természetesen befolyásolják a helyi adottságok, a tudományos milieu és nem utolsósorban a személyi adottságok.

Fél évvel ezelőtt, amikor szóba került, hogy a Nagygyűlésen genetikai kísérletekről tartsunk előadást, az első gondolat az volt, miként 1953-ban és 1958-ban, úgy most is összefoglaló beszámolót adunk újabb eredményeinkről.[5-6] Később az elgondolás módosult és csak a molekuláris genetika és az evolúciógenetika területén végzett munkánkról lesz szakmai beszámoló. Ezt pedig megelőzi jelen, általánosabb jellegű ismertetésem, nemcsak a genetikai kérdésk felvetéséről és megközelítéséről, hanem ebben a vonatkozásban Intézetünk kutatási törekvéseiről is. Egy ilyen bemutatást indokolhat az, hogy

Intézetünk életének egy újabb határköve mellett most halad el, és hogy sokan vannak már Intézetünkben is, akik az 58-as beszámolónkat még nem hallhatták. Ez a biológusok nyilvánossága előtt tartott ismertetés nemcsak újabb munkatársaink számára lehet útbaigazító, de talán tanulságos másoknak is, akik hasonló területen kutatnak és — mutatis mutandis — esetleg más területek fiatal kutatóinak is.

Intézetünk feladata: „Genetikai alapkutatások mikroszervezetekkel és magasabb szervezettségű növényekkel". Vizsgálandó kérdéseinket így kötetlenül választhatjuk meg, mégis különösen a múltban sok nehézség merült fel. Az Intézetben nem volt régebben sem egy — mondjuk így — „hagyományokkal rendelkező genetikai iskola", ami egy megkezdett úton biztos irányítással haladt volna előre. Én magam is úgy sodródtam ide annak idején az Intézethez. Nehéz volt az akkori tudományos milieuben, genetikában tájékozódottságunk alapján, de az adott lehetőségek között a vizsgálandó genetikai kérdéseket úgy felvetni, hogy megközelítésükre vállalkozhassunk.

Bár elsőként mi kezdtünk el rendszeres mikrobiális genetikai kutatást, izoláltságunkban sem a *Neurosporat*, sem az *Escherichia colit* nem mertük figyelembe venni, hanem többek között csak az *Ustilagot*, a *Rhizobiumot*. Azóta ugyan az utóbbi évek örvendetes lehetőségeivel, a hosszabb külföldi tanulmányutakkal együtt bevonult laboratóriumainkba az *E. coli* is, phagjaival együtt.

A Növényörökléstani és Növénynemesítési Kutató Intézet kezdettől fogva foglalkozott a hibridkukorica kérdésével és Intézetünk, mint „jogutód" örökségként felhasználta a kukoricát, így különösen a biometriai genetika „meghonosításában", újabban pedig evolúciós érdekességű jellegek genetikai elemzéséhez. A vadfajok bevonásával előállított paradicsom és dohány hibridek genom elemzései, melyekről az 1963-as Nagygyűlésen is beszámoltunk,[7] inkább csak elemző jellegűek, nehezebb és kevésbé látványos kísérletes cytogenetikai vizsgálatra még alig került sor. Ahol pedig elkezdődött, miként *Lycopersicon* aneuploid utódokkal, ott az előrehaladást lefékezi a vadfajok erős klíma-érzékenysége, emiatt jut csak vontatottan előbbre a biztató kezdeti eredményekkel megindult parallel mutációs kísérletünk is.

Ugyanígy váratlan nehézségek miatt borult fel a polyploidia és genomplasmon kölcsönhatásokra több éven át folytatott *Epilobium* kísérletünk, hirtelen fellépett vírus fertőzés miatt leszűkült genetikai vizsgálatunk a *Campanulá*val, keresztezhetőségi korlátok miatt lett egyszerű karyotípus elemzés a *Ranunculus* genus kísérletes vizsgálatából. Igaz, nemigen szokás kudarcokat nyilvánosan is bevallani, az eközben szerzett tapasztalatok azonban mégsem értéktelenek, mert hasznosíthattuk eredményesebben előbbrehaladó genetikai vizsgálatainkban, amelyekről részben beszámoló is következik. Ha az evolúciógenetikában új kísérletes utak keresése helyett az ismertekre tértünk volna rá, vagy ha lett volna „hagyományos iskola", nyilván előbbre is, mé-

lyebbre is jutottunk volna eddig — intézeti munkánk bírálóinak megelégedésére.

Igyekeztünk lehetőleg mindig olyan genetikai kérdéseket elővenni, amelyek kísérletes vizsgálata nagy valószínűséggel szép eredményhez vezetne el. Egyesekkel „szerencsénk" is volt, más kérdésekkel — bár nem egyszer saját hibánkon kívül — már alig. Sok felmerült gondolat azonban sohasem került megvalósításra, mert kutatóinkban sem volt meg a kompetencia, az ötlet felvételére, vagy a közöny, az érdektelenség, vagy a meg nem értés miatt a gondolatból csak eltorzult megvalósulás lett.

Az evolúciós mozgásban a szelekció szigora alatt formálódó természetes populációkban kialakul egy genetikai összehangoltság, a koadaptálódás, ami a populációnak kiegyensúlyozott egységet biztosít. Sajnos, az intézeti kutatók mesterséges populációjában sokszor nincsen szigorú szelekcióra lehetőség, mert kutatóintézeteink jelenlegi struktúrájában a statusba jutással együtt jár egy perzisztens megkötöttség — elvileg talán nem is, de gyakorlatilag igen, és ezenfelül nem egyszer drift-hatás érvényesül: így koadaptálódás sokszor alig, vagy csak vontatottan tud kialakulni.

Olykor úgy látszik, mintha intézeti kis kutatócsoportunkban is felmerülne a „nemzedékek ellentéte", amikor a tettrekész és gyorsan nagyot alkotni akaró fiatal lendületét az idősebb kritikájával lefékezi, amikor a lelkesen összeállított első dolgozatot a bírálat kivesézi. De csak látszat az ilyen fiatal—idős közötti ellentét: kell a kutatásban a merész nekiugrástól vissza nem riadás, ami nélkül a fiatal kutató talán nem is fiatal, talán nem is valóban kutató. De amikor a fiatalokkal vitázunk, tesszük azt jószándékkal, hogy a valóban szakmai bírálathoz hozzáedződjenek, hisz az újabb dolgokban gyakran ők már jobban tájékozódottak mint mi. Vitázunk velük, hogy szokjanak hozzá, legyen meg először a gondolat s azután következzék a kísérlet és, hogy a felesleges és meddő kísérleteket, vizsgálatokat mindig kerüljék el. Bíráljuk dolgozataikat, hogy legalább mi ne járuljunk hozzá az amúgy is áttekinthetetlen tömegű szakirodalom további felduzzasztásához, nem értékes és nem időtálló közleményekkel, ha az első közleményeik ugyan még csak szerény igényűek is, és hogy *legalább mi ne szégyenkezzünk* később azért, hogy a *hazai genetikai kutatásokat bemutató szakirodalmat mivel gyarapítottuk.*

Előadásom címe szerint a genetikai kérdések kísérletes megközelítéséről kellett volna szólanom. Megközelítésről és nem megoldásról, mert hogy egy kérdés megközelítésében a megoldásig is eljutunk-e, nemcsak rajtunk múlik. És kísérletes megközelítésről, mert sokszor beszélünk ugyan experimentális kutatásról, de nem téve különbséget, azonos értelmet tulajdonítunk az experimentális és instrumentális vizsgálatoknak.

Nem tértem ki azonban arra, hogyan történik a kísérletes genetikai kutatás. Ez annyira sokrétű, hogy egy általános ismertetésben aligha mondanék valami újat és okosat. Ezért inkább a következő evolúciógenetikai előadás

fogja bemutatni a páfrányvizsgálatokkal, hogy konkrét genetikai kérdéseknél hogyan történik a kísérletes megközelítés, a technikák, a módszerek alkalmazása.

25 évvel ezelőtt létesült a Növénynemesítéstani és Növényörökléstani Kutató Intézet, mint jogelődünk és 13 éve van „Genetikai Intézet". Az 1953-as és 58-as Nagygyűlések hallgatóságának áttekintést adtam akkori munkáinkról és eredményeinkről, 1963-ban cytogenetikai vizsgálatainkról, most pedig újabb molekuláris genetikai és evolúciógenetikai kutatásaink eredményeiből lesz bemutatás. 1958-ban kutatómunkánkat így jellemeztem:[8] „Súlyos az a felelősség, amelyet egy kutatóintézet munkájáért a jelenben, de egyben a jövőbe tekintően is vállalni kell. Ezért törekedtünk mindenkor arra, hogy olyan kérdésekkel foglalkozzunk, amelyek a genetikai kutatások érdeklődésének középpontjában állanak és amelyekkel mi is eredményt ígérően foglalkozhatunk. Nem gondoltunk arra, hogy alapvető nagy elméleti kérdéseket véglegesen tisztázzunk, mert jól tudjuk, napjainkban oly sok helyen és legtöbbször sokkalta előnyösebb körülmények között szinte szédületes ütemben halad előbbre a genetikai kutatás. Ezért számunkra megnyugtató már az is, ha ezzel a fejlődéssel lépést tudunk tartani és a mi megbízhatóan kivitelezett kísérleteken alapuló eredményeink pozitív értékkel járulnak a genetikai ismeretek gyarapításához."

Az azóta elmúlt 9 év alatt talán több volt az igyekvésünk, mint a kézbevehető közlemények alapján lemérhető eredményünk, de úgy érzem, hogy ígéreteinkben és vállalkozásainkban helytálltunk. Nem kerestük a kibúvást az egyéni felelősségvállalás alól akkor sem, ahogy most sem az elhangzottakért azzal, hogy intézeti kollektívában előzetes belső megvitatással egyéni felelősségemet áthárítsam a „személytelen" intézeti kutató-együttesre.

A felelősséggel együttjár, hogy tapasztalatainkat hasznosítva, ahogy csak tudjuk, biztosítsuk a bennünket felváltó fiatalabbak előrehaladását a tudományos életben, támogassuk lelkes igyekezetüket nagy eredmények gyors elérésében, de ugyanakkor fékezzük is őket a realitásokat és különösen az eredmények időtálló értékét hangsúlyozó szigorú, de jóindulatú kritikával. Ismét MULLER-t idézem, aki bíráló szerepében az advocatus diaboli kellemetlen és hálátlan szerepét tartotta kötelességének:[9]
„Ha vékony jégen járunk, jobb számunkra, ha egy lépést teszünk előre és azután egy fél lépést hátra, mintha folyton csak előre megyünk míg be nem szakadunk."

Most amikor a Genetikai Intézet 25. évében áthalad, a felvetett gondolatokat elsősorban fiatalabb munkatársaink tekintsék útbaigazítónak, azok, akik — reméljük hamarosan — a szegedi Genetikai Kutató Intézetben fogják a genetikai kutatásokat tovább vinni, a hazai genetikát fellendíteni. A kutatómunkára felkészülés mellett vegyék át a tapasztalatokat mitőlünk, akik objektív és szubjektív, külső és belső körülmények miatt a jövő nemzedék

előtt már majd szinte csak epigonoknak fogunk számítani a genetikában, és törekedjenek a fiatalok a koadaptálódott munkacsoportok kialakítására.

Nem könnyű út előtt állanak a molekuláris genetikában kutatók, mert nagy a versenyfutás az egész világon. De mivel a molekuláris biológia több tudományterületnek előlendítője, a molekuláris genetika is nyilván nagyobb kedvezést és támogatást fog kapni a közeljövőben előrehaladása megkönnyítésében.

Akiket pedig az evolúciógenetika kérdései érdekelnek, tartsák mindig szem előtt, hogy a természetben az evolúció lassan, kis változásokkal és nem nagy mutációs ugrásokkal halad előre, ugyanígy az evolúció genetikai elemzése is; a természetben a már említett genetikai sodródás a populáció további evolúciós mozgásának lehetőségét erősen leszűkíti, ezért — a kutatók is igyekezzenek elkerülni minden „genetikus" sodródást; a természetes populációban a szelekció szigorával választódnak ki az életrevalóbbak, a rátermettebbek — a populációk vizsgálói se féljenek a kritika szigorától.

Ha a bírálat szakszerű, akkor az megsegítő, mert a szelekciót segíti elő, tehát a jövő távlatában értékesen hasznosítható. De ha csak támadó a kritika, a fiatal evolúciógenetikusok ne riadjanak meg és emlékezzenek vissza, hogy 100 évvel ezelőtt is hevesen támadó bírálat igyekezett megakadályozni a darwini evolúciós gondolat szétterjedését. Erre emlékezett vissza a darwini centenárium alkalmából prominens biológusoknak az a kerekasztal beszélgetése a neodarwinizmusról, amelyen többek között Sir Julian HUXLEY is résztvett, Thomas Henry HUXLEY unokája, aki annakidején DARWIN egyik harcos támogatója volt a vitákban.[10]

STEVENSON kérdése: Mi volt, Sir Julian, az ön nagyatyjának ama híres megjegyzése, amikor WILBERFORCE (püspök) a darwinizmust oly brutálisan támadta? Úgy emlékszem, azt mondta, hogy ő inkább egy majomtól származna, mint egy olyan embertől, aki az igazság elhomályosítására bőséges adományokat felhasznál.

HUXLEY válasza: Valahogy így volt: „Ön a nagyatyja vagy a nagyanyja oldalán vezeti le a leszármazását egy majomtól?" Hallották, hogy nagyatyám lábára ütve mondotta: „az Úr kiszolgáltatta őt kezeimbe". Nem szándékozott ugyan az ülésen felszólalni, de ezek után érezte, hogy szólnia kell. És ekkor — ahogy visszaemlékezem — így mondta: „úgy látom, senkinek sincs oka azt szégyellnie, hogy egyik őse egy majom volt, ha lenne olyan ősöm, akire szégyenkezve emlékeznék vissza az inkább egy ember lenne, egy állhatatlan és nyugtalankodó intelligens ember, aki saját működési körében elért sikerével meg nem elégedve, belemerül olyan tudományos kérdésekbe, amelyekben nincsen valódi tájékozottsága — csak azért, hogy azokat összezavarja céltalan retorikával és, hogy a hallgatók figyelmét elterelje a szóban forgó kérdés valódi lényegétől a tárgytól ékesszólású elkalandozással és vallásos elfogultságukra ügyes hivatkozásokkal".

IRODALOM

1. GOLDSCHMIDT, R.: The impact of genetics on science. In L. C. Dunn (ed.): Genetics in the 20th Century. pp. 1—24, New York: MacMillan (1951).
2. MENDEL, Johann Gregor: Kísérletek Növényhibridekkel. Ford. Rapaics R. pp. 27—28, Budapest: Term.-tud. Társulat (1944).
3. MORGAN, T. H.: Az örökléstan hajnala. Ford. Wolsky S. Term.-tud. Közlöny. Pótfüz. ápr.—szept. 1—9 (1933).
4. MULLER, H. J.: Studies in Genetics. p. 86. Bloomington: Indiana Univ. Press (1962).
5. GYŐRFFY, B.: A növények anyagcseretípus-változásainak biokémiai vonatkozásairól. MTA Biol. Oszt. Közl. **2**, 361—391 (1953).
6. GYŐRFFY, B.: Az MTA Genetikai Intézetének beszámolója. MTA Biol. Csoport Közl. **2**, 429—437 (1959).
7. GYŐRFFY, B.: Dohány- és paradicsomhibridek cytogenetikai vizsgálata. MTA Biol. Oszt. Közl. **6**, 243—268 (1963).
8. l. c. p. 436.
9. MULLER, H. J.: Synthesis. In S. J. Greets: Genetics Today. p. 265. Oxford—London: Pergamon Press (1963).
10. TAX, S. and CALLENDER, C.: Issues in Evolution. p. 43. University of Chicago: Univ. Press (1960).

A KROMOSZÓMA-SZERKEZET ÉS MŰKÖDÉS ÖSSZEFÜGGÉSÉNEK VIZSGÁLATA BAKTÉRIUMOKBAN ÉS FÁGOKBAN

SZENDE KÁLMÁN
MTA Genetikai Intézete

Ma már feleslegesnek tűnik az arra történő hivatkozás, hogy a modern genetika mennyit köszönhet a mikroszervezetek tanulmányozásának. A legtöbb, amit az öröklődés mechanizmusát lehetővé tevő anyagról, annak szerkezetéről, működéséről és ennek a működésnek szabályozásáról tudunk, a mikroszervezetek genetikai és biokémiai vizsgálatainak köszönhetjük.

Ez az anyag, legtöbb esetben a deoxi ribonukleinsav (DNS) közös mind az alacsonyabb-, mind a magasabbrendű szervezetekben, és a sejten belül egy lineáris szerkezetbe szerveződött, amelyet kromoszómának nevezünk.

A baktérium és fág kromoszóma morfológiailag lényegesen eltér a magasabbrendű szervezetek jól elkülöníthető organellumától és sokakban felmerült a kérdés, vajon analógok-e ezek a struktúrák a magasabbrendűekével.

Ennek a problémának a megoldására két csoportba sorolják az élő szervezeteket: a morfológiailag elkülöníthető sejtmaggal rendelkező élőlények csoportjára, az *eukarionokra* és az ilyen sejtmaggal nem rendelkező élőlényekre, a *prokarionokra.*

Valóban az élőlények e csoportjai között lényeges különbségek vannak és nagy közöttük az evolúciós diszkontinuitás. Ez a diszkontinuitás elsősorban a genetikai anyag szerveződésében, de kisebb mértékben ennek átviteli mechanizmusaiban és működésében is megnyilvánul.

Ennek ellenére a baktérium és a fág kromoszóma több mint egy DNS molekula, mivel magasabb fokú szerkezeti és működésbeli komplexitást mutat, olyant, amire a DNS molekula nem képes. A kromoszómát tehát akár prokarionról, akár eukarionról beszélünk, egy magasabb szinten álló, a sejt belső differenciálódásának eredményeként létrejött organellumként foghatjuk fel.

Ebben az előadásban a prokarion kromoszóma szerkezetéről, fizikairól és genetikairól, valamint működéséről szeretnék egy rövid ismertetést adni. Elsősorban azokról az ismeretekről, melyekhez intézetünk munkatársai munkájukkal hozzájárultak.

A prokarion kromoszóma fizikai szerkezete

JACOB és WOLLMAN 1958-ban az *Escherichia coli* kromoszómájának genetikai vizsgálata alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a baktérium géntérképe kör alakú. STREISINGER, EDGAR és DENHARDT 1964-ben a T4 fágra nézve ugyancsak kimutatták a géntérkép köralakúságát.

Ezeknek a genetikai vizsgálatoknak alapján nem volt meglepő, hogy FIERS és SINSHEIMER 1962-ben kimutatta azt, hogy a ∅X174 fág kromoszómájának DNS-e gyűrűt képez. 1963-ban CAIRNS „szemmel láthatóan" bizonyította az *E. coli* kromoszóma DNS-ének kör alakú szerkezetét autoradiografiás vizsgálataival. Ezt követően számos más organizmusnál (vírusoknál és fágoknál is) kimutatták a DNS gyűrű képződését, így többek között az *E. coli* lambda fágjánál is. Sőt ennél a lambdánál HERSHEY és munkatársai a DNS ún. „ragadós" végeit is kimutatták, melyek biztosítják azt, hogy a fertőzés után a kovalensen zárt duplex molekulák kialakulhatnak.

Az érett bakteriofágból nyert DNS molekulák ún. lineáris duplexek, melyekben a DNS sok esetben megszakítatlan polinukleotid láncból áll.

C. THOMAS (1966) a legismertebb fágok adatainak kompilálása alapján három csoportot alkotott:

1. azok a fágok, melyekben specifikus elhelyezésű megszakítások vannak (T5),
2. azok a fágok, amelyekben a DNS nukleotid elrendeződése egy és ugyanaz minden részecskében (lambda, T3, T5, T7),
3. és azok a fágok, melyekben az egyes részecskékben levő DNS nukleotid elrendeződése cirkulárisan permutált (T2, T4, P22).

Összehasonlítva a fizikai szerkezetet a géntérképpel a kör alakú géntérképnek háromféle oka lehet (STAHL, F. W., 1964):

1. A kromoszóma valóban kör alakú, legalább is a párosodás és rekombinálódás idejében (lambda, *E. coli;* ez utóbbi esetében feltehetően konjugáció közben nem).
2. A kromoszóma lineáris, de a *cross-over* gyakoriságok száma mindig kettővel osztható (ez ideig ismeretlen).
3. A kromoszóma cirkulárisan permutált (T2, T4).

A kör alakú géntérképnek evolúciós jelentősége is van. Az *E. coli*, *Salmonella typhimurium*nál, a T4 fágnál és újabban a lambdánál is kimutatták, hogy a koordinált génexpresszió érdekében az egymással funkcionálisan kapcsolódott gének csoportokban helyezkednek el.

Az ilyen funkcionális szempontból történő csoportosulásnak a szelektív előnyére FISHER már 1930-ban rámutatott. A populációban ugyanis egy megváltozott új környezethez való adaptálódásra képes mutáns egyedek fokozzák a populáció túlélésének lehetőségét. Abban az esetben, ha a mutációk közti kapcsolat laza, úgy a rekombinánsok között több lesz az olyan nem életképes egyed, amely a pillanatnyi életkörülmény között nem marad fenn. Szoros

kapcsolódás esetében ez nem következik be, mivel az életképtelen rekombinánsok száma kicsiny. A funkcionálisan rokon gének kapcsolata tehát egy ilyen szelekció révén kialakulhat, de kialakulhat úgy is (STAHL, F. W., 1966), hogy a kromoszóma gyűrűt képezve végeit eliminálja. Ezáltal minden gén számára adódik az a lehetőség, hogy másik két génnel, melyekkel együttműködik, azonos távolságba kerüljön.

Visszatérve a *T4 fág cirkulárisan permutált nukleotid elrendeződésének vizsgálatához* (SIK T. és STAHL, F. W.), ismeretes, hogy a kromoszómát alkotó DNS-ben egy nukleotid *sorrend* mutatható ki, mely az alkotó tripletek révén megfelel a polipeptid géntermék aminosav szekvenciájának. A nukleotidok *elrendeződését* tanulmányozhatjuk abban az esetben, ha az egymás alá helyezett lineáris DNS molekulákban vizsgáljuk azt, hogy a homológ részek miképpen kerülnek egymás alá.

A nukleotid elrendeződés lehet egységes, de lehet cirkulárisan permutált.

Első esetben a sorrend mindig	AB	YZ
Második esetben lehet	AB	YZ
	BC	ZA
illetőleg	CD	AB stb.

A T4 fágnál heterozigoták *(het)* mutathatók ki. Ezek vagy külső *het*-ek, mely esetben a *het* régió a terminális redundanciában alakul ki. Ezek gyakorisága alacsony. A belső *het*-ek esetében az ún. inszerciók rekombinálódás révén jönnek létre.

A feladat az volt, hogy egy olyan heterozigotánál, mely stabilizálódottnak mutatkozott megállapítsák azt, hogy a nukleotid elrendeződés egységes, illetőleg permutált-e?
Ez a T4rII *het* két delécios mutáns keresztezése révén jött létre. A továbbiakban ezt a *het*-et nyírással és úgy, hogy minden molekula csak egyszer törjön, szétdarabolták és ezek közül a kisebb darabokat elkülönítve denaturálták és agar oszlopba keverték. Erre az oszlopra ugyanezen *het* ^{32}P-vel jelölt rövid darabjait, továbbá egy ^{14}C-vel jelölt vad T4 DNS ismerten permutált elrendeződésű darabjait vitték fel. Ha a heterozigota DNS nukleotid elrendeződése egységes, úgy a ^{32}P-vel jelölt *het* DNS renaturálódva megkötődik az oszlopban és a ^{14}C-vel jelölt vad DNS relatíve felszaporodik. A kísérlet elvégzése alapján megállapítható volt, hogy a stabilizálódott heterozigota nem terminális és a *het* képződés belső inszerciós mechanizmus révén jött létre.

A baktérium kromoszómát alkotó DNS szerkezeti és funkcionális összefüggéseinek megállapítására a genetikai transzformálás igen alkalmas módszer és ennek révén lehetővé vált a *transzformáló DNS molekula lineáris szerveződésének vizsgálata* (GÁBOR M. és HOTCHKISS, R. D.).

A genetikai transzformálódás révén egy donor baktérium jellegei egy másik baktériumba jutnak és ez utóbbi, befogadó baktériumnak genotípusát a

donor jellegének megfelelően megváltoztatják. A leggyakrabban vizsgált baktériumoknál (*Pneumococcus, B. subtilis, H. influenzae*) bizonyítékok vannak arra, hogy a transzformáló DNS fizikailag integrálódik a befogadó sejt kromoszómájába. A transzformáció folyamata két lépésből tevődik össze:

1. komplexképzés a sejt és a DNS között. Ez egy reverzibilis folyamat, továbbá

2. a DNS fixálódása (többé nem DNAz érzékeny). Ez egy irreverzibilis folyamat.

Az egész folyamat fizikai-kémiailag eléggé feltárt: pl. lineáris összefüggés van a DNS mennyisége és a transzformált baktériumok száma között. A reverzibilis szakaszban lehetséges, hogy a komplex a baktérium felületével képződik, lehet azonban az is, hogy a komplex olyan DNS elemeket tartalmaz, melyek többé kevésbé áthatoltak a behatolást gátló akadályokon és így képesek „megkeresni" a befogadó sejt genomának homológ részeit. Ezt „megtalálva" feltehetően komplementer párosodással kezdődik a transzformálás irreverzibilis szakasza.

Az irreverzibilis fixálódás után az extrahált DNS egy ún. eklipszet mutat, transzformációs aktivitással nem rendelkezik. Tovább inkubálva azonban a sejtet, transzformáló aktivitása 3 perces felezési idővel visszanyerhető. További sejtnövekedés esetén az aktivitás állandó marad. Ebből arra lehet következtetni, hogy az eklipszből való szabadulás után a bevitt DNS a befogadó DNS-évei szinkron multiplikálódik.

A transzformáció történhet egyes jellegre nézve, de vannak kapcsolt jellegek is, melyeket egyetlen DNS fragmentum visz át. Ez a kapcsolódás lehetővé teszi annak a vizsgálatát, hogy milyen molekuláris asszociációk jönnek létre a rekombinációs események következtében.

Már 1962-ben Lacks rámutatott arra, hogy a DNS behatolása a molekula végével kezdődik. Kent és Hotchkiss kimutatták, hogy 30°-on az egyes, valamint a kapcsolt jellegek behatolása lineáris.

Gábor és Hotchkiss DNS kezeléssel, illetve „swamping" hígítással (tehát genetikailag nem jelzett DNS-sel történő hígítással) egy olyan behatolási mintázatot állapítottak meg, amely arra mutatott, hogy az egyes jellegeket hordozó kromoszóma részek behatolásának rátája szabályosságot mutat és a sorrend megfelel a kromoszómán levő kapcsolódásoknak. (b>d>S; S a streptomicin rezisztencia jelleget, b és d a szulfonamid rezisztencia jelleget jelenti.)

A behatolás polaritásának vizsgálatát lehetővé teszi az, hogy a pneumococcus DNS denaturálása után MAK (metilalbumin-Kieselguhr) oszlopon két frakcióra választható szét. Ez a két frakció *A* és *B* feltehetően a két különválasztott DNS fonal. Ha egy többszörösen jelzett DNS-t denaturálással szétsodornak, különválasztanak és ezek mindegyikét (tehát a két ellentétes polaritású fonalat) genetikailag nem jelzett DNS-sel helyreállítják (a helyre-

állítás mértéke transzformációs aktivitásban mérve 20—30%), úgy határozott különbség jelentkezik az „allélek" átvitelében az *A* és *B* fonal között. Így pl. az *ery* gén kis gyakoriságú a *B*-ben, míg a *mic* az *A*-ban. Gyanítható tehát az, hogy az *A* ill. *B* fonalak a hordozott jelleget korábban, vagy később viszik át. Egyesek az *A* fonalon gyorsabban jutnak be mint a *B* fonalon, másoknál a helyzet fordított. Ezeknek a vizsgálatoknak révén lehetőség nyílik a pneumococcus kromoszómán a gének elrendeződésének pontosabb meghatározására.

A prokarion kromoszóma genetikai finomszerkezete és a gének csoportosulásának kérdése

A rekombinálódás termékei kimutatásának nagymérvű finomítása lehetővé tette, hogy a kromoszóma genetikai finomszerkezetének kérdésével foglalkozhassunk. BENZERnek a T4 fág rII lokusz vizsgálata egyetlen gén nagymértékű felbontását tette lehetővé és ez a felbontás feltehetően megközelítette az egyetlen nukleotid párt. Ehhez a vizsgálathoz nagyszámú mutánsra és megfelelő szelekciós technikára volt szükség. Sikerült is ezzel a munkával több fogalmat tisztázni, mégpedig a rekon, muton és cisztron fogalmát. Tehát a kromoszóma rekombinációs, mutációs és funkcionális egységeit sikerült elkülöníteni. A cisztron ugyanis a kromoszóma funkcionális egysége és a *cisz-transz* teszt révén határozható meg. A *cisz-transz* teszt lényegileg nem más, mint két mutált kromoszómának egyetlen sejtbe történő bevitele. A transz helyzetben történő bevitel esetében kétféle eredménnyel számolhatunk:

1. a két mutált kromoszóma kiegészíti, *komplementálja* egymást és egy vad fenotípusú egyedet kapunk,

2. nem komplementálják egymást. Ez esetben a fenotípus mutált marad.

Első esetben a két mutáció a teszt révén elkülöníthető egymástól, a második esetben pedig mindkettő ugyanabba a funkcionális csoportba tartozik. Ennek a tesztnek megerősítéseként a *cisz* tesztben egyetlen kromoszóma hordozza mind a két mutációt és ha ez a vad alléleket hordozó kromoszómával kerül össze a sejtben, úgy az ilyen sejt fenotípusa vad lesz.

A módszerből következik, hogy a teszt azokra a szervezetekre alkalmazható, melyekben a vizsgált kromoszóma régió diploid, vagy kvázi-diploid és recesszív a vizsgált allélekre vonatkozóan. Megfelelő mutánsokkal, így az *amber* és hőérzékeny mutánsok alkalmazásával a fág kromoszóma számos ilyen funkcionális egységre, komplementációs csoportra osztható és a kromoszóma funkcionális tagolása (cisztronokra, génekre) elvégezhető. Tehát a genom olyan szegmentumaira bontható fel, melyek „egy polipeptid lánc primer szerkezetének öröklődő információit tartalmazzák."

A funkcionális szerveződés vizsgálatának szép példája a T4 fág kromoszómájának ilyen vonatkozású feltárása feltételesen letális mutánsokkal. Ma-

gunk is (SZENDE K., REGŐS J., és OROSZ L.) számos ilyen kondicionálisan letális lambda fágmutánst indukáltunk különféle mutagénekkel. Ezekkel és a velünk egyidőben ARBER által nyert ilyen hőérzékeny mutánsokkal a lambda kromoszómát számos helyen jelöltük. Egymás között végzett komplementációs teszttel csoportosítottuk őket és delécios térképezéssel, valamint szuppresszor érzékeny mutánsokkal végzett komplementálásokkal ezeket a mutált helyeket lokalizáltuk a lambda kromoszóman.

A kromoszóma *szupragénes szintjén történt funkcionális szerveződésének* vizsgálatát a lambda fágban ezek az eredmények számunkra is lehetővé teszik. Ismeretes ugyanis az, hogy a vegetatív lambda kromoszóma bal karján levő cisztronok a fág morfogenetikai sajátosságainak információit tartalmazzák. Más cisztronokról, így a közép és jobb karon levőkről feltehető, hogy a fágképződés korai funkcióit irányítják, továbbá magát a profág működését represszálják és ezzel a lizogéneződés, valamint a profág indukció folyamatában vesznek részt. A jobb kar legszélső cisztronja a fág kiszabadulását lehetővé tevő litikus enzim működését irányítja. A rendelkezésünkre álló mutánsok révén lehetségessé válik számunkra is a lambda kromoszóma szupragénes funkcionális tagolódásának — nevezhetjük operonoknak is — vizsgálata, valamint az ilyen szupragénes funkcionális csoportok működésbeli szekvencialitásának tanulmányozása is.

A lambda kromoszóma a T4 fágéhoz hasonlóan a hasonló funkciókat irányító gének csoportosulását mutatja. *Poláris* mutánsokkal, valamint az *amber* és *hőérzékeny* mutánsok együttes alkalmazásával a komplementációs teszt lehetőséget ad arra, hogy ezekben a szupragénes funkcionális csoportokban a genetikai üzenet iránya (tehát a policisztronos átírás iránya) kimutatható legyen, nemcsak a biokémiailag jól definiált rendszerekben, hanem az ilyen még nem egészen tisztázott rendszerekben is, mint az említett T4 és esetleg a lambda.

A genetikai finomszerkezet és funkció összefüggésének szép példája az, melyet GÁBOR M. és néhai BALASSA R. a *Rhizobium lupini* streptomicin rezisztenciát és dependenciát meghatározó lokuszának elemzésével végzett. A genetikai transzformálás módszerét felhasználó vizsgálatokban kimutatták, hogy kapcsolódás van — ha éppen nem átfedés — a streptomicin dependenciát és a streptomicin rezisztenciát meghatározó gének között. Abban az esetben, ha depedens törzset rezisztenssel, valamint érékennyel transzformáltak, a jellegek kiszorították egymást mint alléleket. Feltételezhető, hogy a dependencia egy ún. „multi-site" mutáció eredménye és csak részlegesen cserélődik ki streptomicin érzékenységre, illetőleg rezisztenciára. A dependenciát meghatározó gén feltehetően egy, az eltűrt (ill. igényelt) streptomicin koncentrációt meghatározó faktort is tartalmaz. Ha ez a faktor a rezisztencia vagy depedencia faktorral párosul, adja a rezisztens illetőleg dependens fenotípust.

A genetikai struktúrák egy érdekes csoportját képezik az *episzómák*. Fogalmukat JACOB és WOLLMAN vezették be. Lényeges jellemzőjük az, hogy nem tartoznak a baktérium genomához, tehát autonóm struktúrák, de alternatív módon és időlegesen a baktérium kromoszómájába kapcsolódnak, azzal együtt reduplikálódnak, majd ismét kilépve a gazda genomából vegetatív úton is képesek a reduplikálódásra. Ennek eredményeként egyik sejtből a másik sejtbe hatolnak, miközben az utóbbit fertőzik. Számos ilyen alternáló, autonóm módon reduplikálódó, illetőleg integrálódó és így szaporodó episzóma ismeretes. Prototípusuk a *mérsékelt fág* és a baktérium szekszualitását meghatározó faktor az *F-faktor*. A gazda baktérium kromoszómájával alkotott kapcsolatuk vizsgálata a kromoszóma szerkezetére, a szerkezeti homológiára és rekombinálódás mechanizmusára felvilágosítást tud nyújtani.

Az episzóma és a gazdabaktérium kromoszómájának átmeneti kapcsolatára a legfontosabb hipotézis CAMPBELLnek (1963) a modellje, mely két kör alakú szerkezet reciprok rekombinálódásán alapul. A baktérium kromoszómáról tudjuk, hogy kör alakú *(E. coli)* és tudjuk azt is, hogy a lambda kromoszóma is az (vegetatív lambda). Ugyancsak adatok vannak arra, hogy az *F-* illetőleg az *F'-faktor* kör alakú. A lambda kromoszóma fizikai szerkezeténél ismertettem azt, hogy a kromoszóma DNS-ében a nukleotid elrendeződés egységes és ugyancsak egységes a vegetatív fág géntérképe is. Más a helyzet az integrálódott lambda géntérképénél. Ez esetben a vegetatív lambda terminális génjei középen helyezkednek el és a vegetatív lambda középső régiója kapcsolódik a baktérium kromoszómával. Ennek alapján feltehető, hogy a vegetatív lambda középső része és a baktérium kromoszóma lambda-receptor-szitusza homológ és a két struktúra között a reciprok rekombináció ezen a helyen jön létre. Mi a helyzet az *F-faktor* esetében? Feltehetően az integrálódás mechanizmusa azonos. Míg azonban a lambda csak egy ponton képes a baktérium kromoszómával reciprok rekombinációt létrehozni, addig az *F-faktor* a baktérium kromoszóma több helyén képes erre.

Az episzómák egy sajátossága, hogy a gazda kromoszómából történő kiválásuk közben annak génjeit magukba építik: mérsékelt fág esetében így jön létre a transzdukáló fág, a szekszus faktornál az *F'*.

Az *F'* integrálódás és kiválás vizsgálatában (SZENDE K.) lehetőségünk van egyrészt a baktérium kromoszóma *homológ helyeinek lokalizálására*, másrészt a meglevő transzpozíciós és inverziós törzsekkel az integrálódás mechanizmusának és a kromoszóma működésének elemzésére. A transzpozíciós törzsek, tehát azok, melyekben a baktérium genom egy része a kromoszómán idegen helyen transzlokálódott és az inverziós törzsek, melyekben a kromoszóma egy része *in situ*, vagy transzlokált helyzetben megfordult, felvilágosítást adhatnak az ezekkel járó funkcionális megváltozásoknak vizsgálatára: így többek között a DNS polaritásának, az átírás polaritásának és az intercisztronos ill. intraoperonos funkcióknak vizsgálatára a baktérium genomban.

A baktérium és fág DNS replikációjának vizsgálatára alkalmas objektum a lizogén baktérium. Itt egy sejten belül két replikációs rendszer van és ezek kölcsönhatásban állnak egymással. A két regulációs rendszer tanulmányozására a *mitomicines indukció* vizsgálata adott módot (SIK T.). A mitomicin feltételezett mechanizmusa az, hogy összeköti a DNS fonalakat és így gátolja a replikációt. Felmerül a kérdés, hogy indukció után ez miért nem következik be a fág DNS-énél? A mitomicin hatását a baktérium osztódására is vizsgálták olyan koncentrációban, melynél a lízis késleltetett, de a fághozam maximális. A kezelt sejtek élősejt számának gyarapodása az antibiotikum hozzáadása után 3—4 osztódásra terjed. Ez érvényes lizogén sejtekre is. Ennek legvalószínűbb magyarázata az, hogy a mitomicinnek a DNS-sel történő kapcsolódása a replikáció egy bizonyos pontján fejt ki nagyobb hatást.

Szinkronizált tenyészetben megfigyelhető, hogy a mitomicin meghatározott időpontban interferál a baktériumsejt osztódásával. Ugyancsak a fág indukció is függ attól, hogy a mitomicin a replikáció mely stádiumában kapcsolódott a kromoszómához. Az antibiotikum tehát a kromoszómához kapcsolódva a baktérium DNS replikációjának gátlását, fágnál ezzel szemben a replikálódás megindulását okozza. Feltehető, hogy a mitomicin a baktérium kromoszómához kapcsolódva egy pozitív regulációs lépést gátol, pl. a replikáció megindulását. Ezzel szemben fág esetében felfüggeszti a profág represszióját és lehetővé teszi azt, hogy a fág replikációjához szükséges indító anyag elkészülhessen.

A kromoszóma finomszerkezeti és funkcionális elemzésére igen alkalmas módszer az ún. *interalléles komplementálás*. A komplementálás tehát mint módszer nemcsak a funkcionális csoportok, cisztronok elkülönítésére alkalmas, de alkalmas arra is, hogy a gén és géntermék szerkezeti összefüggéseit is vizsgáljuk. EDGAR és munkatársainak már említett kondicionálisan letális T4 fágmutánsai kétfélék: *amber* mutánsok és hőérzékeny mutánsok. Előbbiekben a cisztron által informált polipeptid lánc szintézise egy értelmetlen mutáció következtében leáll. Tekintve, hogy a leírás ill. leolvasásnak polaritása van, azonos cisztron amber mutánsai nem komplementálják egymást, mert mind a két polipeptid terminálisan deficiens és így együtt sem működőképes.

Más a helyzet a hőérzékeny mutánsoknál, melyekben egy ún. téves mutáció révén az informált polipeptid láncban feltehetően aminosav szubsztitúció jön létre és a képződött fehérje 30C°-n működő képes, de 40C° fölött nem. Ezek a mutánsok intragénes komplementálódásra képesek, de természetes pl. az, hogy a fágnyeredék magas hőfokon soha nem éri el a vad fág nyeredékének mértékét.

Hőérzékeny lambda mutánsainkkal két cisztront lehetett ilymódon elemezni, mivel egy-egy cisztronon belül nagyobb számú mutánssal rendelkeztünk (SZENDE K., REGŐS J., OROSZ L.). A két cisztron közül az egyik a

ambda morfogenetikai folyamataiban (a fág feji részének képzése) résztvevő *A* cisztron volt 7 mutánssal; a másik az ún. c_I régió a rendelkezésre álló 11 mutánssal. Ez utóbbi régió a lambda represszor termelésével és működésével kapcsolatos. Az *A* cisztron keresztezéses és komplementációs térképét már elkészítettük, a c_I régió jelenleg munkában van.

Felmerülhet a kérdés, mi értelme van a géntérkép és a komplementációs térkép ilyen összevetésének? Mai ismereteink szerint az interallélos komplementálás feltehetően a transzlációs szinten működik, koaggregálódás révén és valószínűen komformációs korrekcióval jön létre. Lehetséges, hogy a komplementációs térkép a fehérje polipeptid alegységeinek térképe. Ha ez igaz, úgy az interallélos komplementálás hasznos lehet a fehérjék konformációjának vizsgálatában. Ahogy EDGAR megjegyzi, a komplementációs térkép szerkesztése „a szegény ember Fourier elemzése". FINCHAM szerint ez túl derűlátó álláspont és a komplementációs térkép fizikai értelmezése a megfelelő fehérje egyéb adataival történő összehasonlítás révén válik csak értékessé. Ezért kecsegtetőbb esetünkben a c_I régió vizsgálata, hiszen a legújabb adatok alapján e régió termékének, a lambda represszornak izolálása eredményes volt.

A c_I régió működésére, tehát a *profág funkció primer regulálására* vonatkozóan az említett hőérzékeny lambda indukciós rendszer vizsgálata is alkalmasnak bizonyult (SZENDE K., OROSZ L.). A c_I régió eme hőérzékeny mutánsai egy olyan repressziós rendszerrel rendelkeznek, mely alacsony hőmérsékleten normálisan működik, magas hőmérsékleten — feltehetően a represszor fehérje szerkezetének megváltozása következtében — a repressziós működés felfüggesztődik és a fágtermelés indukálódik. Ezek a mutánsok c_{II} típusú feltehetően a lizogéneződésben defektes mutánsoktól a komplementációs teszttel elkülöníthetők, de egymás közt is csoportosíthatók, attól függően, hogy teljes értékű tápoldatban, illetőleg puffer-oldatban történt-e az indukció. (LIEB, M., 1966; HORIUCHI, T. és INOKUCHI, H., 1967. adataihoz hasonlóan). A két repressziós rendszer között a különbség arra mutat (l. HORIUCHI és INOKUCHI), hogy az egyik esetben a mutáció a fehérje monomerek érzékenységét okozza, míg a másik esetben a multimer alegységei közötti kapcsolatban következik be a változás a magas hőmérséklet hatására. Természetesen a további vizsgálatok, így remélhetőleg az intracisztronos komplementálások adatai felvilágosítást nyújtanak majd többek között a mutációs sérülés valódi természetéről.

Az elmondottakban a baktérium és fág kromoszóma szerkezetéről és működéséről sikerült talán egy általános képet adni, beleillesztve az Intézetünk munkatársai által idehaza és külföldön végzett ezzel kapcsolatos munkát.

A kép természetesen nem teljes, nem is lehet teljes egyrészt a kutatási terület nagy felülete miatt, másrészt azért, mert az általunk végzett munka nem terjed ki, de nem is terjedhet ki a szerteágazó kutatás minden ágára. Egyet azonban le kell szögezni: a prokarion kromoszóma szerkezetének és működésé-

nek vizsgálatával alapvető törvényszerűségek állapíthatók meg és ezek közösek a magasabbrendű szervezetek kromoszómájának szerkezeti és működésbeli törvényszerűségeivel.

Mindenekelőtt közös maga a genetikai anyag. Közös a funkcionális szerveződés elve. Feltehetően azonos a genetikai kód a maga degeneráltságával. És ugyancsak valószínű az, hogy a magasabbrendű kromoszómára is érvényes az egy cisztron— egy polipeptid (egy gén — egy enzim) elv. Ha nem teljes mértékben, de érvényes a szekvencialitás elve, mind szerkezetileg, mind funkcionálisan. Természetes viszont az, hogy a magasabbrendű kromoszóma összetettebb szerkezetével, összetettebb funkcionális és regulációs rendszer jár együtt. A közös vonások száma nem sok, de nem is kevés és a jövő kutatása még számos kérdést old majd meg ezen a területen.

GEORGE BEADLE szerint a biológiában minden egyszerűsített elképzelés rossz. Pontosan azért, mert egyszerű. Én úgy vélem, ez az elv itt nem érvényes. Az egyszerű szerveződésű biológiai struktúrák vizsgálata igenis számos, az összetettebb struktúrák szerkezeti és működési sajátosságaira adhat majdan felvilágosítást.

IRODALOM

BALASSA, R. és M. GÁBOR: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. **11**, 329—339 (1965).
BEADLE, G. W.: in: Phage and the origins of molecular biology. Ed.: J. Cairns et al., Cold Spring Harbor Lab. of Quant. Biol. Long Island, N. Y. 1966.
BENZER, S.: in: The chemical basis of heredity. Ed.: W. D. McElroy és B. Glass. Johns Hopkins Press, Baltimore (1953).
CAIRNS, J.: J. Mol. Biol. **6**, 208—213 (1963).
CAMPBELL, A. M.: in: Adv. in Genetics **11**, 101—145 (1963).
FIERS, W. és SINSHEIMER, R. L.: J. Mol. Biol. **5**. 424—434 (1962).
FINCHAM J. R. S.: Genetic complementation. W. A. Benjamin Inc. New York, (1966).
FISHER, R. A.: The genetical theory of natural selection. Clarendon Press, Oxford (1930). (cit. in *Stahl, F. W.* 1966.)
GÁBOR, M.: Genetics **52**, 905—913 (1965).
GÁBOR, M. és R. D. HOTCHKISS: Proc. N. A. S., U. S. **56**, 1441—1448 (1966).
HERSHEY, A. D., BURGI, E. és INGRAHAM, L.: Proc. N. A. S., U. S. **49**, 748—755 (1963).
HORIUCHI, T. és INOKUCHI, H.: J. Mol. Biol. **23**, 217—224 (1966).
JACOB, F. és WOLLMAN, E. L.: cit. Jacob, F. és Wollman, E. L. Sexuality and the genetics of bacteria, Academic Press, New York, 1961. (1958).
KENT, J. L. és HOTCHKISS, R. D.: J. Mol. Biol. **9**, 308—322 (1964).
LACKS, S.: J. Mol. Biol. **5**, 119—131 (1962).
LIEB, M.: J. Mol. Biol. **16**, 149—163 (1966).
SIK T. (kéziratban).
SIK T. (kéziratban).
STAHL, F. W.: The mechanics of inheritance. Prentice Hall. Englewood Cliffs, N. J. (1964).
STAHL, F. W. és MURRAY, N. E.: Genetics **53**, 569—576 (1966).
STREISINGER, G., EDGAR, R. S. és DENHARDT, G. H.: Proc. N. A. S., U. S. **51**, 775—779 (1964).
SZENDE K. (előkészületben).
SZENDE K. és OROSZ L. (kéziratban).
SZENDE K. és REGŐS J. (előkészületben).
C. A. THOMAS jr.: J. gen. Physiol. **49**, (6/2), 143—169 (1966).

NÖVÉNYEK EVOLÚCIÓS VÁLTOZÁSAINAK GENETIKAI ELEMZÉSE

VIDA GÁBOR
MTA Genetikai Intézet

Az evolúció kutatásának két fő megközelítésmódja szokásos. Vannak, akik az egyes rokonsági körök konkrét leszármazását kutatják a paleontológiai leletek vizsgálata és a ma élő fajok összehasonlítása alapján, s e megfigyelésekből nyert adatokat a filetikus összefüggéseket feltüntető törzsfák megszerkesztésében összegezik. Mások ezzel szemben populációkon végzett megfigyeléseken és kísérletezéseken keresztül arra a kérdésre igyekeznek feleletet adni, hogy milyen módon halad az evolúció, melyek az evolúciós változások legfontosabb általános tényezői. Míg az előző csoportba paleontológusok és filogenetikai szemléletű szisztematikusok tartoznak, a másik kategóriát a genetikusok alkotják.

Az elkülönülés kontrasztja az utóbbi időben egyre inkább csökkent, mivel az evolúció mechanizmusának teljesebb megismerésével lehetőség nyílik az egyes rokonsági körök konkrét evolúciós összefüggéseinek és a változásban szereplő tényezők egyidejű kimutatására is.

Az evolúció fő tényezőiben ma már legtöbb kutató egyetért. Az evolúciós mozgás populáció-szinten megy végbe. Az örökletes variabilitás végső forrása a génmutáció, mely a genetikai rekombinációkon s a kromoszóma-szerkezeti és számbeli megváltozásokon keresztül a genotípusok számának további fokozásához vezet, s így bő anyagot biztosít a szelekció számára a populáció adaptív normájának kialakításához. Az egyes populációk eltérő környezete s a véletlen más-más adaptív normát alakít ki, s így a populációk genetikai divergálódásához vezet. A migráció és a hibridálódás révén ez az elkülönülés ismét serkentőleg hathat vissza a populáció-rendszer evolúciós sebességére is. Az izoláció tökéletesedésével végül új fajok alakulnak ki. Ez a folyamat a mikroevolúció, amely kedvező esetben az evolúció időskáláján végtelenül kicsi emberöltő alatt is megfigyelhető illetve utánozható. A nagyobb taxonómiai kategóriákat is átlépő makroevolúciós változások genetikai vizsgálatára egyelőre kevés lehetőség van. Ennek ellenére valószínűnek látszik, hogy a makroevolúció mikroevolúciós változások hosszú sorából áll, amelynek megértéséhez nincs szükség valami más, a mikroevolúciótól lényegében eltérő mechanizmus feltételezésére.

MTA Biol. Oszt. Közl. 10. (1967)

A mikroevolúció vizsgálatában szintén fellelhető a kétféle megközelítésmód, de itt a két módszer egymásrautaltsága és együttműködése sokkal szembetűnőbb. A már említett evolúciós faktorok mechanizmusának vizsgálata akkor vált jelentőssé, amikor bebizonyosodott, hogy e tényezők valóban szerepet játszanak a természetben végbemenő vagy a nemesítő által irányított evolúcióban. Így elsősorban evolúciógenetikai céllal folyik intézetünk növénygenetikai osztályán a mutációk indukálása a *Chaenorrhinum* és *Lycopersicon* fajokon (Győrffy Barna és Makó József), a *Nicotiana* fajok poliploidálása és keresztezése (Szilágyi Miklósné és Kovács János), a plasmongenom kölcsönhatásokon alapuló izolációs mechanizmusok tisztázása az *Epilobium* nemzetségben (Győrffy Barna) vagy a *Lycopersicon* aneuploidok populációdinamikai és citológiai elemzése (Makó József).

A mikroevolúció másik megközelítésmódja nem az evolúció faktoraiból, hanem a természetben már végbement komplex evolúciós megváltozásokból indul ki, s ezek alapján igyekszik következtetni az evolúciós faktorok szerepére egy szűkebb rokonsági körön belül.

A természetben végbement evolúciós változás kimutatása taxonómiai vagy genetikai módszerekkel történhet. A taxonómiai vizsgálatok során az egyes taxonok exo- vagy endofenotípusának elemzésével (morfológiai, anatómiai, chemotaxonómiai, citotaxonómiai vizsgálatok), esetleg az adatok matematikai feldolgozásával (numerikus taxonómia) képet kaphatunk ugyan a fajok divergáltságának mértékéről, de csak kivételes esetben tudunk egy-egy evolúciós tényező (pl. poliploidia) szerepére biztosan következtetni. A genetikai módszerek ezzel szemben a kérdéses taxonok hibridjeinek előállítására, s ezek alapján az egyes evolúciós faktorok konkrétabb demonstrálására irányulnak.

A hibrid-vizsgálat módszere a szülők közötti reproduktív izoláció mértékétől és természetétől függ. Ha az F_1 fertilis (ami többé-kevésbé általános az intraspecifikus hibridek esetében), lehetőség van a hasadó nemzedékek elemzésére. Ilyen módszerekkel sikerült intézetünkben az *Anagallis arvensis* négy intraspecifikus taxonjának eredetét felderíteni (Győrffy Barna). A keresztezések alapján bebizonyosodott, hogy a kérdéses taxonok eredetében a legjelentősebb szerepet egyetlen — virágszínnel kapcsolatos — lókusz mutációs megváltozásaival kialakult poliallél sor kialakulása jelentette.

A különböző poliditású vagy más-más fajhoz tartozó taxonok esetében az F_1 sterilitása nem teszi lehetővé az előbbi módszerek alkalmazását. Ilyenkor viszont citogenetikai elemzéssel hasonlíthatjuk össze a szülőfajok genomjait. Mivel az összehasonlítás legtöbbször a homológ (illetve homoeolog) kromoszómák meiotikus (olykor szomatikus) párosodásán alapul, különös fontosságú az evolúciós interpretálás előtt annak a kérdésnek az ismerete, hogy milyen tényezők befolyásolják a párosodás mértékét. Minthogy a kromoszóma-párosodás endofenotípusos jelenség, várható, hogy kialakulásában a genotípusos

kontroll mellett környezeti tényezők is szerepet játszhatnak. A meiotikus párosodás elmaradása genotípusosan génikus és kromoszomális (strukturális) különbségeken alapul. Különösen az előbbi hatása jelentősen befolyásolható környezeti tényezőkkel is [v. ö. Grant (1952) *Gilia millefolia* X *achilleaefolia* hibridje]. Ha a párosodás elmaradása génikus okokra vezethető vissza, legtöbbször poliploidiával sem lehet a fertilitást helyreállítani. Ha azonban a génikus kontroll csak a homoeolog kromoszómák párosodására vonatkozik, a poliploidok citológiai képe az amfidiploidokéval azonos. Erre legszebb példa a hexaploid búza kialakulása, amelynek a diploid progenitor-fajokból történő reszintézisével intézetünkben Lelley Tamás foglalkozik a kiszombori és kecskeméti búzanemesítőkkel együttműködésben.

Japán, angol és amerikai kutatók vizsgálatai alapján ma már jól ismert a búza genomjainak (AABBDD) eredete. A $2n = 42$ kromoszómaszámú hexaploid búza esetében lehetséges volt minden kromoszómára nulliszóm egyedeket létrehozni, ami egymagában is a háromféle genom rokonságára utal. Ez a tény még kifejezettebb volt, amikor nulliszóm-tetraszóm keresztezésekkel beigazolódott, hogy bizonyos kromoszómák hiányát (nulliszóm) más kromoszómák tetraszóm állapota kompenzálni tudja. Sears és munkatársai így hét 3—3 kromoszómapárból álló kompenzációs csoportot állapítottak meg, amelyek a kromoszómák azonosításai alapján a háromféle genom (A, B, D) hasonlóságát igazolták.

A genetikai hasonlóság ellenére e genomok között nincs párosodás. Riley és munkatársainak szisztematikus kísérletezései egyértelműen arra az eredményre vezettek, hogy a genomok közötti homoeolog párosodást gátló gén(ek) az *Aegilops speltoides*-ből származó B genom ötös kromoszómájának hosszabbik karján van lokalizálva. E megállapítás elméleti evolúciógenetikai és citogenetikai jelentősége mellett óriási gyakorlati hasznot is jelenthet, mivel így az 5B kromoszómára deficiens *Triticum* szerelvénnyel létrehozott hibridekben tág lehetőség van kromoszómaszegmentek intergenomos kicserélődésére, s így új fajták létrehozására.

A hibridek meiotikus párosodásának vizsgálata legegyszerűbben a diploid szinten illetve amfihaploidokban történhet, amikor is a bivalensek előfordulási gyakoriságából következtethetünk a genomok közötti — egyes kromoszómákra vagy kromoszóma-szegmentekre kiterjedő — homológiára. Transzlokáció azonban egyes kromoszómák közötti gametális szintű szegmentális homológiát eredményezhet, ami egy amfihaploidban megtévesztő lehet.

A diploid szinten olykor fellépő inkompatibilitás leküzdésére olykor a genomanalízist magasabb ploid-szinten kell elvégezni. Így sesquidiploidokban a trivalens gyakoriság, míg amfidiploidokban a multivalens gyakoriság informatív. Intézetünkben sesquidiploid elemzéssel *Lycopersicon* fajhibrideken (Győrffy Barna és Makó József), amfidiploidok citológiájával a *Nicotiana* nemzetségben (Szilágyi Miklósné) foglalkoznak.

Az evolúciós tényezők az egyes rokonsági körökben más-más módon hatnak, s így nem lehet általános szabályt felállítani a végbement evolúciós változások genetikai elemzésére. A téma kissé konkrétabb megvilágítására azonban az alábbi példák szolgálnak.

Az 1950-ben megindult *Pteridophyta*-citológiai kutatások ma már kb. harminc genusban mutatták ki az evolúciós megváltozások különféle fajtáit. Mindezekből bebizonyosodott, hogy a harasztok mai evolúciós mozgásában a poliploidia és a hibridálódás igen jelentős szerepet játszanak. E genom-szintű evolúciós változásokra citogenetikai módszerekkel sok esetben nagyon világosan sikerült következtetni.

Talán a legegyszerűbb példa erre a *Polystichum* páfránygenus egyes európai fajainál kimutatott evolúció. A tisztázandó eredető tetraploid *Polystichum aculeatum* kétféle genomot tartalmaz (XXYY). Redukciós osztódás után minden ivarsejt XY genomot visz át az utódba. Így a diploid *P. setiferummal* (SS genomok) keresztezve XYS genomokból álló triploid hibridet kapunk. Mivel e hibrid meiozisában két genom kromoszómái homológnak bizonyultak (bivalensek), az egyik ismeretlen helyére egy S-t helyettesítünk (XSS). Hasonlóan triploid hibrid citológiai elemzésével tisztázódott a másik genom (X) eredete is (*P. lonchitis* LL fajból). Ezek ismeretében a *P. aculeatum* tetraploid fajt (LLSS) reszintetizálhatjuk. Valóban, a *P. setiferumx P. lonchitis* steril diploid hibridje (LS) morfológiailag lényegében megegyezik a *P. aculeatum* fajjal.

Hasonló egyszerű elemzés nem mindig lehetséges. A *Dryopteris* nemzetségben pl. az egyes taxonoknál jelentkező obligát apogámia egyik citológiai következménye, hogy a hibridekben a szomatikus kromoszóma-szerelvényen belüli kromoszóma inhomológia nem elemezhető, mivel a spóraanyasejtek restitúciós kialakulása folytán minden kromoszóma megkettőződik s így az újonnan keletkezett homológ párok között tökéletes párosodás van. E jelenség szembetűnő következménye, hogy a szomatikus és gametális kromoszómaszám megegyező. Olykor azonban itt is lehetőség van citogenetikai elemzésre a restitúció-mentes 16 spóraanyasejtes sporangiumokban végzett meiozis vizsgálatok révén.

A legrészletesebb feldolgozás az európai páfránygenusok között az *Asplenium* nemzetségben valósult meg szerencsés nemzetközi együttműködésben. E feldolgozás során a konkrét evolúciós összefüggések kimutatása mellett bebizonyosodott, hogy a tág értelemben vett autopoliploidia is jelentős evolúciós faktor. Ugyanakkor a vizsgálatok arra is utalnak, hogy a poliploidiával a kromoszóma-méret jelentősen csökken, talán a kromoszómák laterális multiplicitásának megváltozása útján.

A mikroevolúció vontatottan megy előre. Hasonlóan halad az evolúciógenetika tudománya is. A mikroevolúció lassú, folyamatos változásában azonban időnként gyorsabb, hirtelen megváltozások is ismeretesek: a többé-

kevésbé izolált populációban az eltérő környezet hatása alatt a faj politípusos jellege bontakozik ki, majd egy hibridizáció alkalmával a különböző gének egy populációban egyesülnek. A kialakult adaptív normák a hibridálódás hatására átmenetileg felborulnak ugyan, de a szelekció hatására hamarosan megszületik egy új, a régieket esetleg messze felülmúló tökéletesebb génállomány. Hasonló lüktető fejlődés tapasztalható az evolúciógenetika tudományában is. Bizonyos mértékű elkülönülés, eltérő környezetben, eltérő koncepciók (adaptív norma) kialakulásához vezet. Az eltérő szemléletek génjeinek kicserélése megfelelő szigorú szelekcióval azonban mindig gyors fejlődéshez, tökéletesedéshez vezet.

MTA BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK 1967. MÁJUS 3-ÁN TARTOTT ÜLÉSE

Törő Imre elnök: A Biológiai Tudományok Osztálya kibővített osztályülését megnyitom. Mai osztályülésünk egyetlen tárgya az osztályvezetőség beszámolója az Osztály hároméves munkájáról. A beszámolót Straub Brunó osztálytitkár írásban kiküldötte, úgyhogy ismétlések elkerülése végett nem kerül sor az anyag előadására, hanem a fő hangsúlyt a vitára fektetjük. Bevezetésképpen Straub elvtárs kíván néhány szót szólni.

Straub F. Brunó: Tisztelt Osztálygyűlés! Kedves Vendégeink!

Ez évben az Osztályvezetőség beszámolóját nyomtatásban közreadtuk* a mellékletekkel együtt, ezért annak ismertetésétől eltekintünk és az időt a beszámoló megvitatására, a következő feladatok megbeszélésére fordítjuk. Engedjék meg, hogy néhány rövid szóval kiemeljem azt, amit különösen fontosnak tartok.

A hároméves beszámoló mutatja, hogy a Biológiai Osztály területén a kutatás lehetőségei hatalmas mértékben növekedtek. Akár intézeteink, akár a támogatott tanszékek helyzetét hasonlítjuk össze a három év előttivel, lényegében mindenütt azt látjuk, hogy lehetővé vált a korszerű módszerek alkalmazása, a korszerű témák felvetése és azt hiszem mindannyian egyetértenek abban, hogy a tudományos értékelés szelleme, az igényes kutatás egészséges közszellemének fejlődése területén is komoly előrehaladást értünk el. Az a szervező munka, amely a biológia egyes területeinek gyorsabb haladása érdekében a szegedi biológiai kutatóintézetek tervezésével és előkészítésével kapcsolatos, már gyakorlati eredményeket is hozott, hiszen a felkészülés nemcsak szervezés volt, hanem egyúttal máris megnövekedett biológiai kutatást jelent. A kutatómunkában elindított új káderek, a külföldi utazások számának fokozódása, a szegedi intézetek megindításához szükséges műszerek egy részének beszerzése, máris igen széles fronton megindította a nívó emelke-

* Melléklet az Elnökség beszámolójához az MTA CXXVII. közgyűlésén 1967. május 2. 193—212.

dését, az eredményesebb munkát. A tegnapi közgyűlésen az Elnökség beszámolójából, valamint Ajtai Miklós elvtársnak a párt és kormány képviseletében elmondott szavaiból hallhattuk, hogy a biológia kiemelt fejlesztésének gondját felettes szerveink magukévá teszik és ahhoz támogatásukat megadják.

Jelenleg, véleményem szerint, két fővonalon kell a Biológiai Osztály munkáját folytatnunk. Az egyik természetesen a szegedi program realizálása. A közeljövőben kell kezdeményezésünket valóra váltani és következetesen meg kell valósítanunk, amit kimondottunk. Egyrészt a szegedi intézetek kutatógárdájában a fiatal, de érett kutatóknak felelősségteljes hatáskört kell biztosítanunk a kutatás irányításában — ez a korszerűség legfontosabb záloga. Másrészt keresztül kell vinnünk azt az elvet, hogy ezek az intézetek az egyetemek biológiai és alkalmazott biológiai intézeteivel a legszorosabb munkakapcsolatba kerüljenek az oktatás és a kutatás területén. Végül, s talán ez a legfontosabb, az intézetek tematikájában az alkalmazott biológiai kutatások, a biológiai alkalmazás fő feladatainak világosan tükröződniök kell.

Amikor a szegedi intézeteket terveztük, hangsúlyoztuk azt az elvet, hogy a kutatók bizonyos kritikus tömegére van szükség ma ahhoz, hogy eredményes, korszerű munkát lehessen végezni. Az egymás közelében dolgozó, különböző eredetű szakképzettséggel rendelkező, különböző kutatási irányokban jártas kutatók együttműködése csak így járhat optimális eredménnyel. Ezt a gondolatot logikusan tovább kell vinni. Ugyanúgy, ahogy egy kutató izoláltan ma már nagyon keveset ér, ugyanúgy rendkívül veszélyes tulajdonsága egy kutatóintézetnek, ha izolálódik. Különösen fenyeget ez a veszély alapkutatási intézményeknél. Nem lehet az a célunk, hogy a magyar tudományos élet meglevő, élő szervezetéből egy bizonyos sejtféleséget izoláljunk és azt in vitro elszaporítsuk. Mai tudásunk szerint az ilyen eljárás inkább a daganathoz hasonló növekedést jelent. Nekünk a szervezet egészséges növekedését kell lehetővé tennünk s ez csak úgy lehet, ha a fejlődés bizonyos szakaszaiban a kritikus szervek és szövetek fejlődését elősegítve megőrizzük ezeknek a szervezet egészével való kapcsolatát.

Ez elvezet a másik gondolathoz, amit hangsúlyozni akarok. Láttuk, hogy a biológia bizonyos területeinek fejlesztését 1962-ben elkezdve, kb. 5—10 év az a reális idő, ami után komoly eredmények várhatók. A közeljövőben tehát parancsolóan arra kell fordítanunk figyelmünket, hogy a biológia egyéb területeinek és a biológiával kapcsolatos tudományterületeknek az igényeit hosszabb távra hogyan tudjuk legjobban kielégíteni. Ma még nem mondhatjuk, hogy ezt elhanyagoltuk volna. Egyrészt szeretném azt hangsúlyozni, hogy a kiemelten fejlesztett területek előrehaladása a biológia egyéb ágai számára is sok hasznot hajtott. Előrehaladást tudtunk elérni a biofizikától és genetikától távoleső területeken is, a botanikában, zoológiában, antropológiában, élettanban, morfológiában is. Nem lehetünk azonban meg-

elégedve azzal, amit a határterületek, az orvosi és az agrártudományok, az élelmiszer és gyógyszeripar problémáival kapcsolatosan ránk háruló feladatok megoldására tettünk. Az újrendszerű biológusképzés minden bizonnyal igen sokat fog jelenteni ezen tudományágak korszerűen képzett biológus káderszükségletének kielégítésére. Ez azonban nem minden, amit tehetünk. Véleményem szerint a következő években meg kell vizsgálnunk a most erősen támogatott tudományágak és a biológia egyéb ágai közötti kapcsolatokat és ezen keresztül kell biztosítanunk, hogy ez a fejlesztés ne egyes területek öncélú kiemelését, hanem valóban a magyar tudomány fejlesztését jelentse.

HOZZÁSZÓLÁSOK

Kaszab Zoltán: Tisztelt Elnök Úr! Tisztelt Osztályülés!

Az Osztályvezetőség beszámolója átfogó képet ad nemcsak az akadémiai intézetek és a támogatott kutatóhelyek hároméves munkásságáról, hanem általában a biológiai kutatás egész helyzetéről is. A beszámoló több, távlati kutatásaiban is döntő elvi megállapítást tartalmaz. Szerintem valamennyi megállapítás között a legfontosabb annak a tételnek a határozott leszögezése, hogy a Biológiai Osztály feladatának tekinti a biológia összes területein a fejlődés lehetőségeinek megteremtését.

E tétel következetes alkalmazása nyilvánul meg az Osztály egész tudománypolitikájában és abban az eltökélt törekvésében, hogy a biológiai tudományok jövőjét meghatározó szakterületeken a hazai kutatások világszintű művelésének lehetőségét biztosítsa. Amikor ennek érdekében egyes tudományterületeket kiemel és a rendelkezésre álló anyagi erőket koncentrálja, teszi ezt éppen a biológia egységének és oszthatatlanságának a jegyében, abban a meggyőződésben, hogy egészséges fejlődés csak akkor képzelhető el, ha a tudományterület arányosan fejlődik.

Az arányos fejlődés komplex kérdés. Sok tényezőtől függ, s szinte minden országban más és más a kiindulási alap. Döntően befolyásolják a fejlődést a gyakorlat igényei is.

Az egyes szaktudományok fejlődése világszerte nagyon különböző ütemben történik. Így van ez a mi viszonyaink között is, és éppen az arányos fejlődés biztosítására szolgál az a koncepció, hogy a fejlesztésre rendelkezésre álló nem csekély összegeket a kiemelt tudományterületek számára biztosítsuk.

Ezzel függ össze az a nagyon határozott formában megfogalmazott és mindenki számára igen megnyugtató megállapítás, hogy a kiemelés és az anyagi juttatás mértéke nem jelent értékítéletet.

Minden kutató, aki igazán szereti a saját szaktudományát, érdeklődéssel és megértéssel kell hogy forduljon a többi területek problémái felé is, hiszen a kölcsönhatás, ha nem is azonnal, de később biztosan jelentkezik, és így egy terület lemaradása az egészre visszahathat.

Ezek előrebocsátása után a zoológia tárgykörébe tartozó néhány kérdéssel kívánok egészen röviden foglalkozni.

Nem hiszem, hogy bárki is elfogultsággal vádolna meg, ha azt állítom, hogy a zoológia területén az elmúlt évtizedben nemcsak a hazai szakkörök,

de a nemzetközi közvélemény elismerését is kivívó számos eredmény született, többek között a talajzoológia, taxonómia, ökológia, zoozönológia területén, stb. Hozzá kell tenni azt is, hogy viszonylag csekély anyagi áldozatok árán. A zoológia számos területén sikerült biztosítani a nemzetközi színvonalat, sőt hazánk több vonatkozásban központja a nemzetközi síkon folyó kutatásoknak.

Ezek ismert dolgok, s amikor egyrészt örülünk a sikereknek, ezek a tények a zoológia egészét illető megítélésben már kevésbé örvendetesek is lehetnek, mert azt a hitet kelthetik a tudományterülettől távolabb állókban, hogy itt minden rendben van, a kutatás nemzetközi színvonalon folyik és az a fejlesztés, amelyet a zoológia élvez, elegendő a zoológia világszínvonalú megtartására. Kétségtelen, hogy a terület nagy részét illetően ez így is van.

Szeretném azonban felhívni a figyelmet egy tudományterület sorsára, mert úgy érzem, hogy itt szervezett közbelépésre van szükség, ugyanis a lemaradás a világszintű kutatáshoz mérten súlyos következményekkel járhat.

A parazitológiáról van szó. Sokan feltehetik a kérdést, miért kell ezt a Biológiai Osztályon előhozni, hiszen az Agrárosztálynak van Parazitológiai Kutatóintézete, az állatorvosi és orvosi egyetemeken is vannak parazitológiai intézetek — és ez nem elég?

Nem vitás, hogy a parazitológiának a gyakorlat számára is legfontosabb alapkutatási és alkalmazott területei a haszonállatok és az emberek parazitáinak sokoldalú tanulmányozása. Ezek végső soron állat- és emberegészségügyi problémákhoz kapcsolódnak, tehát nem tartoznak a Biológiai Osztály hatáskörébe.

Van azonban e tudományterületnek egy tisztán biológia, közelebbről zoológiai aspektusa is, nevezetesen az egész állat- és hozzátehetjük — növényvilág parazitáinak tanulmányozása. Ez olyan óriási és mondhatni önálló terület, amellyel egyetlen állat- vagy emberegészségügyi parazitológiai intézet sem képes megbírkózni.

Aki ismeri a baráti államok, például Csehszlovákia, Lengyelország, Bulgária, nem is szólva a Szovjetunió — ide vonatkozó adatait, meglepődik azon és szinte értetlenül áll a tény előtt, hogy nálunk ez a terület miért is maradt le ennyire?

Ne kutassuk most ennek okait, sem a konkrét módokat ennek orvoslására. Most csupán az a célom, hogy felhívjam az Osztályvezetőség figyelmét egy olyan jelenségre, amely viszonylag könnyen orvosolható, s a befektetés hamar visszatérül. Még egy kérdést kívánok röviden érinteni.

Az Osztályvezetőség beszámolója foglalkozott a szakbizottságok munkájával, és értékelve azt, nagyon finoman és árnyaltan megfogalmazott kritikát gyakorolt. Úgy érzem, hogy a kritika jogos és találó. Okai azonban kézenfekvőek.

A legfontosabb tényező talán az, hogy mennyire szoros a bizottságok kapcsolata az Osztállyal, ez viszont nyilván függvénye annak a szerepnek, amelyet az Osztály az egyes bizottságoknak szán. Ahol kiemelt kutatási területek széles körű felmérését, új kutatások beindítását kell megszervezni, ott a bizottságoknak is messzemenő szerepük van, és tevőlegesen, irányítóan befolyást gyakorolnak a szakterületekre, azok valóságos gazdáivá válnak. Az is nyilvánvaló, hogy az ilyen bizottságokba az adott terület legjobb, legkiválóbb szakembereit vonják be.

Ahhoz, hogy valóban jó, aktív bizottságok működjenek, nem elég az aktív elnök és az aktív titkár, hanem aktív bizottsági tagok is kellenek. Nagyon helyesnek tartom az Osztály állásfoglalását a bizottsági tagok részleges újraválasztását illetően, mégis azt javasolom, hogy az új bizottságok választása esetén az Osztály ne alkalmazza mereven a tagok 30 százalékának cseréjét olyan esetekben, amikor jól összedolgozó, aktív bizottságokról van szó. Ugyancsak meggondolandó a titkár személyének három évenkénti váltása, hiszen mire valóban jól beletanul a munkakörébe, és a tudományterületet minden ízében áttekinti, addig a mandátuma is lejár.

A másik, ami gátlólag hat a bizottságok, többek között a Zoológiai Bizottság munkájára is, hogy egyes szakterületek nincsenek eléggé körülhatárolva. Az a szervezési forma, amely a szakterület körülhatárolása helyett az egyes intézeteket osztotta be a bizottságok munkakörébe, aligha kedvez olyan törekvéseknek, hogy a bizottságok a szakterületek gazdáivá váljanak.

Úgy érzem, hogy ezek a nehézségek könnyen áthidalhatók és az új bizottságok személyi összetételét, feladatát, hatáskörét az új igényeknek megfelelően és az Osztályvezetőség kritikájának figyelembevételével kell majd megszabni.

Várterész Vilmos: Mélyen tisztelt Elnökség! Mélyen tisztelt Osztályülés! Először is örömmel üdvözlöm az Osztályvezetőségnek azt az új módszerét, amely szerint a beszámolót nyomtatásban előre megkapták a meghívottak, és így alkalom nyílott arra, hogy azt behatóan, alaposan, elmélyülten tanulmányozhassuk.

Én magam is érdeklődéssel olvastam az Osztályvezetőség beszámolóját, és most szeretnék egy olyan kérdéshez hozzászólni, amely nem szerepel abban. Ez a kérdés minket, akik nem tartozunk az Akadémia intézeteihez és lényegében nincs szerves kapcsolatunk az Akadémiával, már évek óta foglalkoztat. E hozzászólásomra a beszámoló második mondata ösztönözött, amely szerint a beszámoló vizsgálja azt, hogy a beszámolási periódusban milyen változások mentek végbe a biológia területén.

Ha ezt a mondatot olvassuk, akkor arra kell gondolnunk, hogy a magyar biológia egész területén végbement változásokról szól a beszámoló; ezzel szemben végigolvasása után hiányérzete támad annak, aki nem szerepel benne. Vannak a biológiának területei, amelyek a beszámolóból kimaradtak, és azt, hogy ez így van, a saját példánkkal szeretném illusztrálni.

A mi intézetünk, az Országos Frédéric Joliot-Curie Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet már a nevében is mutatja, hogy biológiai intézet, és lényegében az egész sugárbiológia is a biológiai tudományok közé tartozik. Intézetünknek megvannak a kapcsolatai az Akadémiával, hiszen kutatóink 20 százaléka akadémiai tudományos fokozattal rendelkezik, és mi a Biológiai Osztályhoz tartozónak érezzük magunkat. Ha ebben a beszámolási időszakban intézetünkben nem is születtek nagy és világraszóló felfedezések, de komoly kutató munka folyt. Ezt bizonyítja, hogy ebben az időszakban 94 közleményünk jelent meg, hogy az intézet munkatársai különböző hazai és külföldi kongresszusokon számos előadásban számoltak be eredményeinkről. S hogy ez a munka nem teljesen elhanyagolható, azt bizonyítja az is, hogy nemzetközi szervezetek szakértőként többeket meghívtak intézetünk munkatársai közül. Tehát a beszámolási időszakban intézetünk sokat dolgozott a sugárbiológia területén.

Ennek ellenére a sugárbiológia egészéről a beszámolóban csak néhány szó esik a pécsi Biofizikai Intézet munkájával kapcsolatban, és teljesen kimaradtak azok a kutatások, amelyek nemcsak intézetünkben, hanem az országban másutt is folynak.

A sugárbiológia jelentősége egyre nő, hiszen most már nemcsak az atomenergia felhasználásával és az űrkutatással kapcsolatos problémák tartoznak ide, hanem pl. a szuperszonikus repülőgépek alkalmazhatóságával kapcsolatban is sugárbiológiai problémák merülnek fel.

Egyébként más területeket is fel lehetne említeni, amelyek a beszámolóból kimaradtak; én magam is tudnék példákat felhozni. Az is kiviláglik azonban — és ezt régóta tudjuk —, hogy az osztályvezetőség beszámolója tulajdonképpen csak az Akadémia intézeteire és az Akadémia hatáskörébe tartozó fő feladatok területén folyó kutatásokra vonatkozik; ez az oka ennek a helyzetnek. A Magyar Tudományos Akadémia azonban a magyar tudomány legfőbb irányító és koordináló szerve, s ilyen szemszögből nézve a dolgot, feltétlenül helyes, sőt szükséges lenne — talán meg lehetne találni ennek módját az Akadémia apparátusának jelentős bővítése nélkül —, hogy az Akadémia tájékozódása a közvetlen szféráján kívül folyó kutatásokra is kiterjedjen, hogy amikor egy osztályvezetőség a területéhez tartozó munkáról beszámol, akkor valóban az egész országban folyó munkát mérje fel és értékelje. Egészen biztos, hogy meg lehetne találni a módját ennek.

Ezzel a felszólalással nem is reklamálni akarom azt, hogy egyes területek kimaradtak a beszámolóból, hanem inkább javaslatot szeretnék tenni arra, hogy a Magyar Tudományos Akadémia tevékenysége a jövőben arra is terjedjen ki, hogy az egész ország területén folyó tudományos munkát felmérje. Azt hiszem, hogy ennek megvan a lehetősége. Talán egyik módja lehetne az, hogy a más főhatóságokhoz tartozó területekről az illető főhatóságok összefoglaló beszámolót, értékelést adnának az Akadémia megfelelő osztályainak. Ez nagyon hasznos lenne, és azt hiszem, nagymértékben hozzájárulna ahhoz, hogy a Magyar Tudományos Akadémia betöltse azt a szerepet, amelyet a tudományok irányítása területén be kell töltenie.

Horváth Imre: Tisztelt Elnökség! Tisztelt Osztályülés! Azzal a megjegyzéssel kezdem hozzászólásomat, amellyel Várterész Vilmos kezdte. Nagyon jó módszernek tartom én is az osztálybeszámolónak előre való kiküldését, különösen akkor, amikor hosszabb időszak eseményeiről számol be. Így sokkal több idő jut a diszkusszióra, a vitára.

A beszámoló nagyon sok olyan problémát érintett, amely az Osztály hároméves tevékenységére jellemző és átfogja az Osztály teljes hatáskörét. A magam részéről ezek közül mindössze néhány problémához szeretnék hozzászólni.

Az Osztályvezetőség beszámolója pozitívan ítéli meg a molekuláris biológiai komplex bizottság munkáját, különösen azért, mert a határterületeken folyó kutatómunkát jól összefogja, és mint a beszámoló le is rögzíti, „katalizálja" azt.

Ezzel kapcsolatban két gondolatot szeretnék felvetni. Egyik az, hogy a beszámolóban az intézmények közötti kollektív kutatómunkáról van szó, és a beszámoló ennek előnyét, fontosságát emeli ki. Részemről viszont az intézményeken belüli kollektív kutatómunka jelentőségét szeretném hangsúlyozni. Straub osztálytitkár korábban a publikációk megjelentetésével

kapcsolatban „futballcsapatokról" beszélt, jelezve, hogy az a jó, amikor sok szerző közösen publikál kutatási eredményt. Mostani rövid bevezető előadásában felhozott hasonlata a sejtről és az egész organizmusról szintén nagyon találó volt.

Ezért úgy gondolom, hogy nagyon időszerű az intézményen belül folyó kollektív munka kérdésének felvetése, annál is inkább, mert nagyon sok intézményről tudunk, ahol tíz-tizenkét témával is foglalkozik az a 4—5 kutató, aki ott dolgozik. Ehhez még azt tenném hozzá, hogy könnyebb kollektívan dolgozni intézetek között, talán még könnyebb kollektívan dolgozni nemzetközi síkon és talán legnehezebb kollektívan dolgozni egy intézményen belül. Ennek talán szubjektív okai vannak.

A másik gondolat a molekuláris biológiai komplex bizottsággal kapcsolatosan általában a bizottságok munkájáról merül fel bennem. Az elnökségi beszámolóban is említette tegnap Erdey-Grúz főtitkár elvtárs, hogy egy komplex bizottság, amely egy konkrét kutatási feladat keretében folyó munkát koordinál, sokkal nagyobb hatékonyságú, mint általában egy olyan bizottság, amely pl. a botanika, a zoológia vagy a genetika problémáját öleli fel. Ugyanez vonatkozik az osztályvezetőség értékelése szerint a molekuláris biológiai komplex bizottságra is.

Ezzel kapcsolatban azt vetem fel, hogy nem lenne-e jobb a bizottságok úgyis aktuális átszervezése keretében — megszüntetve a jelenlegi bizottsági formákat — konkrét kutatási problematikák köré csoportosítani a bizottságokat. Kiindulási alapként nagyon hasznos lenne figyelembe venni a szegedi intézet fejlesztési tervében kidolgozandó témákat. Ez tematikailag érdemi előkészítését is jelentené a szegedi intézetben meginduló tudományos kutatómunkának. Ezenkívül figyelembe lehetne venni a Nemzetközi Biológiai Program célkitűzéseit, illetve hazai tematikáját. Így az élettani és rendszertani kutatások legfontosabb problémái egyaránt képviselve lennének ezekben az általam elképzelt témabizottságokban.

A jelenlegi bizottsági rendszernek van azonban egy olyan vetülete is, amelyet az ilyen típusú bizottság talán nem tudna ellátni; tudományterületek vonatkozásában átfogó javaslattétel az osztályvezetőségek, az osztályok felé. Ezt a problémát talán úgy lehetne megoldani, hogy egy kisebb létszámú, könnyen mozgatható tanácsadó testületet alakítanának az Osztályok az egyes szakterülethez tartozó néhány akadémikusból és még néhány szakemberből. E tanácsadó testületet az osztályvezetőség és az Osztály indokolt esetben segítségül venne.

Második megjegyzésem inkább kritikai jellegű az osztálybeszámolóval kapcsolatban. A beszámoló azt írja, hogy „az Osztályhoz tartozó tudományterületeken elért eredményekről" ad tájékoztatást, s ezután következnek a különböző munkahelyeken folyó tudományos kutatómunka utóbbi három évben elért legfontosabb eredményei. Ismerve a néhány évvel ezelőtt történt koncentrációt, úgy gondolom, hogy az idézett kitételnek az ezután következő eredményfelsorolás nem tud eleget tenni. Csak egyetlenegy számadatra hivatkozom. Korábban 65 volt a Biológiai Osztály által támogatott különböző intézmények száma, most pedig a beszámoló 24-et említ, tehát még akkor is, ha volumenben és értékben a legfontosabb kutatásokat támogatja a Biológiai Osztály, az Osztály által támogatott kutatóhelyeken kívül feltétlenül vannak még szép számban olyan intézmények, ahol említésre méltó kutatómunka folyik.

Ez a gondolat akkor merült fel bennem, amikor a meghívó megkapása után Szegeden a biológusok általában sérelmezték, hogy a szegedi egyetem biológiai intézetei nem szerepelnek a Biológiai Osztály beszámolójában. Lehet, hogy bizonyos szegedi lokálpatriotizmus volt részemről, hogy ezt a kérdést felvetettem, de azt hiszem, hogy ezen túlmenően van benne valami igazság.

A harmadik kérdés, amelyhez hozzá szeretnék szólni a következő. Nagyon jó munkamódszernek tűnik számomra az, amely az Osztályvezetőség és az Osztály hatásköre vonatkozásában kialakult a gyakorlatban az elmúlt évek során. Itt elsősorban azt szeretném kiemelni, hogy az Osztály mint testület igyekszik perspektivikus feladatai kidolgozásában közreműködni, tehát az egész Osztály tevékenysége, minden akadémikus tevékenysége benne van ebben a munkában.

A negyedik probléma, amely hozzám, mint egyetemi oktatóhoz közel áll, a szakbiológusképzés ügye. A beszámoló ezzel kapcsolatban azt állapítja meg, hogy Budapesten, de még inkább Szegeden a biológusképzés feltételei jelenleg nagyon hiányosak. Ez feltétlenül igaz, s én azt hiszem, örvendetes hogy az osztálybeszámoló ilyen határozottan rámutat azokra a hiányosságokra, amelyek a korszerű biológusképzés tekintetében egyetemeinken fennállnak. A szegedi egyetemen most van folyamatban egy általános és részletekbe menő felmérés a biológiai oktatás, és a kutatás feltételeiről. Úgy gondolom, helyes lenne, ha ezt az anyagot — elkészülte után — a szegedi egyetem eljuttatná a Biológiai Osztálynak, annál is inkább, mert ez kapcsolatos szegedi vonatkozásban a biológusképzés személyi és tárgyi problémáival. Egyelőre csak annyit, hogy jó lenne az Osztály erkölcsi támogatása ez ügyben a Művelődésügyi Minisztérium felé.

Egy másik kérdés a szakképzéssel kapcsolatosan, amelyről nagyon sok szó esik — talán nem árt, ha eggyel több — a szegedi akadémiai biológiai intézetek mielőbbi létrehozása. Mint egyetemi oktató állítom, hogy a korszerű egyetemi oktatásnak alapfeltétele a szegedi biológiai kutatóintézet mielőbbi működése; gondolok elsősorban a szaklaboratóriumokra és a speciálkollégiumokra. Ez a kérdés azért is aktuális, mert olcsóbb — elnézést a kifejezésért —, rentábilisabb az egyetemi oktatás, ha a kutatók is leadnak bizonyos minimális órát. Nem akarok azokról az előnyökről beszélni, amelyeket az egyetem nyújthat az akadémiai intézetnek. Nyilván ilyen is van, de talán helyesebb, ha maga az akadémiai intézet fogja ezt majd értékelni.

Ötödik kérdésként csak helyesléssel tudok reagálni arra a komoly törekvésre, amely a Biológiai Osztály részéről a kutatók szakmai továbbképzése vonatkozásában az utóbbi években megvalósult. Gondolok elsősorban a tihanyi intézetben tartott különböző szakmai kollokviumokra és a Láng István szaktitkár által kezdeményezett nyelvtanulásra, amely tudásom szerint a közeljövőben — remélhetőleg komoly eredménnyel — befejeződik. Kár, hogy nem 15 évvel ezelőtt kezdődött ez el; akkor magam is hasznát vehettem volna ennek a komoly, értékes kezdeményezésnek. Ugyancsak nagyon jó gondolat — bizonyára meg is fog valósulni —, hogy a Marxizmus-Leninizmus Esti Egyetemen a kétéves szakosított filozófiai tagozaton belül ez év szeptemberétől kezdve speciális programmal egy biológus osztály indul. A magam részéről úgy gondolom, hogy világnézeti vonatkozásban a szakmai ideológiai problémák minél alaposabb megvitatása biológus kutatóink számára rendkívül fontos. Az elképzelés realizálása bizonyára biztosítani fogja a magas szintű szakmai ideológiai továbbképzést.

Ezzel a néhány példával azt szerettem volna érzékeltetni, hogy az Osztály részéről nagyon sok helyes kezdeményezés történt az utóbbi időben, s így bizalommal nézhetünk az Osztály további tevékenysége elé.

Még egy egészen apró megjegyzést szeretnék tenni, az úgynevezett melléklettel kapcsolatosan. Talán helyes lett volna, ha az együttműködési témák között a KGST-együttműködés is szerepelt volna.

Földes József: Mélyen tisztelt Osztálygyűlés! Straub professzor úr megnyitójában utalt a határterületekre. Engedjék meg, hogy ehhez a kérdéshez, illetve az itt elhangzottakhoz néhány gondolatot fűzzek.

A Biológiai Tudományok Osztályának az elnöki asztalnál ülő reprezentánsai orvosok, magam is orvosi egyetemen dolgozom, témánk azonban az általános biológia körén belül van. Mindezzel arra szeretnék utalni, hogy a határok mennyire elmosódottak, a határterületek mennyire kiterjedtek, amelyből számos következtetés vonható le. Többek között levonható véleményünk szerint — Szegedről beszélek — az a következtetés, hogy a tudomány, a tudományos kutatás mennyire egységes és oszthatatlan. Ugyanígy egységesek és oszthatatlanok azok az általános módszertani elvek, melyek a modern, rohamosan fejlődő kutatással kapcsolatosan megfogalmazhatók: az anyagi és szellemi erők koncentrálása minden egyes szakterületen. Ezek azok az elvek, amelyeknek megvalósítására irányuló törekvés a Biológiai Osztály munkájában erőteljesen érvényesült és amely más területen még hiányzik.

Kezdjük talán elsősorban felsőbb szinten. Úgy néz ki a dolog, hogy nálunk még nem alakult ki az a helyzet, az a törekvés, amely manapság már a legtöbb európai államban érvényesül. Ezen országokban a tudomány szervezése, a kutatás irányítása erősen centralizált irányban halad. E cél érdekében hozták létre (legutóbb Romániában) az ún. kutatási minisztériumot. Nálunk ilyesmi még hiányzik, sőt az Akadémia mint a kutatás legfőbb gazdája, és a különböző szakminisztériumok együttműködésének is csak halvány jelei mutatkoznak.

Ez a gondolat az, ami éppen az Orvosi Osztály nagygyűlésén nagyjából határozott formában megfogalmazható volt és ez az, ami aktuálissá teszi a Biológiai Osztály és az Orvosi Osztály kapcsolatának kérdését is, mert a határok e vonatkozásban is elmosódottak. Úgy hiszem, hogy az Akadémia elnöksége koordinálhatná azokat az elképzeléseket, amelyeket Straub professzor beszámolója a 3. fejezetben megfogalmazott és amelyek elsősorban a szervezeti formákra vonatkoznak. Gondolok mindenekelőtt arra, hogy a bizottságok a szakma operatív vezető testületévé váljanak. Úgy hiszem, ezt minden próbálkozás, kísérletezés nélkül átvehetné bármelyik másik osztály, pl. az Orvosi Osztály is, hiszen ezen a téren a Biológiai Osztállyal kapcsolatban már jó tapasztalataink vannak. Hasonló módon érvényesíthetők az elvek az osztályok, illetve a bizottságok tagjainak megválasztásával kapcsolatban is. Erre vonatkozóan három elvet fogalmaz meg a jelentés. Úgy véljük, ez a három elv teljes egészében elfogadhatónak látszik valamennyi más osztály számára anélkül, hogy különösebb vitára okot adhatnának és érvényesítésükkel kapcsolatban különösebb kizáró okok merülhetnének fel.

Talán még egy gondolatot fűznék az előbb felsorolt alapelvekhez, mégpedig azt, hogy a kapcsolatok kiépítése nemcsak az egyes osztályok között látszik célszerűnek, hanem nagyon fontos és hasznos lenne kutatás-szervezési és tudománypolitikai szempontból az is, ha az Akadémia, illetve az Akadémia

egyes osztályai közvetlenül felvennék a kapcsolatokat az egyetemekkel. Erre vonatkozóan történtek már próbálkozások. Úgy emlékszem, 1957-ben vagy 1958-ban történt utoljára, hogy az Akadémia valamelyik osztálya egyetemünktől személyi javaslatot, véleményt kért arra vonatkozóan, hogy egyes bizottságokba kiket jelöl az egyetem. Ez azóta nem ismétlődött meg. Feltehető, hogy a bizottságok azóta változatlanok. És ez sem egészséges. Az ad personam szóló meghívások, illetve jelölések esetében, amelyek az elmúlt évtizedek gyakorlatából adódnak, a bizottsági tag az egyetemet formálisan nem képviseli, csak saját intézetét, vagy szűkebb szakmáját. Szükségesnek látszana viszont ha az Akadémia bizottságai útján — engedjék meg, hogy általánosítsak és necsak a Biológiai Bizottságokra gondoljak — az egyetemmel ilyen formában is tartanák a kapcsolatot és a bizottsági tagok egyidejűleg az egyetemek hivatalos képviselőjeként is vennének részt egyes bizottságok munkájában. Ez a formális kapcsolat nagyon hasznos, termékeny lehet nemcsak az egyes bizottságok munkájában, hanem általában a tudományszervezés hatékonysága szempontjából is. E gondolatot is indokolnám az alábbiakkal.

Nem tudom, helyes-e az a statisztikai adat, melyet a közel múltban bocsátottak a rendelkezésemre, amely szerint a kutatásoknak 80%-a az egyetemen folyik, 20%-a pedig specializált intézetekben, akadémiai kutatóintézetben történik. Ha ez igaz, akkor ebből adódik az a tény, hogy a kutatók 80%-a is egyetemi státuszban van, és az a körülmény is, hogy az új generáció nagyrésze közvetlenül az egyetemről kerül ki. Ha tehát az akadémiai kutatások akadémiai, magasabb szinten folynak is, az utánpótlás mégis csak az egyetemekről adódik. Mindez, de más tényezők is, amelyek felsorolása hosszú volna, indokoltá teszik az Akadémia és az egyetemek közötti szorosabb „hivatalos" kapcsolatot.

Ezeket a javaslatokat bátorkodtam itt szóvá tenni. Úgy hiszem, sok egyéb gondolatot is el lehetne mondani olyan formában, hogy abból egészséges javaslatok szülessenek, a magyar tudományos élet gyorsabb fejlődését szolgálja. De erről majd más alkalommal.

Straub Brunó osztálytitkár: Tisztelt Osztályülés! Az elhangzottakat hallgatva, először is örömömnek szeretnék kifejezést adni azért, hogy egy kicsit magam is elébe mentem az elhangzott kritikáknak, amikor kifejeztem azt a véleményemet, hogy következő munkánkban nagyobb gondot kell fordítanunk a kapcsolatok kiművelésére és hogy a magunkba zárkózástól most már egy kicsit elszakadva igyekezzünk jobb kapcsolatokat létesíteni a biológia területén működő, de más főhatósághoz tartozó intézményekkel is.

Egyetértek azokkal a bírálókkal, akik azt kifogásolják, hogy az osztályvezetőség beszámolója a bevezetésben azzal az igénnyel lép fel, hogy a biológia helyzetét vázolja, s ezek után csak az Akadémia által támogatott intézetek, tanszékek munkájával foglalkozik, a másutt folyó munkákról pedig hallgat.

Az Akadémia feladata nyilvánvalóan az, hogy az alapkutatás területén általános irányítást gyakoroljon, tehát amikor a biológia helyzetét áttekintjük, akkor ebbe az áttekintésbe helyes bevonni az Akadémia saját intézményei mellett azokat az intézményeket is, amelyek nem közvetlenül hozzá tartoznak, de amelyekért elvileg mégis felelősséget viselünk.

A két kategória között természetesen különbséget kell tenni. Az Akadémiának nyilvánvalóan sokkal hatékonyabban kell részleteiben is azokat a kutatásokat irányítania, amelyek a saját intézeteiben folynak mint azokat, ame-

lyek más főhatóságokhoz tartozó intézetekben történnek, de az általános képnek a megalkotásában, igenis, róluk is tudomást kell venni, az általános tennivalók leszögezésében róluk is meg kell emlékezni. Ennyiben teljesen egyetértek azzal, amit Várterész elvtárs a sugárbiológiáról mondott, s amit végeredményben Horváth Imre is kifogásolt a szegedi természettudományi kar biológiai intézete részéről, akik hasonló helyzetben vannak, mert a támogatás szempontjából nem hozzánk tartoznak, de mint biológusok hozzánk tartozónak érzik magukat.

Azt hiszem azért, hogy a helyzet nem annyira rossz, mint ahogy a kritikákból kitűnik, hiszen Várterész elvtárs is említette, hogy intézetének néhány munkatársa nemcsak akadémiai minősítéssel rendelkezik, hanem tagja a Biofizikai Bizottságnak, s a Biokémiai Társaság különböző szekcióülésein messzemenően részt vesznek a közös munkában, tehát a kapcsolatok kutatói szinten megvannak. Az írásbeli anyagból azonban ez a kapcsolat valóban hiányzott.

A hozzászólók bizonyos szervezeti kérdéseket is felvetettek. Egyrészt Földes elvtárs, másrészt Kaszab elvtárs úgy gondolják, hogy a bizottságok személyi felújításhoz nem lehet mereven ragaszkodni. Azt hiszem, hogy ha egy bizottságról kiderül, hogy fiatal, tetterős emberekből áll, akkor nyilvánvalóan nem kell három évenként pontosan 30 százalékot leváltani, de egy bizottság harmadrészben való megújítása három évenként általánosságban mégis hasznos.

Azt hiszem, hogy az elmúlt időkben inkább az ellenkezője volt a probléma, hiszen azért próbáltuk ezt az elvet hangsúlyozni, mert bizottságaink elkényelmesedtek azzal, hogy azonos összetételben hosszú időn keresztül egymás között vitatkoztak.

Ami a bizottsági titkárok hároméves funkcióját illeti, azt hiszem, a bizottsági titkárok nagy többsége egyetért azzal, hogy a hároméves ciklus jó dolog. Három év alatt megmutathatják, hogy mire képesek, de azért jó, ha három év után más valaki veszi át a munkát. Az a tapasztalatunk, hogy a tudományszervezés szempontjából nagyon jó iskola az, ha valaki három évig bizottsági titkár, de nem jó túlságosan hosszú ideig. Ismételten hangsúlyozom, hogy ezek nem törvények, tehát hellyel-közzel nyilvánvalóan át lehet lépni egyikmásik ilyen meghatározást.

Horváth Imre azt gondolja, hogy a konkrét feladatok vitelére alkotott bizottságok életképesebbek, mint az általános szakmai bizottságok. Én azt hiszem, hogy ebben lényegileg igaza van. Attól tartok azonban, hogy az egész területet átfogó szakmai bizottságok megszüntetése mégsem lehet helyes, hiszen nagyon sokszor adódnak olyan feladatok, amelyeknél éppen azt kell megnézni, hogy pl. a zoológia egészét vagy a botanika egészét nézve mi a helyzet, mit kell csinálni. Ha mi csak az általunk vitt kutatásokra alakítanánk témabizottságokat, akkor, azt hiszem, többször elfeledkeznénk egy-egy területről, mint pl. a parazitológiáról, mint ahogy az a múltban előfordult.

Az egyes témabizottságoknak esetről esetre elért nagy sikerei nem indokolják azt, hogy az általános tudományos bizottságokat megszüntessük. Azt gondolom, hogy ezek az általános bizottságok nagyon jól elláthatják a konkrét témavezetés feladatát is, elsajátíthatják a témabizottságokban észlelt jó munkát.

A mostani ülés elején mondott bevezető szavaimban hangsúlyoztam annak fontosságát, amit Földes elvtárs ismételten aláhúzott, hogy a biológiai

kutatásnak az orvosi, az Egészségügyi Minisztériumhoz tartozó kutatóhelyekkel — de ez vonatkozik az agrár- és más vonalra is — való kapcsolatait a jövőben is a fókuszba kell állítani, és ezen a területen sokkal többet kell tennünk, mint a múltban.

Nem tudom, helyes lenne-e az, hogy az egyetemek képviselőket delegáljanak a bizottságainkba, hiszen egy itteni bizottság végeredményben az Akadémia bizottsága és nem az egyetemek által delegált bizottság, s az Akadémia feladatát látják el. Nyilvánvalóan nagyon gondosan kell azonban ügyelnünk arra, hogy bizottságaink a különböző intézményeket, a különböző területeket — s ebben benne van az, hogy a különböző egyetemeket is — megfelelően képviseljék. Ha például a botanikai bizottságban a szegedi egyetem egyik dolgozója is részt vesz, az nyilvánvalóan a szegedi egyetem képviselőjének is fogja magát érezni, de nem hiszem, hogy ehhez hivatalos megbízást kellene neki adni. Ugyanakkor egyetértek azzal, hogy az egyetem vezetőségével az akadémiai munkában való résztvétel kérdéseit időnként meg kell beszélni, anélkül azonban, hogy az egyetem hivatalos képviseletét bevezetnénk. Nekem az az érzésem, hogy a gyakorlatban azért a munka mégiscsak úgy folyik, hogy a különböző egyetemek képviselői igenis ott ülnek és úgy érzik, hogy egyúttal az egyetem érdekét is képviselik, és ez így helyes is.

Befejezésül még egyet szeretnék mondani. Kaszab elvtárs azzal kezdte hozzászólását, hogy ha a zoológia helyzetét nézzük, akkor azt gondolhatjuk, hogy ott minden rendben van, mert hiszen jelenleg sikereket mutat fel. Azt hiszem, hogy a tudományszervezés szempontjából onnan kell kiindulni, hogy ha valamely munkaterületen a dolgok jelenleg jól mennek, ez annyit jelent, hogy a szervezés jó volt és nem okvetlenül azt, hogy most jó, mert hiszen a tudományszervezés hatása mindig egy bizonyos idő után mutatkozik meg. A helyes tudományszervezés idejében megteszi a szükséges intézkedéseket, hogy ne kelljen egyszer azt mondani, hogy ami most van, az nagyon rossz, mert ha azt mondják, hogy nagyon rossz, ez azt jelenti, hogy rossz volt a szervezés. Ebből a szempontból egyetértek a parazitológia felvetésével; ezt az anyag is tartalmazza, s én magam is említettem: a Biológiai Osztály következő feladata az, hogy megnézze, még milyen területeken milyen mélységű és milyen szélességű intézkedéseket kell tenni. Köszönöm szépen és kérem a további hozzászólásokat.

B o r h i d i Attila: Tisztelt Elnökség! Tisztelt Osztályülés! A magam részéről az osztályvezetőségi beszámolónak a kutatók továbbképzésével kapcsolatos részéhez szeretnék hozzászólni, miután magam is résztvevője voltam a Osztály által szervezett matematikai kurzusnak, és személyesen tapasztaltam, hogy az Osztály vezetősége milyen jelentős erőfeszítéseket és komoly anyagi áldozatokat hozott a kutatók továbbképzése érdekében. Ezúton szeretném a botanikus kutatók nevében megköszönni az Osztálynak ezt a fáradságát, s egyben kifejezni azt a reményemet, hogy ezek a lehetőségek a jövőben is rendelkezésünkre fognak állni.

A matematikai kurzus rendkívül hasznosnak bizonyult, de hatvan órai terjedelmével csak a bevezető lehetett egy magasabb szintű tanfolyamhoz. A folytatás igénye már a tanfolyam végén felmerült, s a folyamatosság kedvéért nagyon hasznos lenne, ha még ebben az évben sor kerülhetne rá. Hogy milyen témák kerüljenek tárgyalásra az új kurzusban, azt az előadókkal már az utolsó órán nagy vonalakban megbeszéltük.

A TIT-nyelvtanfolyamok szintén hasznosak voltak, de megítélésem szerint, az alacsony heti óraszám miatt nem hozták meg a várt eredményt. Meggyőződésem és részben tapasztalatom is, hogy egy nyelv elsajátítására egy rövidebb, de nagyon intenzív kurzus sokkal alkalmasabb a szokványos tanfolyamoknál. Ezt tapasztaltuk akkor, amikor a TIT-kurzuson a heti óraszámot emeltük, illetve sűrítettük az órákat. Igen szerencsésnek tartom a Láng István szaktitkár által kezdeményezett kísérleti orosz nyelvtanfolyam megszervezését, amelyen a résztvevő fiatal kutatók igen jó eredményt értek el.

Nagyon kívánatosnak tartanám, ha az Osztály ősztől kezdve ennek mintájára esetleg más nyelvből is rendezne hasonló intenzív jellegű tanfolyamot, amelyen nemcsak az egészen fiatal kutatók, hanem például a magamfajta, kicsit öregebbek is részt vehetnének.

A szakmai továbbképzéssel kapcsolatban Straub akadémikus említette a belföldi ösztöndíjak kihasználatlanságát, amelyet főleg anyagi okok magyaráznak. Ma, amikor egyre több biológus kutató tér vissza hosszabb, féléves-egyéves külföldi tanulmányútról, tapasztalatokban, látókörben és főleg metodikai készségben gyarapodva, a belföldi tanulmányutak jelentősége is egyre fokozódik. Nem tudom, hogy az anyagi érdekeltség kérdését hogyan lehetne megoldani, talán az illető téma hitelkeretére történő kiküldetéssel.

Végül egy problémát említek meg, amely Máthé és Zólyomi akadémikusoknak az első hazai phytomassza-vizsgálatokkal kapcsolatban elhangzott előadása és az azt követő vita kapcsán merült fel bennem. 1950-ben rendezett a Biológiai Osztály egy vegetációtérképezési szimpoziumot, amelynek anyaga a kezdő vegetációkutatónak ma is mindennapi kenyere, s amelynek nyomán értékes monográfiák egész sora látott napvilágot. Hogy ezek a munkák létrejöttek, főképp annak a kollektív munkaszellemnek köszönhető, amelyre Straub akadémikus a beszámolóban is utalt, és éppen ezekből az eredményekből kiindulva most már meg kell kezdődnie — részben meg is kezdődött — egy belterjesebb jellegű, ökológiai, oknyomozó geobotanikai és produkciós biológiai profilú munkának, amely egyben része lesz a Nemzetközi Biológiai Programnak is. Azt gondolom, helyes lenne, ha ebben a Nemzetközi Biológiai Programban a magyar botanika — eddig elért nemzetközi rangjához méltóan — olyan szervezettséggel és aktivitással venne részt, mint annak idején a térképezésben, s az ilyen irányú kutatások kiszélesednének, és módszertanilag egységesebb formában történnének. Ennek megteremtése érdekében úgy gondolom, nagyon időszerű lenne egy újabb, kifejezetten módszertani profilú szimpózium megrendezése.

Szalai István: Mélyen tisztelt Elnök Úr! Tisztelt Osztályülés. Általában senki sem szeret első hozzászóló lenni. Én is kértem, hogy lehetőleg ne az elsők között legyek. Kérésem teljesült, hálásan köszönöm. A későbbi hozzászólásnak — mint jelen esetben is — hátránya, hogy Várterész Vilmos és Horváth Imre néhány gondolat kivételével kifejtették mindazt, amit én elmondani szándékoztam; előnye viszont annak konstatálása, hogy amit én elgondoltam, azt mások is helyesnek látják.

A titkári beszámoló nagyon jól tükrözi az Akadémia Biológiai Osztályának hároméves munkáját. Elolvasása után az az ember meggyőződése, hogy a vezetés, az irányítás jó kezekben van, a következő lépések kidolgozása iránymutató és helyes. Mégis felmerül egy-két probléma; ezeket szeretném röviden megemlíteni.

Az első oldalon — amint már mások is kiemelték — az Osztályhoz tartozó tudományterületeken elért eredmények ismertetését olvashatjuk. Ennek alapján úgy érezzük magunkat Szegeden — és gondolom, a debreceni biológiai intézetek dolgozói is —, hogy mi nem is létezünk a magyar tudományos élet számára.

Magyarországon — mint jelenleg — reméljük a jövőben is, a Magyar Tudományos Akadémia a tudományos élet legfőbb fóruma marad. Ha itt valakinek a munkáját nem veszik észre, nem ismerik el és egy ilyen fontos jelentésben — mint az osztálytitkári beszámoló — nem szerepel, az gyakorlatilag el van „temetve". A Művelődésügyi Minisztérium ezekben a problémákban csak kisebb segítséget tud adni. Bár a támogatott tanszékek évenként elküldik jelentéseiket a minisztériumon keresztül az Akadémiának, az akadémiai szakbizottságok meg is vitatják azokat, ennek azonban nincs nyoma az osztálytitkári beszámolóban. A magam részéről tisztelettel javasolom — ha lehetséges —, valamilyen formában pl. függelékként szerepeljenek a jelentésben azoknak az intézményeknek az eredményei is, amelyeknek nincs akadémiai célhitel támogatásuk. Egyébként ha jól emlékszem, három évvel ezelőtt ugyanerről a helyről tettem egy javaslatot, s ezt most megismétlem. Azt a pénzösszeget, amelyet a TKFA támogatásban részesülő intézetek kapnak, kapja meg az Akadémia, és az Akadémia utalja ki. Ezzel megszűnne a kétféle támogatásból származó megkülönböztetés.

A második kérdés: A beszámoló általános részében ez áll: „meg kell kezdenünk annak a koncepciónak a kidolgozását, amelynek alapján a tíz év múlva esedékes fejlesztés, a súlypontozás megvalósítható lesz" és így tovább. Megmondom őszintén, hogy egy kicsit már félünk az ilyen szavaktól, mint a súlypontozás. Nem kétséges, hogy a pillanatnyilag kitűzhető céloknak megfelelően bizonyos témáknak több támogatást kell adni, mint másoknak. Ez helyes gazdaságossági szempontból is, hiszen nem lehet minden kutatási témát egyenlő mértékben támogatni. De van ennek a kérdésnek egy másik oldala is. Nevezetesen, ha az egyik téma nagyobb támogatást kap, mint a másik, akkor bizonyos polarizáció alakul ki az egyes intézmények között. Ha az egyik téma nagyobb célhitelt kap, ott jobbak lesznek a kutatási feltételek, nagyobb eredmények születnek. Ezzel függ össze, hogy a külföldi utakat, tapasztalatcsere-utazásokat is ezek az intézmények, illetve kiemelt témák dolgozói kapják. Ezek a kis előnyök halmozódnak, további polarizációk lépnek fel, s 5—6 év múlva azon vesszük észre magunkat, hogy a kutatók két csoportra szakadnak. Sajnos, ez olyan emberi sajátosság, mellyel számolni kell.

Tessék megengedni, hogy csak úgy név nélkül egy tapasztalatról számoljak be. A közelmúltban, a debreceni Országos Diákkonferencia egyik biológiai szekció ülésén elnökölve, de más szekciók előadásait is meghallgatva, nagyon feltűnő volt, hogy egyes kiemelt kutatási témán dolgozó fiatalemberek milyen lekezelő módon bírálták az egyetemi hallgatókat és dolgozataikat. Úgy látszik, hogy a kiemelés, a minden oldalról való támogatás és elismerés kedvez a nem előnyös emberi tulajdonságok kifejlődésének is, és ez nagyon veszélyes. A célhitel kétféle formájának megszüntetése tehát ezen a problémán — megítélésem szerint — sokat segítene.

A harmadik probléma a bizottságok munkájának kérdése. Meglepő volt Horváth Imre javaslata; és megfontolandónak tartom. Mint a Botanikai Bizottság tagja már évek óta azt tapasztalom, hogy a bizottság a botanikának eléggé heterogén területét fogja össze, és ennek következtében, hol a

tagság egyik fele ül passzívan és hallgat, hol a másik fele. Ha az az út, amelyet Horváth Imre javasolt, nem is valósulhat meg — hiszen a titkár úr bizonyos értelemben ellenkező véleményt hangoztatott —, akkor a jelenlegi bizottságok egy részének fenntartása mellett össze lehetne hozni a fiziológusokat és a biokémikusokat, esetleg a biofizikusokat, valamilyen albizottságban egyesíteni, beleértve a hasonló témakörökben alapkutatást végző orvosi intézeteket is. A jelenlegi megoldás nem a legjobb.

Negyedik problémaként a titkári beszámolóból a biológusszakképzés kérdését ragadom ki és néhány szót ehhez is hozzáfűznék.

Amikor Szegeden a szakbiológusképzés megindítását javasoltuk, akkor olyan tervek birtokában voltunk, amelyek szerint 1968-ban, de legkésőbb 1969-ben megteremtik a biológiai oktatás tárgyi feltételeit. Időközben a tervek megváltoztak. Jelenleg az a helyzet, hogy a biológusképzés igényeinek korszerű létesítményekkel való kielégítése csak a következő ötéves tervben s annak is csak a második részében, tehát gyakorlatilag 1974-ben, 1975-ben várható. Amikor a szegedi Tudományegyetem biológusai nyilatkoztak a szakképzés beindítása kérdésében, akkor előfeltételként szabták meg, hogy a jelenlegi helyzeten valamit javítani kell. Igaza van Straub akadémikusnak, amikor azt mondja beszámolójában, hogy a biológusoknak vállalniok kell a kezdeti nehézségeket. Mi vállaljuk is, azonban itt többről van szó, mint a kezdeti nehézségek vállalásáról, mert pl. a Növényélettani és Mikrobiológiai tanszék 6 oktatójának a jövő évtől kezdve — a tanárképzést is figyelembevéve — hetenként 102 órában kell előadni. Ez azt jelenti, hogy 17 óra jut egy-egy oktatóra. Ki tud ezzel a feladattal megbirkózni? A tudományos munka is érdekel bennünket, abban is szeretnénk elmélyedni és előrehaladni. Káderfejlesztési tervünk azonban semmi biztatást sem ad e pillanatban. Jelenleg 0,4 fő laboráns jut egy oktatóra, illetve kutatóra. Ez rendkívül kevés. Az akadémiai intézeteknél sem kielégítő a helyzet, pedig ott 1,7 az ellátottság, tehát több mint négyszerese az egyeteminek. A titkári beszámoló leszögezi, hogy ebben a kérdésben kérni kell a Művelődésügyi Minisztérium segítségét. Én ezt a megállapítást nagyon aláhúznám azzal, hogy ezt a segítséget nagyon gyorsan kérjük, mert már a 24-ik órában vagyunk.

Végül még egy kérdést említenék meg — bár a titkári beszámolóban nem szerepelt —, ez pedig a külföldi utak kérdése. A TKFA célhitelekkel támogatott intézetek e területen hátrányosabb helyzetben vannak, mint az akadémiai célhitellel támogatottak, sokkal kisebbek a lehetőségeik. Bár azt látja az ember, aki fáradtságot nem sajnálva a dolognak nagyon utánajár, az eljuthat külföldre, de mégsem olyan gyakran, amint az kívánatos lenne. Emellett még van egy másik probléma is, amely a saját korosztályomat érinti — annak a polgárjogot nyert elvnek az alkalmazása — hogy hosszabb (1 éves) tanulmányútra elsősorban csak fiatalokat küldenek ki. Amikor mi fiatalok voltunk, 1938-tól 1945-ig a katonakötelezettség és a háború miatt nem mehettünk ki, 1957-ig pedig nem lehetett kijutni, 1957 után pedig eljutottunk abba a korba, amikor már mi öregeknek számítottunk. Azt hiszem, hogy ezen a merev állásponton lazítani lehetne. Egyrészt egy 50 éves ember is még (közel 20 évig) nagyon sokat hasznosíthat abból a tapasztalatból, amelyet külföldön szerez, másrészt arra sincs garancia, hogy ha valaki 30 éves korában jár külföldön, az 20 évnél minden esetben tovább fog dolgozni. Biológusok vagyunk, ne gondolkozzunk egészen naptári években, mert ez ma már túlhaladott szemlélet.

Á d á m György: Tisztelt Elnök Úr! Tisztelt Osztályülés! Az osztályvezetőség beszámolójának két kérdéscsoportjához szeretnék hozzászólni: a biológusok tudományos képzésének kérdéséhez és az osztály tudomány-szervezési problémáihoz.

Mint az egyetemi szakbiológus-képzésben résztvevő oktató, engedjék meg, hogy először erről a problémáról szóljak. A beszámoló joggal említi ezen új képzési forma anyagi és személyi hiányosságait. Bízunk benne, hogy főhatóságunk gondoskodása túljuttat bennünket e kezdeti nehézségeken. A magam részéről úgy vélem, hogy a következő néhány „kísérleti" évben a materiális feltételek javulásán kívül a képzési követelmények is jobban tisztázódnak majd. Igaz, az Osztály javaslatára kialakultak azok a páros profilok, melyek a specializációnak irányt szabnak. A korlátozott lehetőségű elhelyezkedés figyelembevételével a dupla profil helyesnek látszik, bár kétségtelen az is, hogy az évek haladtával az idő ezt a kettős képzési formát túl fogja lépni. Kezdetnek most mindenesetre ez a profilírozás látszik célszerűnek. Javasolni szeretném viszont, hogy a speciális képzésért felelős tanszékek lehetőleg minél korábban tudják meg a biológus jelöltek jövendő munkahelyét és munkakörét. A biológiai tudományok mai, szinte áttekinthetetlen metodikai arzenálja mellett szinte lehetetlen univerzális gyakorlati képzést nyújtani. Ha a jövendő munkahellyel a tanszék már a hallgatók negyedik tanulmányi évében kapcsolatot létesít, a képzés ennek csak hasznát láthatja. Miután az Akadémia kutatóhelyein sok biológusunk nyer majd elhelyezést, úgy gondolom, nem szükségtelen ezt a problémát itt felvetni.

Az Egyetemen sokan úgy vélik — én magam nem osztom ezt a véleményt —, hogy a most meginduló szakképzés nem lesz előnyösebb, mint egy esetleges egyszakos biológus-tanárképzés. Ezt a kérdést csak néhány kísérleti év után lehet majd átgondoltan eldönteni. Egy dolog bizonyos: a hazánkban folyó kétszakos tanárképzés mindenképpen kompromisszum jellegű. A tudományok mai állása nem teszi lehetővé, hogy korszerű, magas színvonalon olyan két tudomány-komplexumból, mint a kémia és biológia, megfelelő képzést lehessen nyújtani. Nem vitás, hogy hazánk káderszükséglete és gazdasági lehetősége a kétszakos képzést részesíti előnyben, de az sem kétséges, hogy a jövőben a tudományos fejlődés ki fogja kényszeríteni az egyszakos tanárképzés problémájának felvetését. Kérdés, hogy e jövőbeni periódusban nem lesz-e célszerű az egyszakos biológus tanár- és szakbiológus-képzést nagyrészt homogenizálni.

Mind a szakbiológus-képzés, mind pedig a tanár-képzés, de joggal mondhatjuk, hogy egész társadalmunk természettudományos műveltségének egyik vissza-visszatérő problémája az általános és középfokú iskolák biológia oktatása. Témaként az akadémiai nagygyűléseken is mindig felmerül és joggal: végeredményben az egyetemi tanszékeket és a biológiai kutatóhelyeket terheli az az elmaradás és hiányos felkészültség, amit a középiskolákból hozzánk kerülő fiatalok magukkal cipelnek.

Az általános iskolai és középiskolai biológiai oktatásban az utóbbi 15 esztendőben nagyon sokat léptünk előre. Mondhatnám azt is, hogy az általános iskolai biológiai oktatás csaknem megközelíti azt a volument és szintet, amit iskoláink mai színvonala és a többi tantárgyakkal való koordináció kibír.

Annál nagyobb hiányosságokat látunk a középiskolai biológiai oktatásban. Igaz ugyan, hogy a középfokú oktatás feladata annyi és olyan biológiai ismeret nyújtása, amennyit és amilyet az általános műveltség megkíván,

de nagyon nehéz eldönteni, hogy 1967-ben mi a biológiai műveltség kritériuma. Egy bizonyos: nem kizárólag a növény- és állatcsoportok leírása, szerveik és szervrendszereik ismertetése. Közismert, hogy az utóbbi 7—8 évben hihetetlenül újszerű, gazdag biológiai adattömeg gyűlt össze, melynek nyomán sok alapvető folyamatról vallott nézetünk döntő módon eltér a tíz év előttitől. E mindent elsöprő rohamos fejlődés azt eredményezi, hogy az egyes törvényszerűségek feltárásában a molekuláris, vagy legalább is a celluláris szint meghatározóvá válik. Ez egyaránt vonatkozik a fiziológiai, genetikai és más diszciplinákra.

Mindezek figyelembevételével alaposan megfontolandó a középiskolai tananyag volumene, tartalma és arányai. A most forgalomban levő tankönyvek részben elavultak és bizonyos információim alapján sajnos ezt kell megállapítanom készülő, még meg nem jelent munkáról is. Kétségtelen, hogy középiskolai fokon egy adott szaktudományt teljes részletességgel kifejteni nem lehet és nem kell. Az is bizonyos, hogy didaktikai metodikai kérdésekben, a tanulók életkorával összefüggő pedagógiai problémákban a tankönyvszerkesztésben középiskolás tanároké a döntő szó. De ugyanilyen bizonyossággal mondható, hogy a korszerű középiskolai tankönyv szakmai szempontjainak gondos mérlegelésére az Akadémia segítségével egyetemi köröket is be kell vonni.

Bonyolult, komplex-munka ez, mely a túlzások veszélyét rejti magában, de előbb-utóbb neki kell fogni. Ami eddig történt, az bíztató kezdetnek mondható. Hogy milyen bonyolult kérdésről van szó, arra példa a Science amerikai folyóirat hasábjain az elmúlt hónapokban lezajlott vita a klasszikus, illetve molekuláris biológia középiskolai oktatásáról. Az USA-beli középiskolákban jelenleg legalább háromféle (sárga, zöld és kék színekkel jelölt) biológiai program van kísérleti jelleggel forgalomban. Ezek között a „kék" program teljes egészében molekuláris biológiai alapokon áll. Meg kell mondani őszintén, hogy sokan — teljes joggal — bírálják ezt a kék programot, mely a cikkek szerint teljesen elhanyagolja a tanulók biológiai nevelésében oly hatásos, jól ismert növényi és állati környezeti tényezők tanítását és csakis a saját szemléleti tapasztalatuktól távoleső molekuláris szintre koncentrál.

Meg kell találni tehát a megfelelő arányokat és az adekvát ismeretmennyiséget. Nem tudom, nincs-e itt az ideje, hogy esetleg a *Biológiai Osztály kezdeményezzen egy komplex munkabizottságot*, mely az általános iskolától kezdve egészen az egyetemekig elemezné a biológiai műveltség és képzés korszerű kritériumait. Hiszen, hogy csak egy példát említsek, tudtommal a Művelődésügyi Minisztérium területén számos szerv külön-külön foglalkozik az általános iskolák, középiskolák, a tanárképző főiskolák és a tudományegyetemek biológiai problémáival.

Hozzászólásom harmadik témája a biológusok továbbképzését érinti. Igen fontos kezdeményezések történtek ez irányban. Itt leginkább a Láng István szaktitkár által kezdeményezett „gyorsított" nyelvtanfolyamokat emelném ki.

A vezetőségi beszámoló pozitívan értékelte az ez évben lezajlott kéthetes matematikai tanfolyamot. Mint a tanfolyam egyik szervezője és egyben résztvevője, mondhatom, hogy valóban hasznos volt. A résztvevők többsége a folytatást is igényli. Az osztály keretén belül létrehozott ad hoc bizottság, mely a tanfolyamok kérdésével foglalkozik, a közeljövőben más időszerű témákat is fog javasolni szervezett tanfolyamaink számára.

A beszámoló a szakmai továbbképzés fontos eszközeként tekinti az aspirantúrát. Igen helyes a kutatóhelyek dotációjánál az aspiránsok számát figyelembe venni. E kérdéssel kapcsolatban egy fontos szempontra szeretném felhívni a figyelmet: helyes lenne, ha az Osztály, illetve a TMB, a határterületi aspiránsképzést serkentené. „Fehér hollóként" működik ugyan — tudomásom szerint — két olyan aspiráns, akik elektromérnök létükre biokibernetikai tematikában, biológiai intézményekben dolgoznak, de ösztönzés helyett inkább nehézségekbe ütköznek: a különböző bizottságok nem tudják őket „hova tenni". Az ilyen határterületi aspirantúrát kell elsősorban serkentenünk.

Úgy hiszem, egész biológus közvéleményünk megelégedéssel értékeli az osztályvezetőségnek az elmúlt években végzett kitűnő munkáját. A végzett tevékenység jelentőségét és kihatásait figyelembevéve a vezetőségi jelentés elég szerénynek mondható.

A jövőbeni szervezési feladatokkal kapcsolatban — kiegészítésképpen — legyen szabad saját szakmám területéről egy javaslatot tennem: a vezetőségi beszámoló az Osztály fontos feladataként jelöli meg a következőt: „. . . . . a tudományszervezésnek egyik fontos feladata a témákat egymáshoz közelíteni, egymás között a munkakapcsolatokat megteremteni." Ha ez az elv valóban az Osztály jövőbeni működésének egyik súlypontja lesz, úgy elkerülhetetlennek látom a biológiai Osztály katalizáló szerepét a *neurobiológia* területén. A biológiai Osztályhoz tartozó több kutatóhely eredményes munkája folytán a neurofiziológiai, neuromorfológiai, neurokémiai és neurokibernetikai témák súlypontja kezd — igen helyesen — más osztályokról, a mi osztályunkra áttolódni. E helyzet szervezési és adminisztratív konzekvenciáit is előbb-utóbb le kell vonni. Bíztató jel az ősszel Tihanyban megrendezendő Neurobiológiai Szimpozium. De az Osztály rendelkezésére álló materiális eszközök egy részét a jövőben még fokozottabban kellene erre a területre irányítani még akkor is, ha a szóbanforgó kutatóhelyek nem is kerülnek a létesítendő szegedi központ látókörébe.

Szentágothai János: Tisztelt Osztályülés! Talán különösen fog hatni, hogy én is hozzászólok, miután a beszámoló szövegéért, habár szerényebb mértékben, de mégis magam is felelős vagyok.

Az eddig elhangzott hozzászólások és elsősorban az osztálytitkár úr bevezetője megállapították, hogy a határterületi kérdések jobb kimunkálása osztályunk egyik jövőbeni fontos feladata.

Azon nyilván nem lehet változtatni — mert egészséges, természetes fejlődés, amelynek máris látjuk a pozitív eredményeit —, hogy az Osztály néhány alapvető témával különösen intenzíven foglalkozik, s hogy egyes részlettémák helyett kezd intézményekben gondolkozni. Ez szükségszerű is, hiszen mind több akadémiai intézmény alakul, amelyekkel való speciális foglalkozás az Osztály elsőrendű kötelessége.

Ugyanígy kialakultak tanszéki kutatócsoportok és tanszéki kutatóhelyek, amelyeket az Osztály speciálisan támogat. Ez a helyzet tehát nyilvánvalóan szükségszerű és helytelen volna, ha most újra ellentétes irányban haladnánk oly értelemben, hogy az Osztály újra minden a biológia területéhez tartozó kutatási témával foglalkozna. Úgy érzem viszont, hogy nem szerencsés úton járunk akkor, amikor ugyanezt az elvet — ti. a koncentráció elvét a bizottságokra vonatkozólag is érvényesítjük. A múltban igyekeztünk a bizottságokat jobban profilírozni, de az elhangzott megjegyzések és különösen

az előbbi hozzászólás is mutatja, hogy a bizottságok nem egyszer s mindenkorra való felosztását jelentik egy-egy tudományterületnek, s előbb-utóbb gondolni kell más típusú bizottságok felállítására, illetve a bizottságok átszervezésére elsősorban a gyorsan fejlődő és változó határterületekkel kapcsolatban.

Bizottságaink — legalábbis azok, amelyekben működöm — komoly válságban vannak. Nem a munkastílusukról van szó: eléggé megfiatalítottuk az Osztály bizottságait, személyi összetételük megfelelő és helyesen tükrözi a szakterületek fontosabb aktivitási irányait. Mindenki ismeri a híres Parkinson törvényt, amely szerint a bizottságoknak van egy bizonyos kritikus létszámuk, amelyen felül nem képesek eredményesen működni. Nem hiszem, hogy Bizottságaink túllépték volna ezt a kritikus létszámot. Van azonban a bizottságozásnak egy másik fontos törvényszerűsége, amelyet Parkinson úgy látszik elfelejtett kidolgozni. Ha tudniillik a bizottság előtt levő témák száma egy kritikus szám alá esik, akkor lehetetlen az érdemi vita és bírálat. Ezt anti-Parkinson törvénynek (vagy ha ilyesmire is hiú lennék Szentágothai-féle törvénynek) lehetne elnevezni. Azt hiszem, hogy Bizottságaink működésében itt a hiba. Hiába áll a Bizottság fiatal, eredményesen dolgozó, érdeklődő s még esetleg kritikusan gondolkozó tagokból, ha csak három intézmény egy-két témája van a bizottság előtt, akkor nincs összehasonlítás és arányosítás az egész szakterületen folyó munkához viszonyítottan és érdemi kritika sem lehet. A témakoncentráció elve, tehát ami jó az Osztály szintjén, az úgy látszik, nem jó a Szakbizottsági szinten.

Nem tudnék most konkrét javaslattal élni a tekintetben, hogy mit kellene tenni, mert hiszen láttuk a hozzászólásokból, hogy e téren egészen ellentétes tendenciák teljesen reális alapokból alakulnak ki. Az első hozzászóló javasolta, témabizottságokat kellene csinálni, mert azoknak a keretében van leginkább lehetőség arra, hogy egy-egy témát objektív módon felmérjünk és a különböző eredmények értékét meghatározzuk. Ilyen kísérletek folytak régebben, nem mindenütt váltak be, bár bizonyára akad néhány olyan súlyponti téma, amely nagyonis elbírna egy témabizottságot. Én inkább a Szakbizottságok „országosításában" látnám a megoldást. Míg az Osztály szükségszerűen intézményekben, munkahelyekben gondolkodik elsősorban, addig talán jobb volna ha a Szakbizottságok az Osztályok, sőt Főhatóságok határaitól függetlenül az egyes szaktudományok területeit fognák át. Természetesen minden Szakbizottság valamely Főhatóság (akadémiai osztály vagy minisztérium) felügyelete alá tartozna, de egész szakterületén az egyetlen szakmai véleményező és tanácsadó szerv lenne, amely attól függően, hogy az illető munkahely milyen Főhatóság, ill. Osztály gondozásában van, oda tenné meg szakmai vagy személyi javaslatait. Nem vagyok adminisztrátor, nem nagyon értek ahhoz, hogy ez miképpen vihető keresztül. Ezen olyanoknak kellene gondolkozniuk, akik szervezési dolgokhoz értenek, s akik ilyen szervezeti forma másirányú kihatásait is fel tudják mérni.

Hogy a hozzám közelálló témakörökből mondjak példát: morfológiai témákkal foglalkozik a mi Osztályunk Struktúra-Funkció Bizottsága, de ugyanakkor az Orvosi Osztálynak is van Morfológiai Bizottsága és ugyanígy az ETT-nek és talán még a Művelődésügyi Minisztériumnak is. Minthogy azonban egy témával — speciális esetektől eltekintve — nem lehet két vagy több bizottságban foglalkozni, a témákat mai szervezeti rendszerünk mellett három vagy négy Bizottság közt meg kellett osztani ennek említett összes

káros következményével. — Egyáltalán nem vagyok biztos, hogy mi volna itt a legcélszerűbb megoldás, ezért inkább csak hangosan gondolkoztam. Bizonyos veszély kétségtelenül jelentkezne abban, ha most fordítva monstre Szakbizottságok keletkeznének tengersok áttekinthetetlen témával. De a Szakbizottságokon belül szervezett operatív vezetőségekkel és célszerű Albizottságok szervezésével ez bizonyára áthidalható.

Végül visszatérve oda, ahol elkezdtem, a határterületek növekvő fontossága és gyorsabban változó jellegük miatt is meg kellene találni a megfelelő szervezési formákat szakbizottsági szinten. Itt van például a neurobiológia, amelyben a Pszichológiai Bizottságtól kezdve nem tudom hány bizottság érdekelt. Ez szükségszerűen azzal jár, hogy a szakemberek megoszlanak, a terület szétaprózódik, s így a helyes kritika és az összehasonlítás végülis lehetetlenné válik. Feltétlenül meg kell keressük a szakbizottsági munka és szervezés mai igények szerinti helyesebb formáit.

Láng István: Tisztelt Osztályülés! Kedves Elvtársak!

Az Osztályvezetőség beszámolója ez évben is, hasonlóan az előző évek elképzeléseihez, hangsúlyozta a tudományos kutatók továbbképzésének fontosságát és szükségességét. Négy fő területet jelölt meg a beszámoló: a szűkebb szakmai, a matematikai, az idegen nyelvi és a filozófiai továbbképzést. Aki ismeri az Osztály munkáját, az tudja, hogy nemcsak beszéltünk erről, hanem egyet-mást tettünk is már ezen a téren.

A továbbképzés általános problémakörén belül szeretnék röviden a filozófiai továbbképzéssel foglalkozni.

A filozófiai műveltség az általános műveltség része. Ha végig tekintünk a biológia területén, láthatjuk, hogy neves biológusok sok esetben szívesen foglalkoztak filozófiai problémák fejtegetésével is.

Filozófia azonban többféle volt és van is. Nem titkoljuk, hogy a filozófiai továbbképzésen mi azt értjük, hogy kutatóink a marxista filozófia területén legyenek jártasak, a dialektikus és történelmi materializmus ismeretében helyesen értelmezzék az újabb biológiai kutatások eredményeit, egyidejűleg ismerjék és kellő kritikai érzékkel helyesen értékeljék a jelenkori fontosabb polgári filozófiai irányzatokat.

Minden továbbképzés azonban időbe kerül. Tudom, hogy nehéz helyzetben van az a biológus, aki mindenben részt kívánna venni. A szakirodalom nyomonkövetése ma már reménytelen feladat. A Biological Abstract például 1966-ban 120 102 közleményt referált. Ha egy-egy közlemény átlagos terjedelmét csak 10 oldalnak vesszük, akkor is mindennap — az ünnepnapok és az évi szabadság ideje alatt is — 15 db 200 oldalas könyvet kellene végigolvasni, hogy a teljes biológiai szakirodalmat napra kész állapotban ismerhesse meg valaki. Nyilvánvalóan ez lehetetlen, de nincs is rá szükség. A probléma talán ott adódik, amikor a szűkebb szakmai terület nyomonkövetésének teljesen jogos és érthető igényével a kutató elzárkózik minden mástól, esetleg elfeledkezik arról, hogy része egy társadalomnak és tagja egy emberi közösségnek. Bármennyire is fejlődik a tudományos eredményeket közlő nyomdaipar, bármennyire is tökéletesednek dokumentációs és információ átadó szervezetünk munkája, kell és szükséges, hogy legyen idő többek között a filozófiai tudás felújítására, továbbfejlesztésére és tökéletesítésére.

A világ két legnagyobb biológiai referáló lapja az amerikai Biological Abstract és a szovjet Referativnij Zsurnal Biológiai sorozata az 1966-os évben

közel azonos számú filozófiai cikkről közölt ismertetést; az előző 82, az utóbbi 77 olyan tárgyú közleményt dolgozott fel, amely a biológia filozófiai problémáival foglalkozott.

Ezek a cikkek azonban legfeljebb egy harmad részben fedik át egymást. Az amerikai lap ugyanis nem referálja a marxista filozófiai lapokat, továbbá az ott ismertetett közlemények jelentős része abba a kategóriába tartozik, amit mi inkább tudomány irányításnak nevezünk. Ez azt jelenti, hogy évente mintegy 120—130 tanulmány lát napvilágot a biológia filozófiai kérdéseiről. Vagyis minden 100 szakcikkre jut egy filozófiai jellegű közlemény.

Ismeretes, hogy a fizika és kémia fejlődése szükségszerűen megelőzte a biológia fejlődését. Azt hiszem nem túloznak azok, akik a fizika és kémia forradalma után a közeli évtizedekre jósolják a biológia forradalmát. Nyilvánvalóan ez a filozófia fejlődésére is olyan nagy hatással lesz, mint ahogy az századunk első évtizedeiben bekövetkezett a fizikai kutatások rohamos kifejlődése idején. Az egymásrahatás azonban kölcsönös és a biológia is sokat nyerhet a dialektikus mozgástörvények helyes értelmezésével, ill. a filozófiai kategóriák megfelelő ismeretével, avagy visszaszorulhat fejlődése az egyébként helyes filozófiai tételek helytelen interpretálása során.

A marxista folyóiratokban mind gyakoribb egy-egy konkrét biológiai problémával foglalkozó közlemény megjelenése. Amíg az amerikai — egyébként nem marxista — Phylosophy of Science, az utolsó öt évben 5 biológiával foglalkozó közleményt publikált, ugyanakkor a szovjet Voproszi Filozofii ugyanazon idő alatt 36 ilyen tárgyú közleményt jelentetett meg. Sajnos a Magyar Filozófiai Szemlében csak 7 biológiai problémát boncolgató cikket közöltek le 5 év alatt.

A Voproszi Filozofii-ban igen széles skálájú és nagyon érdekes szemléletű közlemények jelennek meg. Engedjék meg, hogy az utolsó másfél év során leközöltekből említsem meg néhánynak címét;

A modern genetika aktuális problémái.
Gregor Mendel — a modern genetika előfutára.
A molekuláris biológia filozófiai problémái.
Micsurin és a modern genetika.
Az életfolyamatok matematikai modellezése.
Genetika és dialektika.
A biofizika módszertani kérdései.
Az élet funkcionális meghatározásának kérdései.

Azt hiszem, hogy ez a puszta felsorolás is mutatja, hogy a szovjet biológusok és filozófusok kellő figyelmet fordítanak a biológia fejlődése folyamán újonnan jelentkező problémák filozófiai értelmezésére.

A beszámolóban említés történt, hogy az Osztály kezdeményezésére a Marxizmus-Leninizmus Esti Egyeteme filozófiai tagozaton ez év őszén speciális programmal biológus osztály nyílik. A speciális program nem azt jelenti, hogy filozófia-történettel, vagy a klasszikus marxista irodalommal a hallgatók nem foglalkoznak, hanem azt jelenti, hogy a szokásos programon belül különleges figyelmet fordítanak majd a biológia filozófiai problémáira. A szeminárium vezetője is olyan filozófus lesz, aki biológus képesítéssel is rendelkezik. Egyébként 26-an jelentkeztek ebbe az osztályba. Van közöttük akadémikus és van ösztöndíjas gyakornok is. Azt hiszem érdemes lesz megtalálni az olyan szervezeti formát, hogy egy-egy érdekesebb előadáson a tanfolyam állandó hallgatóin kívül mások is részt vehessenek.

A filozófiai továbbképzésnek csak az egyik és nem az egyetlen módja az Esti Egyetem elvégzése.

A lényeg az, hogy kutatóink ismerjék fel annak szükségességét, hogy a marxista filozófia terén kellő mértékben jártasak legyenek. A szabadidő egy részének ilyen célra történő felhasználásával, szervezeti keretek segítségével, remélhetőleg hamarosan elérjük, hogy biológus kutatóink jelentős része idegen nyelveket jól beszélő, kellő matematikai képzettséggel és széles-körű filozófiai áttekintéssel rendelkező kiváló biológus-szakemberré váljon.

Bíró Endre: Tisztelt Elnök Úr! Tisztelt Osztályülés!

Elnézést kérek azért, hogy e számos igen széles látókörű és alapvető kérdést érintő hozzászólás után egy olyan kérdésről szeretnék beszélni, amely a mi helyi problémáink szemszögéből merül fel; arról szeretnék ugyanis beszélni, hogy hogyan áll a fiatal egyetemi oktatók tudományos karrierjének a kérdése.

A helyzet az, amint mindnyájan tudjuk, hogy pusztán a tudományos karriert tekintve, a fiatal egyetemi oktatók bizonyos mértékben hátrányos helyzetben vannak azokkal szemben, akik az egyetem elvégzése után egy pár év múlva egy kutatóintézetben kezdik meg karrierjüket. Igaz, hogy egyetemeinken is általában igen széles körű tudományos kutatómunka folyik, és a tapasztalat szerint az egyetemi oktatók közül elég sokan szépen fejlődnek. Előadódhat olyan helyzet, amikor nagyon lényeges volna, hogy egy fiatal egyetemi oktató pl. egy évre mindenféle oktatómunka alól felmentést kapna. Ez lenne az ideális megoldás olyan esetekben, amikor olyan eredményei vannak, amelyek gyors kidolgozása nagyon előrevinné a karrierjét. Ennek ideális formája természetesen legtöbbször valamilyen külföldi ösztöndíj lenne, de ebbe a kérdésbe most nem akarok belemenni. Ez sokszor nem oldható meg.

Szeretnék egy egyszerű javaslatot tenni, amely a kérdést talán meg tudná oldani. Arra gondolok, hogy konkrét esetekben, amikor tehát egy fiatal kutató valamilyen eredményt ért el, amelynek kimunkálása rövid idő alatt várhatóan szép eredményekhez vezethet és megállapítható, érdemes támogatni, akkor az Akadémia segítséget nyújtson ahhoz, hogy az illető egy évre mentesíthető legyen az oktatás rutinmunkájának java alól. Nagyon sok egyetemi intézetben a rutin oktatómunkának jelentős részét nagyon jól el tudná látni egy frissen végző, tehát tulajdonképpen gyakornoki sorban levő szakember, tanár vagy biológus. Azt hiszem, nem járna nehézséggel, hogy az Akadémia esetenként ilyen helyettes gyakornok státuszának biztosításával segítsen egy egyetemi oktatót előrehaladásában. Nem hiszem, hogy problémát okozna annak a végleges elhelyezkedése, aki a helyettesítést egy évre vállalná és egy évvel később kerülne sor az elhelyezésére.

Még egyszer hangsúlyozom, hogy olyasmire gondolok, hogy az a fiatal egyetemi oktató itt belföldön olyan helyzetbe kerülne, mintha egyéves külföldi ösztöndíjat kapott volna, tehát egy évig nem lenne semmi más gondja, csak az, hogy kidolgozásra érdemes munkáját teljes egészében kidolgozza.

Uherkovich Gábor: Igen tisztelt Osztályülés! Ismeretes, hogy évekkel ezelőtt megváltozott a tudományos kutatások anyagi támogatásának rendszere. Akkor az Akadémiától ezt a szerepet részben a szakminisztériumok, illetve a Tudományos Kutatási Fejlesztési Alap vették át.

Amikor ez az átszervezés megtörtént, sokakban már a legelső időben is felmerült az a gondolat, hogy vajon ezzel egy időben történt-e és történik-e kellő gondoskodás az anyagi dotáció adminisztratív szétosztásán túl az elvi irányításról és főleg a kutatómunka magasabb szintű értékeléséről.

Az elmúlt évek gyakorlata azt mutatta, hogy ez a kérdés nincs kellően rendezve, hiszen a mai hozzászólások tekintélyes része ebbe a körbe esett. A kérdés tehát olyanféleképpen vetődik fel, hogy az Akadémia az utóbbi időben lényegében csak azokról az intézményekről adott részletes tájékoztatást — a mostani titkári beszámoló is így szól —, amelyek céltámogatást kapnak.

Nyilvánvaló, hogy minél sürgősebben meg kell találni a tudományos kutatások irányításának, értékelésének átfogóbb formáját, amelyet már évekkel ezelőtt meg kellett volna találni. Szerintem nem elsősorban az Akadémia hibája volt, hogy ez közös platformon eddig nem alakult ki.

Azt hiszem, a járható út az lenne, hogy az akadémiai témabizottságok kapják meg az illető tudományterület összes témáit, a megfelelő kutatási terveket és jelentéseket és ők végezzék felelősséggel a tematikai összefogást. Az ilyen dolgokat szervezetileg is és apró részletekben, az ügyvitel vonatkozásában is az Akadémiának és az érdekelt minisztériumoknak kell megoldaniuk, s ez a következő időszak egyik sürgős feladata lesz, mert joggal sérelmezik azok az intézmények, amelyeknek jelentései itt nem szerepeltek, hogy ők eltűntek a kutatásnak ebből a magasabb szintéziséből.

A másik a hidrobiológia kérdése. Ez a tudományág nem szerepel a vázlatos titkári áttekintésben, nem szerepel azon tudományágak között, amelyek kellően el vannak látva és nem szerepel azok között sem, amelyeknek fejlesztésében az Akadémia a jövőben többet kíván tenni. Ez a tudományág a hazai hivatalos tudománypolitikában valahogyan „Mohamed koporsójaként" lebeg „ég és föld között".

Pedig a hidrobiológia jelentősége világszerte közismert és állandóan növekszik, hiszen ahogy a kultúra előrehalad, a jó víz jelentősége és mindannak a jelentősége, ami összefügg a vízzel, többek között a vizek élővilágának kutatásával, világszerte növekszik. Magyarország abban a szerencsés helyzetben van, hogy itt már meglehetősen régen egy igen neves szakember-garnitúra alakult ki, amely az új generációval együtt nemzetközi szinten is megfelelően képviseli ezt a tudományágat.

Viszont a tudományág művelésének anyagi feltételei és főleg szervezeti feltételei nincsenek kellően megoldva. Az a jelenlegi helyzet, hogy a sok jó szakember szerteszét, különböző intézményeknél működik. Valószínűleg járható lenne az az út, amelyet a legutóbbi időben a Német Demokratikus Köztársaság és Csehszlovákia alkalmaznak, hogy ti. a különböző helyeken dolgozó hidrobiológus kutatókat szervezetileg és tematikailag jobban összefogják, és így anélkül, hogy ennek akár státus-, akár más anyagi kihatása lenne, kompaktabb szervezettel és tematikával jobb eredményeket érnek el. Azt hiszem, nálunk is így lehetne megkezdeni a hidrobiológia jelentőségének, súlyának megfelelően a hazai adottságok jobb felhasználását.

Pénzes Antal: Tisztelt Elnök Úr! Tisztelt Vitaülés! Az elhangzottakból láttuk, hogy nagyon sokan a biológiai tudomány kutatási lehetőségeit taglalták, mivel nemcsak anyagi segítséggel lehet a biológiai tudományokat előbbre vinni.

Én is ehhez a kutatási részhez szeretnék hozzászólni, bár egészen más irányból, nevezetesen a természetvédelem szempontjából. Már évek óta figyelem a beszámolókat, de itt az Akadémián természetvédelmi probléma még nem merült fel, ez valahogy távol állt az eddigi gyakorlattól. Kivételt képez Straub Brunó akadémikus egyik akciója a balatoni halpusztulással kapcsolatban, amikor egy bizottság alakult, hogy ennek okait felderítsék. Ez nagyon fontos és hasznos intézkedés volt, s ezt hivatalos beavatkozás is követte abból a célból, hogy a további kártevéseknek elejét próbálják venni.

Itt azonban szorosan véve az állat- és növényvédelemről szeretnék beszélni, mert ennek — úgy látszik — az Akadémián nincs külön bizottsága vagy érdekeltsége. Az irodalomban, a napisajtóban természetjárók s esetleg geológusok is hozzászólnak néha a természetvédelmi problémákhoz, de azután eredményes intézkedés nélkül megáll a természetvédelem ügye. Van ugyan Természetvédelmi Hivatalunk, minisztériumok közötti hivatal ez, amelynek óriási hatalom van a kezében papíron, de a valóságban egészen egyszerű problémákat sem tud megoldani, mert hol az egyik, hol a másik minisztérium gáncsolja el; így azután nem tud megelőzni olyan pusztításokat, amelyeknek a jövőre nézve jóvátehetetlen kihatásaik vannak. Itt van közöttünk Balogh János akadémikus, aki előadásaiban bemutatta, hogy világméretekben milyen természetpusztítás folyik: különösen a növény- és állatvilágban, folyik a biomassza tönkretétele a helytelen gazdálkodás, a helytelen szemlélet következtében.

Azt hiszem, hogy nekünk, biológusoknak egyik legfontosabb feladatunk, hogy az élővilág védelmével is foglalkozzunk. Ez a jelen és a jövő legfontosabb problémája, mert a mai nagy kemizálás, indusztrializálás és egyéb mindenféle mechanizmusok következtében maholnap nem lesz levegőnk, nem lesz vizünk, az ételünk megmérgeződik. Miért? Ez nem akadémiai probléma?

Úgy tudom, az Akadémia a mostani programjában is vannak egészségügyi témák, amelyek az iparosítás kémiai veszedelmeire hívják fel a figyelmet, de szerintem az Akadémiának — nem csak a Biológiai Osztálynak, hanem az egész Akadémiának, mint a magyar közélet és társadalom csúcsszervezetének — kicsit hatékonyabban kell belenyúlnia a természetvédelmi problémákba. Ha az Akadémia természetvédelmi kérdésekben — amikor a természetvédelem teljes sutba dobásával csak gazdasági és egyéb szempontok figyelembevételével természetpusztítás folyik — a Természetvédelmi Hivatal segítségére siet, s azt e probléma megoldásában a maga tekintélyével és tudásával támogatja, akkor, azt hiszem, meglesz az anyagi fedezete is a biológiai kutatásnak, mert ha így megy tovább, akkor pénzt ugyan fognak kapni a fiatalok, de nem lesz mit vizsgálniuk, mivel nem lesz sem térképezés, sem biomassza-mérés, sem egyéb kutatási lehetőség, mert vagy csak emberek lesznek és kukorica, vagy pedig valami új élőlények fognak keletkezni, amelyeknek már nem lesznek biológiai problémái.

Nem javasolok újabb bizottságot, csak azt kérem, hogy a Biológiai Osztálynak élproblémája, szívügye legyen, hogy a természetvédelem kérdését a Természetvédelmi Hivatal segítségével felszínen tartsa, mert a természetvédelem elsősorban embervédelem is.

Dévay Márta: Tisztelt Elnök Úr! Tisztelt Osztályülés! Az aspiránsképzésről szeretnék néhány szót szólni. Jelenleg az az irányzat, hogy valakinek az aspiránskérelmét csak akkor veszik be, ha az az Intézet, amelyben

képzése folyna, az aspiránsidő után alkalmazza. Hasonló volt a helyzet a martonvásári kutatóintézetben is, de szerencsére nem okozott problémát. Aspiránsunkra szükségünk volt a későbbiekben, mint kutatóra, tehát képeztük a magunk számára. A helyzet azonban nem mindig ilyen szerencsés.

Egy Intézet, ha alkalmas arra, hogy aspiránsokat képezzen, akkor ezt a lehetőséget kihasználva, kapjon aspiránsokat. Azt hiszem, minden intézet szívesen vállalja. Nem is itt van a probléma. Véleményem szerint egyetlen intézet sem tudja vállalni, hogy képezzen pl. 10 aspiránst, úgy, hogy mind a tíz ottmaradjon. Valahogy úgy kellene ezt a kérdést a továbbiakban megoldani, hogy csak annyi aspiránst vegyenek fel, ahány kutatóra későbbiekben szükség van, és ahányat a három év eltelte után el is tudnak helyezni.

Amikor valaki aspirantúrára jelentkezik, még kutatómunkája kezdetén van. Nagyon helyes elv az aspiránsokat már az egyetem befejezése után közvetlen kiválogatni. Sok fiatalról az egyetemi évek alatt is megállapítható, alkalmas-e kutatómunkára, vagy sem. Az aspiránsképzés összekapcsolása az akadémiai gyakornoki intézménnyel, azonban sokkal jobb lenne. Valahogy úgy gondolom a megoldást, hogy az akadémiai gyakornokok közül válogassák ki megfelelő felvételi vizsga után az aspiránsoknak legmegfelelőbbeket. Ezzel biztosítani lehetne, hogy az aspirantúrára a valóságban is csak olyanok kerüljenek, akik később is megállják mint kutatók a helyüket.

További problémám szintén az aspiránsképzéssel kapcsolatos. Kutatóintézetekből jelenleg nem vesznek fel aspiránst, mondván, annak úgyis az a foglalkozása, hogy kutat. Ez így nem helyes. Gyakran előfordul, hogy fiatal, jóképességű embereknek, akiknek aspirantúrára szükségük lenne, egyes idősebb kutatók mellett nincs meg a lehetőségük és idejük a rendszeres, legalább is részben önálló munkára. Gyakran előfordul, gazdasági megfontolásból, vagy egyéb okokból, hogy a fiatal, beosztott munkatársaktól jelentős időt vonnak el, amelyre viszont szükségük lenne. A kutatóintézetekben dolgozó fiataloknak is adjanak (és ez ne csak a vezetőjétől függjön) résztémát, amely biztosítja színvonalas disszertáció beadásának lehetőségét. Mondják meg neki, ez lesz a kandidátusi értekezésének témája, és egyben adjanak meghatározott számú munkanapot, amikor ezen dolgozhat. Csak e problémák megoldásával lenne elérhető, hogy a kutatóintézetben dolgozó fiatalok ne legyenek hátrányban az ugyanott dolgozó aspiránsokkal szemben.

Horváth István: Tisztelt Elnökség! Tisztelt Osztályülés! Az ipari kutatásokkal kapcsolatban szeretnék rámutatni arra, hogy a különböző kutatóhelyek nívója között rendkívül nagy különbségek vannak, vonatkozik e megállapítás saját szűkebb munkaterületemre, a fermentációs kutatásokra. Az egyes kutató intézetekbe és gyári kutató vagy fejlesztő laboratóriumokba évről évre kerülnek tehetséges, dolgozni vágyó fiatal szakemberek, akiknek azonban nincs meg a megfelelő iskolájuk ahhoz, hogy kutatásaik eredményeit megfelelő kritikával értékeljék.

A határterületen folyó kutatások fejlesztése érdekében fontos eredménynek tartom, hogy Budapesten megindult a szakbiológus-képzés és ez a jövőben Szegeden is megvalósul. Ezt azonban tovább kellene fejleszteni, melyhez valószínűleg az egyes iparágak segítségét is meg lehet nyerni.

Az egyetemi tanulmányok befejezése csupán alapot biztosít a kutatások elkezdéséhez és ezért helyes lenne, ha a fiatal szakemberek nem közvetlenül

kerülnének a gyakorlati kutatások területére, hanem két, esetleg három éven keresztül képzésük tovább folyna egy-egy fejlett színvonalú kutatást végző akadémiai vagy esetleg ipari kutató intézetnél. Így elérhető lenne, hogy a különböző iparágak területén folyó kutatások színvonala fokozatosan emelkedne, és egyúttal megszűnne az a jelenség, hogy a határterületek témáit érintő előadásokban egy-egy kongresszuson szégyenkeznünk kell amiatt, hogy az előadók sokszor alapvető fogalmakkal nincsenek tisztában.

Salánki János: Tisztelt Osztályülés! Az Osztályvezetőség beszámolója jól tükrözi azt a fejlődést, ami az elmúlt 3 évben — sőt talán azt mondhatom, az Osztály megalakulása óta eltelt 5 év alatt — a biológiai tudományok terén bekövetkezett. Gyarapodást jelentett ez a személyi állományban, de a kutatások anyagi ellátottságának, műszerezettségének tekintetében is.

A Tihanyi Biológiai Kutató Intézet ugyan nem szerepelt az Osztály által elsődlegesen fejlesztésre kijelölt, kiemelten támogatandó intézetek között, mégis az a helyzet, hogy a beszámolási időszakban az intézet ellátottsága, illetve felszereltsége lényegesen javult és alkalmasabbá vált színvonalas kutatómunka vitelére. Az általános fejlődés tehát lemérhető a Tihanyi Biológiai Kutatóintézet fejlődésében is. 3 évvel ezelőtt az Osztályvezetőség akkori beszámolója kapcsán e helyről kértem az Osztály támogatását ennek a nem kiemelt, de véleményem szerint — hiszen a saját szakmáját mindenki igen fontosnak tartja — nagyon fontos területnek a számára. Most kötelességemnek tartom regisztrálni és megköszönni, hogy az akkor óhajtott fejlesztési igény megértésre talált. Bízom abban, hogy ezt a támogatást a többi tudományterületekhez hasonlóan, az Intézet a jövőben is meg fogja kapni.

A kutatási feltételek javulásával egyidejűleg az Akadémia tudománypolitikai elveinek megfelelően a két osztály — a Kísérleti Állattani Osztály és a Hidrobiológiai Osztály — tudományos tevékenységének egyirányúbbá, határozottabb profilúvá tételét tűztük ki célul, s valósítottuk meg. A Kísérleti Állattani Osztály teljes egészében gerinctelen neurobiológiai kutatásokra állt rá, a Hidrobiológiai Osztály pedig elsődleges feladatának a Balaton élővilágának kutatását tekinti. A munka koncentrálását és határozott profil irányában való alakítását a Hidrobiológiai Osztályon nagymértékben elősegítette — sajnos, hogy ilyen relációban kell ezt a tényt említenünk — az a balatoni halpusztulás, mely felhívta a figyelmet a Balatonkutatás terén levő hiányosságokra. Az az Akadémiai Bizottság, mely az Osztályvezetőség megbízásából Dudich akadémikus vezetésével az Intézetben járt, jelentős segítséget adott a Hidrobiológiai Osztály feladatainak helyes meghatározásához. Azóta megtörtént nemcsak a program kidolgozása, mely úgy véljük megfelel mind az alapkutatási elveknek, mind a gyakorlati szükségleteknek, hanem annak megvalósítása is megkezdődött. Azt hiszem, hogy az Intézet ilyen fejlődése és mindkét osztály létszámában történt kb. 30%-os növekedés beletartozik a Biológiai Osztályhoz tartozó kutatóhelyek fejlődésének általános tendenciájába, és az ehhez szükséges feltételek biztosításáért ismét csak köszönetemet szeretném kifejezni az Osztályvezetőség felé.

Szeretnék hozzászólni a tudományos káderek továbbképzésének és fejlődésének a kérdéséhez, mert úgy látom, a jövőben elsősorban itt vannak feladataink. Ez valóban magábanfoglalja azt a négy pontot, melyről az Osztályvezetőség beszámolója szólott. Valamennyi igen fontos. Ezek közül egyet ragadnék ki. Ez azzal van összefüggésben, hogy az intézetek műszerezett-

ségét — és gondolom ez nemcsak a mi intézetünkre, de a többire is vonatkozik — nagymértékben növeltük az elmúlt években és ezzel a kutatómunka színvonala javításának feltételeit teremtettük meg. Hogy az adott lehetőségekkel éljünk, most már rajtunk, kutatókon a sor. Nem problémamentes azonban ez a helyzet. Növelni kell a kutatók azon lehetőségét, hogy a korszerű műszerekkel dolgozzanak, hogy a korszerű kutatási lehetőségeket valóban ki is használják. Elsősorban itt nem a fiatal kutatókra gondolok, hanem az idősebbekre, akik az egyetemet régebben végezték, régebben dolgoznak már. Biztosítani kell, hogy a módszerek tekintetében a lehetőségekkel a kutatók is fejlődjenek és képessé váljanak az új technika alkalmazására. Csak ez biztosítja a felszereltség javítása mellett a kutatómunka színvonalasabbá tételét. Teljesen egyetértek az előttem felszólaló Ádám elvtárssal, hogy a 40 év a tanulásban nem határ, mégkevésbé a 35. Én tehát úgy gondolom, hogy metodikai kérdésekre, a kutatók metodikai továbbfejlődésére igen komoly gondot kell fordítani, és azt hiszem, ilyen problémák nemcsak a mi intézetünkben merülnek fel. Azt a felszerelést, amelyet az Akadémia biztosít, hasznosítanunk kell, mert ha azokat nem használjuk ki, nincs értelme annak, hogy ilyen felszerelést biztosítsanak. Meg kell találni tehát az egyes esetekben kialakult ellentmondás feloldásának az útját.

A biológiai kutatások és gyakorlat kapcsolatáról nem nagyon esett itt szó. Ez érthető, hiszen a biológiai alapkutatás eredményei a gyakorlatban csak több áttételen keresztül jelentkeznek. Ezzel összefüggésben a határterületi vonatkozásokkal szeretnék én is foglalkozni, de más aspektusban, mint az előttem felszólalók. Úgy érzem, hogy a gyakorlati intézmények, üzemek, ipari laboratóriumok és mások még nem ismerték fel kellően azt a lehetőséget, amit biológusok alkalmazása rejt magában és nem használják ki ennek előnyeit. Másrészről a biológusképzés, de a biológiai kutatás jellegéből fakadóan is többen vannak és lesznek, akik nem óhajtanak véglegesen a biológiai kutatás vagy egyetemi oktatás területén maradni és szívesen tevékenykednének a gyakorlati élet valamely ágában, jól hasznosítva egyetemi vagy kutatóintézeti tapasztalataikat. Tulajdonképpen egy, a kutatómunka területéről kiinduló szellemi exportra, szakember-exportra gondolok, amit a biológus kutatók gyakorlati területre való átirányításával lehetne biztosítani. Egyebek mellett ílymódon ez is hozzájárulna a biológia közvetlen gyakorlati életben való alkalmazásához. Helyesnek tartanám, ha az Osztályvezetőség foglalkozna azzal, hogyan lehetne ezt a területet jobban felmérni és biológusok alkalmazása irányában kellő propagandát kifejteni.

Szeretnék a bizottságok kérdéséhez is hozzászólni. A Botanikai Bizottsággal kapcsolatban már elhangzott egy konkrét javaslat. Beszéltünk erről a Zoológiai Bizottság ülésén és másutt is. Úgy vélem, nem is a bizottságok személyi összetételén kellene elsősorban változtatni, hanem a bizottságoknak az osztályon belüli szervezettségén. A zoológia területén jelenleg 2 bizottság van. Egyik a Zoológiai Bizottság, másik a Funkcionális Struktúrakutatási Bizottság. A Zoológiai Bizottság magában foglalja mindazon területeket, melyekről Kaszab elvtárs említést tett, de ezenkívül magában foglalja az állatélettant is, mely véleményem szerint ugyancsak része a zoológiának. Ílymódon a két bizottság három, nagyjából körülhatárolható területen tevékenykedik. Úgy vélem, és erről a Zoológiai Bizottságban is esett már szó, hogy nem jó ez a megosztottság. Ha a bizottságok számát nem akarjuk szaporítani, akkor csökkenteni kellene eggyel és egy zoológiai bizottságot kellene létesíteni,

melybe az összes ide tartozó területek bennfoglaltatnának. Ha viszont nem akarjuk, hogy túlságosan nagy legyen a bizottságok tagjainak száma — ami kétségtelenül magában rejti azt a veszélyt, amiről Szentágothai akadémikus beszélt —, abban az esetben három bizottság mellett kellene dönteni: egyik maradhatna a Funkcionális Struktúrakutatás Bizottsága, másik a rendszertant, ökológiát foglalhatná magában, harmadik pedig az élettani bizottság lehetne.

Szeretnék hozzászólni a nyelvtanulás problémájához is. A szervezett nyelvtanulást magam is nagyon fontos, okos kezdeményezésnek tartom és igyekszem, hogy intézetemből is minél többen részt vehessenek a nyelvtanfolyamokon. Sőt a nyár folyamán egy kis saját nyelvtanfolyamot is szervezünk az intézetben: orosz és angol kurzust tartunk. Nem olyan intenzíven, mint Budapesten, de intenzívebben a szokásosnál. Naponkénti 2—3 órás elfoglaltsággal, 6 héten keresztül kisebb csoportokban fog folyni az oktatás. Úgy véljük, ezzel is hozzájárulhatunk az intézet kutatói nyelvismeretének bővítéséhez. Azt hiszem azonban, nem szabad abba a hibába esni, hogy nyelvtanulás tekintetében mindent a szervezett oktatástól várjunk. Az Osztályvezetőség beszámolója is érinti ezt a kérdést. Fontosnak tartom ennek hangsúlyozását, nevezetesen azt, hogy a nyelvtanulást nem lehet csak az Akadémiára és csak központilag szervezett kurzusokra hárítani. Végeredményben elég sokan vannak, akik nem gyerekkorban, odahaza, hanem idősebb fejjel, ilyen intenzív kurzusok nélkül tanultak nyelvet. Mégis megtanulták, és elég sokan szerezték meg ilymódon a szükséges nyelvismeretet, és nyelvvizsgákat is. Kemény munkát kíván ez, enélkül azonban a nyelvtanulást semmilyen formában nem lehet elképzelni. Azért tartom ezt szükségesnek hangsúlyozni, mert bármennyire kecsegtető is az az elképzelés, amit különböző lapokban, népszerűsítő újságokban lehet olvasni, hogy az ember alszik és közben hallgatja a magnetofonon az idegen szöveget és így megtanulja a nyelvet — ez az út a nyelvtanulásra ma még nem járható. Nem tudom, mi lesz a jövőben, azt majd meglátjuk, ma azonban csak aktív munkával lehet egy nyelvet elsajátítani, és ezt másra áthárítani semmiféle módon nem lehet. Természetesen adjuk meg a lehetséges segítséget, de óvjunk is a könnyű sikerek kecsegtető, de hiú reményétől. Továbbra is szükséges, hogy mindenkinek az akarata, aktív részvétele és igen szívós munkája párosuljon azzal a törekvéssel, amit az Akadémia a nyelvtanulás fejlesztésére fordít és biztosít.

A beszámoló több helyen említette, s több hozzászólás is hivatkozott arra, hogy a tihanyi intézet rekonstrukciójának utolsó lépéseként a szálloda felújítására kerül és ez módot ad arra, hogy ott különböző szimpoziumokat és egyéb tanfolyamokat, továbbképzéseket tartsanak. Ehhez csak azt szeretném hozzáfűzni, hogy a tihanyi intézet alapításától kezdve mindig örömmel látta vendégül a hazai biológusokat, akár mint vendégkutatókat, akár mint szimpoziumok vagy egyéb összejövetelek résztvevőit. Ugyanígy a jövőben is szívesen látjuk a magyar biológia képviselőit, munkásait és a lehetőségekhez képest igyekezni fogunk olyan feltételeket biztosítani, hogy ott jól érezzék magukat, hasznosan, eredményesen töltsék el az időt, és járuljanak hozzá a tihanyi összejövetelek a hazai biológia fejlődéséhez.

T ó t h Tibor: Tisztelt Elnökség! Tisztelt Hallgatóság! Az osztálybeszámoló szövegét tanulmányozva, a hároméves tevékenység rendkívül sokrétűségét lehet konstatálni. A mi szerény kutatócsoportunk részéről — ha idézőjelben használom is ezt a kifejezést —, az Országos Természettudományi

Múzeum és az Országos Embertani Társaság részéről szeretnék egy rövid megjegyzést tenni.

Tekintettel arra, hogy az általános kutatói tevékenységet értékelte a beszámoló, sőt azt ezen túlmenően rendkívüli elismeréssel is illette, meg kell említenem az egyéb anyagi dotációt s a műszerellátással való támogatást is, amelyet az elmúlt három év folyamán kérésünk elfogadásával segített az Osztályvezetőség.

Szeretném azonban megemlíteni általános vonatkozásban az Osztály tevékenységéből azt, amit Láng István szaktitkár is elmondott. Rendkívül fontosnak tartom egy speciális biológiai tanfolyam szervezését, amelyet az Osztály részéről kezdeményeztek. Ezen mód lesz olyan polgári filozófiai áramlatok megismerésére, amelyek a nyugati világban nagy hatást gyakorolnak, de amelyeket egy más jellegű tanfolyamon az idő rövidsége miatt nagyon nehéz lenne megismerni.

Beszélni kell itt még az embertan felfogásáról, mert itt is van bizonyos világáramlat. Az utóbbi időben ugyanis különösen a latin nyelvű országok irodalmában, hellyel-közzel most már tudományos irodalmában is az embertan fogalma alatt nemcsak embertant, hanem — amint azt a Valóság hasábjairól tudjuk — más humán tudományokat is kezdenek érteni, mint pl. a régészetet és a néprajzot. Úgy gondolom, hogy bár nagyon fontos az együttműködés a különböző tudományágak között, különösen az embertan részéről, de azért ez nem vezethet ilyen fals csoportosításhoz.

Ismételten utalva az említett példákra, a magam részéről személy szerint is messzemenő megértést tapasztaltam az ilyen tudományszervezési vonatkozásokban az Osztályvezetőség részéről az elmúlt három év folyamán. A beszámolóban is messzemenő elismerést tapasztaltam az embertan irányában, amiért mély hálámat fejezem ki.

Törő Imre elnök: Köszönöm a hozzászólásokat. Több hozzászólás nem lévén, megkérem Straub akadémikust, szíveskedjék válaszát megadni.

Straub Brunó osztálytitkár: Tisztelt Osztály! Az elhangzott hozzászólásokra nem kívánok egyenként válaszolni egyrészt azért, mert két és fél órája folyik a vitánk, másrészt pedig azért, mert a hozzászólásokban kikristályosodott, hogy az Osztály következő feladatait arra a két kérdésre kell koncentrálni, amelyet én is exponáltam.

Az egyik kérdés, amely folyton visszatért, az Akadémia által támogatott biológiai kutatások és az egyéb biológiai kutatások kapcsolata, s hogy ezen a területen javítanunk kell munkánkon. Az itt elhangzott javaslatokat nagyon hálásan köszönöm; ezeket, azt hiszem, jórészt meg lehet fogadni és fel lehet használni a munka kialakításában. Egy dologba azonban nem ugrom be. Amikor Parkinson, illetve Szentágothai akadémikus azt mondotta, hogy adminisztrátor vizsgálja meg az ő javaslatát, akkor rám nézett. Én ezt messzemenően elhárítom magamtól. Azt hiszem, ő éppúgy tudja, mint én, hogy ezt a munkát tudományos kutatóknak és biológusoknak kell elvégezniük. Ki kell próbálni azokat a szervezeti formákat, amelyeket mi tartunk helyesnek. Isten ments, hogy egy adminisztrátort megkérdezzünk, hogy mit csináljunk, mert akkor egész nap ülhetünk a bizottságokban. Keressük meg a hatékony formát, és változtassuk meg a bizottságok munkamódszereit, mert meglevő

bizottságaink valóban csak az Osztályvezetőség szűk akadémiai szempontjainak, hogy úgy mondjam, a kiszolgálói, nem mennek túl funkciójukban — sem az operatív, sem a véleményező funkcióban — azon, hogy az Osztályvezetőség érdeklődésére saját szektorukkal kapcsolatban választ adjanak. Azt hiszem, ez már idejét múlta, s valóban gondolkodnunk kellene — akár megszüntetésükkel, akár bővítésükkel — a bizottsági forma korszerűbb kialakításáról.

A másik kérdés, amely itt felmerült és amellyel elég sokan foglalkoztak, a továbbképzés különböző formái. Továbbképzés alatt azonban értem azt a nagyon lényeges kérdést is, amelyet Ádám professzor felvetett: az sem közömbös, hogy hogyan tanítsuk a biológiát. Legyen szabad Láng István szaktitkár statisztikáját tovább folytatnom és elmondanom, hogy a természettudományok fejlődése — és azt hiszem, ez a biológiára messzemenően áll — úgy haladt, hogy 1900 és 1950 között megkétszereződött, azután 1950 és 1960 között ismét megkétszereződött, azután 1960 és 1966 között újból megkétszereződött. Ha most meggondoljuk, hogy ilyen gyors ütemű fejlődéssel állunk szemben, s ha meggondoljuk, hogy jelenlegi általános iskolai és középiskolai biológiaoktatásunk legjobb esetben a kb. 15—20 évvel ezelőtti helyzetet tükrözi, akkor világos, hogy nem lehetünk megelégedve a régi módszerekkel, s hogy egészen új módszerekre van szükség.

Az, hogy az Akadémia hallassa szavát a középiskolai oktatással, illetve a tankönyvek anyagával kapcsolatban, más országokban közismert, hiszen tudjuk, hogy a Szovjetúnióban az ilyen akadémiai bizottságoknak nagyon döntő befolyásuk van arra, hogy mi kerül be a középiskolai tankönyvekbe. Azok a bizonyos kék, sárga és zöld színű biológiai programok is lényegében a vezető tudományos biológus kutatók közreműködésével születtek meg Amerikában. Azt hiszem, hogy ez elől a feladat elől nem lehet kitérni, s nekünk a továbbképzéssel minden szinten foglalkoznunk kell.

Nagyon egyetértek azzal, hogy a szakmai továbbképzés a biológusok számára egyre fontosabbá válik, s hogy azt a bizonyos matematikai kurzust nem szabad megállítani, mert ez csak a bevezetés volt, hanem folytatni kell. Egyetértek azzal, hogy az egyes tudományos kérdésekben módszertani szimpoziumok vagy a műszerekkel kapcsolatos szimpoziumok megrendezésével nagyon sokat tudunk segíteni nemcsak a fiatal kutatóknak, hanem az idősebb kutatóknak is.

Ami az egyetemi biológusképzést illeti, Szalai professzor idézte mondatom első felét; én szeretném idézni a második felét is, ahol azzal kapcsolatban, hogy miért kell kérni a Művelődésügyi Minisztérium támogatását, az áll: „. . . mert hosszabb ideig nem lehet csak a biológusok áldozatkészségére és megértésére építeni".

Mi tisztában vagyunk azzal, hogy a biológusképzésben jelenleg részt vevő szakemberek és tanszékek hatalmas áldozatokat vállalnak, és küzdünk azért, hogy a Művelődésügyi Minisztérium jobb feltételeket teremtsen, mint a mostaniak. Persze, meg kell mondanom, hogy amikor a biológusképzés megindítását javasoltuk, akkor nem voltak különösebb illúzióink. Tudtuk, hogy kezdetben küzdeni kell, hogy küzdelmes, nagyon nehéz helyzet fog teremtődni az új feladatok vállalásával. Azzal azonban tisztában kell lenni, hogy új dolgot csak úgy lehet kezdeni, ha áldozatot hozunk, de miután már az áldozatot meghoztuk és meghozzuk, jogosan léphetünk fel azzal a követeléssel, hogy a Művelődésügyi Minisztérium többet tegyen, mint amennyit idáig tett.

Ami a továbbképzéssel kapcsolatban itt még elhangzott egyrészt Bíró Endre, másrészt Horváth István hozzászólásában, azzal szintén egyetértek, mert az aspiránsképzésben még sokat lehet segíteni. Nem hiszem, hogy az aspiránsképzésben illetékesek lennénk szervezeti javaslatokat tenni, de például elképzelhetőnek tartom azt, hogy egyetemi oktatók belföldi tudományos ösztöndíjat kapjanak, s ezen keresztül lehetővé váljon, hogy tudományos munkájukat intenzívebben folytassák, másrészt elképzelhetőnek tartom azt is, hogy például a gyógyszeripar adjon belföldi ösztöndíjakat vagy a gyógyszeripar számára képeznénk aspiránsokat. Egyetértek Horváth Istvánnal abban, hogy helytelen módszer az, amely szerint valaki az egyetem elvégzése után kerül egy ipari kutatóintézetbe vagy konkréten az iparba és nincs módja elsajátítani azon a területen a korszerű, színvonalas munkát, illetve a munka elemeit. Az alapkutatás és a gyakorlat kapcsolatának valóban legfontosabb formája az, hogy az alapkutatásból néhány éves praxisra menjenek alkalmazott kutatóintézetekbe, s akár viszont is.

Pénzes dr. szóvátette a természetvédelemben az Akadémia szerepét. Erre azt szeretném mondani, hogy az Akadémiának és a Biológiai Osztálynak a természetvédelemmel kapcsolatban alapkutatási szinten igenis nagy felelőssége van, mi ezt tudjuk is. Hiszen a nemzetközi biológiai program, amely körülbelül tízéves munkát jelent, pontosan ezeket a kérdéseket veti fel, s ezeknek a kérdéseknek a vizsgálatába kapcsolódunk be, hogy megelőzhessük azt, hogy az ember elpusztítsa a saját létfeltételeit. Ezen a területen alapkutatások végzésével tudunk hozzájárulni a kérdés megoldásához, illetve ezen keresztül tudjuk megmondani, hogy milyen rendszabályokat kellene alkalmazni. Az Akadémiának természetesen nem az a feladata, hogy ebbe a kérdésbe operatívan nyúljon bele. Egyébként éppen a holnapi napon egy nagy ankét fog foglalkozni a kemizáció biológiai következményeivel. Azt hiszem, hogy a kérdés napirenden tartásával, kutatásával, tanácsadással sokat tudunk tenni.

Megköszönöm, hogy az Osztályvezetőség beszámolójához és a megadott programhoz ennyien szóltak hozzá és ilyen hasznosan szóltak hozzá, mert sok olyan új szempont merült fel, amelynek figyelembevételével valóban ki tudjuk javítani azokat a hibákat, amelyeket a hozzászólók szóvátettek. Köszönöm szíves türelmüket.

Törő Imre elnök: Tisztelt Osztályülés! Most nem az a feladatom, hogy ezekhez a problémákhoz hozzászóljak és a magam véleményét kifejtsem, hanem az a feladatom, hogy az itt elhangzott vita után levonjam azt a konklúziót, hogy a magyar biológusok kellő figyelemmel kísérték a Biológiai Osztály munkáját, s igyekeztek azt a maguk területén úgy értékelni, mint amely segítette őket a munkájukban, s hozzászólásaikkal igyekeztek itt az Osztály munkáján javítani.

Ezért engedjék meg, hogy azt a konklúziót vonjam le, hogy a magyar biológusok meg voltak elégedve az Akadémia Biológiai Osztályának a munkájával még akkor is, ha számos olyan hiba van akár a Biológiai Osztály munkájában, akár azon kívül is, amelyen feltétlenül segítenünk kell.

Az egyik olyan fő probléma, amely minduntalan szóba került s amely már évek óta vita tárgyát képezi, a határterületek fejlesztése, illetve együttműködése a biológia más területeivel. Úgy érzem, ez egy olyan téma, amelyet a Biológiai Osztályon belül nem tudunk eldönteni, de ma már megérett arra,

hogy az Akadémia plénuma elé terjesszük. Végeredményben az Akadémia elnöksége kell hogy ezzel az üggyel foglalkozzon és segítse megoldani a magyar biológiának ezt a kérdését jobb strukturális szervezés útján.

Ezek után tenném fel az osztályülésnek azt a kérdést, hogy megadja-e a felmentést az elmúlt háromévi munkáért az Osztályvezetőségnek. Kérem válaszukat. (Helyeslés) Amennyiben megadják, úgy köszönettel veszem szíves segíteni akarásukat, s e helyről szeretném megköszönni az Osztályvezetőség és a magyar biológusok nevében az osztálytitkár elvtársnak azt a nagy erőfeszítését, amely végeredményben elsősorban vezetett oda, hogy elmondhassuk, hogy a magyar biológiai tudomány az elmúlt három évben ha nem is problémamentesen, de előrelépett.

Ezekkel a szavakkal megköszönöm a megjelenést, és az Osztályvezetőség ülését bezárom.

MELLÉKLET

A BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYA VEZETŐSÉGÉNEK 1967. ÉVI KÖZGYŰLÉSI BESZÁMOLÓJÁHOZ

1966. évi Közgyűlés óta eltelt időszak alatt tudományos fokozatot nyertek

Biológiai tudományok doktorai

Garamvölgyi Miklós	biofizika
Horváth Imre	növényökológia
Rajki Sándor	genetika
Soós Árpád	zoológia

Biológiai tudományok kandidátusai

Buday Ferdinánd
Farkas Henrik
Hámori József
Járainé Komlódi Magda
Maróti Imre
Mühlrad András
Précsényi István
Simoncsics Pál
Sirokmánné Köves Erzsébet
Thoma Andor
Udvardi János

Biológiai tudományok doktorainak száma ..... 36 fő
Biológiai tudományok kandidátusainak száma ..... 157 fő

1966. évi külföldi kapcsolatok

a) BEUTAZÁSOK:

1. Kultúregyezmény keretében	22 fő
2. Akadémiai meghívással	12 fő
Összesen:	34 fő

b) KIUTAZÁSOK:

1. Kultúregyezmény keretében	31 fő
2. Kongresszusi kiküldetés	25 fő
3. Kongresszusra kiutazás akadémiai Ft támogatással	39 fő
4. Külföldi meghívás (kongresszusra, előadások tartására)	14 fő
5. Ösztöndíjas meghívásos tanulmányút	11 fő
Összesen:	120 fő

b/1. pont alatti 31 fő közül 4 fő 6—12 havi, 2 pedig 1 év, ill. 16 havi időtartammal volt tanulmányúton

b/2. pontnál szerepeltetett 25 fő közül 14 fő teljes kiküldetést kapott, 11 fő kiutazásához kongresszusi részvételi díjat biztosítottunk.

b/5. pontnál szerepeltetett 11 személy közül tanulmányútját 1965-ben kezdte meg és 1966-ban fejezte be 3 fő.

c) EGYEZMÉNYES TÉMÁK:

AKADÉMIAI INTÉZETEK:

Biokémiai Intézet	1	szovjet (SZUTA)
	1	szovjet (SZUOTA)
Biológiai Kutató Intézet	1	szovjet
Botanikai Kutató Intézet	1	cseh
Genetikai Intézet	2	lengyel
	1	román
	1	cseh

TÁMOGATOTT INTÉZETEK, ILL. TANSZÉKEK:

ELTE Növényrendszertani Tanszék	1	román
ELTE Növényélettani Tanszék		
Növényélettani Kutató Csoport	1	román
BOTE Anatómiai Intézet	1	szovjet
BOTE Orvosi-Vegytani Intézet	1	szovjet (SZUOTA)
BOTE Szövet- és Fejlődéstani Intézet	2	román
	2	jugoszláv
POTE Anatómiai Intézet	1	szovjet
JATE Embertani Intézet	1	lengyel
TTM Állattár	1	lengyel
	1	cseh

Összesen: 21 téma

Könyv- és folyóiratkiadás

1964.

Árbrahám Ambrus:	Die mikroskopische Innervation des Herzens und der Blutgefässe von Vertebraten
Soó Rezső:	A magyar flóra és vegetáció rendszertani növényföldrajzi kézikönyve I.
Soó Rezső:	Die Regionalen Fagion-Verbände und Gesellschaften Südosteuropas
Törő I.—Csaba Gy.:	Az ember normális és pathológiás fejlődése
Dévényi Tibor:	Fehérjék primér szerkezet-kutatásának problémái és eredményei
Horánszky András:	Die Wälder des Szentendre—Visegrader Gebirges
	Sebgyógyulási Symposion
	Spermium Symposion

Magyarország Állatvilága sorozatban megjelent:

Erdős József:	Fémfürkészek VII.
Steinmann Henrik:	Szitakötő lárvák
Pellérdy László:	Sejtélősködők II.
Szalay László:	Vízi atkák

1965.

B. P. Tokin:	Az elméleti biológia
	Bauer Ervin munkássága
B. Csillik:	Functional Structure of the Post-synaptic Membrane in the Mioneural Junction
Fekete G.:	Erdővegetáció tanulmányok a gödöllői dombvidéken (német nyelven)
Jendrassik L.:	A Le Chatelier-féle elv és a dinamiás egyensúlyok törvénye (német nyelven)
Steinmann H.:	Egyenesszárnyú rovarok központi idegrendszerének anatómiai vizsgálata (angol nyelven)
Palkovits M.:	Morphology and Function of the Subcomissural Organ
Szemere László:	A Kárpát-medence földalatti nagygombái (német nyelven)

Uherkovich Gábor: Die Scenedesmus-Arten Ungarns
Modern Trends in Neuromorphology
— Studia Biologica Hungarica —
Proceedings of the Symposium on Bacterial Transformation and Bacteriocinogeny
— Symposia Biologica Hungarica —

Magyarország Állatvilága sorozatban megjelent:

Erdős József: Fémfürkészek II.
Kovács Lajos: Araszolók I.
Gozmány László: Lepkék. Általános bevezetés
Gozmány L., Szőcs József: Molylepkék I.
Babos Sándor: Kullancsok

1966.

Soó Rezső: A magyar flóra és vegetáció rendszertani növényföldrajzi kézikönyve
Loksa Imre: A közép-keleteurópai molyhos tölgyes bokorerdők zoocönológiai viszonyai (német nyelven)
Balóné Banga Ilona: Elasztain és kollagén szerkezete és funkciója (angol nyelven)
Allodiatorisz Irma: Zoológiai bibliográfia 1900—1925 (német nyelven)
Andreánszky Gábor: A felső oligocén flóra Magyarországon (angol nyelven). Studia Biol. Hung.
Elődi Pál: A globuláris fehérjék térszerkezete. Studia Biol. Hung.

Magyarország Állatvilága sorozatban megjelent:

Szunyoghy János: Gerincesek. Általános bevezetés
Berinkey László: Halak
Varga Lajos: Kerekes férgek I.
Farkas Henrik: Gubacsatkák

1966. évben elnöki jutalomban részesültek:

Biró Endre biológiai tudományok kandidátusa ..... 5000 Ft
Szalai László biológiai tudományok kandidátusa ..... 5000 Ft
Salánki János biológiai tudományok kandidátusa ..... 4000 Ft
Megyeri János biológiai tudományok kandidátusa ..... 3000 Ft
Dezső Gyula tudományos munkatárs ..... 2000 Ft
Niedetzky Antal tudományos munkatárs ..... 2000 Ft
Székely György orvostudományok kandidátusa ..... 2000 Ft
Vida Gábor biológiai tudományok kandidátusa ..... 2000 Ft
Kovács Lajos muzeológus ..... 2000 Ft
Stieber József biológiai tudományok kandidátusa ..... 2000 Ft

MTA Biol. Oszt. Közl. 10. (1967)

GAZDASÁGI ADATOK

A BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYA 1967. ÉVI LÉTSZÁMKERETE, KÖLTSÉGVETÉSI ELŐIRÁNYZATA, TKFA (AKADÉMIAI TÁMOGATÁS) ÉS BERUHÁZÁSI KERETE

1. A Biológiai Tudományok Osztálya összesített előirányzatai

fő és ezer Ft

	Létszám-keret	Költségvetési előirányzat	TKFA (akadémiai támogatás)				Beruházási keret				2 + 3 + 4 Előirányzatok összesen
			A + B	C) beszerzés		együtt	belföldi gép, műszer	importgép, -műszer	építési, egyéb	együtt	
			személyi, dologi	belföldi műszer	import-műszer						
	1	2				3				4	
Akadémiai Intézetek	224	15 475	—	414	4670	5084	2051	2273	182	4506	25 065
Támogatott Intézmények ...	134	—	2254	603	4052	6909	1987	2226	—	4213	11 122
Biológiai Társaságok	—	42,9	—	—	—	—	—	—	—	—	42,9
Összesen	358	15 517,9	2254	1017	8722	11 933	4038	4499	182	8719	36 229,9

2. Akadémiai Intézetek előirányzatainak részletezése

fő és ezer Ft

	Lét-szám-keret	Költségvetési előirányzat	TKFA (akadémiai támogatás)			Beruházási keret				2 + 3 + 4 Előirányzatok összesen
			C) beszerzés		együtt	belföldi gép, műszer	importgép, -műszer	építés, egyéb	együtt	
			belföldi műszer	import-műszer						
	1	2			3				4	
MTA Biokémiai Intézete	66	3842	—	3391	3391	446	1205	—	1651	8884
MTA Biológiai Kutató Intézete ..	53	4352	300	430	730	1137	691	—	1823	6910
MTA Genetikai Intézete	67	2896	114	649	763	388	363	—	751	4410
MTA Botanikai Kutató Intézete .	38	4385	—	200	200	80	14	182	276	4861
Összesen	224	15 475	414	4670	5084	2051	2273	182	4506	25 065

3. Támogatott Intézmények előirányzatainak részletezése(tudományterületenként)

fő és ezer Ft

	Létszám-keret	TKFA (akadémiai támogatás)				Beruházási keret			2 + 3 Előirányzatok összesen
		A + B	C) beszerzés		együtt	belföldi gép, műszer	importgép, -műszer	együtt	
		személyi, dologi	belföldi műszer	import-műszer					
	1				2			3	
Biofizika	22	300	520	1310	2130	187	487	674	2804
Biokémia	12	330	60	—	390	108	238	346	736
Embertan	3	50	—	—	50	—	—	—	50
Genetika	13	200	—	1022	1222	554	155	709	1931
Mikrostruktúra	35	580	—	638	1218	903	808	1711	2929
Növényélettan	17	310	—	893	1203	235	318	553	1756
Rendszertan és Hidrobiológia	32	484	23	189	696	—	220	220	916
Összesen	134	2254	603	4052	6909	1987	2226	4213	11 122

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki szerkesztő: Farkas Sándor
A kézirat nyomdába érkezett: 1967. VII. 4. — Terjedelem: 6,75 (A/5) ív.

67.64059 Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György

15,— Ft

TARTALOM

ÖNÁLLÓ TANULMÁNY

Balogh János: A talajzoológia feladatai 81

AZ MTA NAGYGYŰLÉSE KERETÉBEN MEGTARTOTT ELŐADÁSOK

Győrffy Barna: Genetikai kérdések kísérletes megközelítése 95
Szende Kálmán: A kromoszóma szerkezet és működés összefüggésének vizsgálata baktériumokban és fágokban 105
Vida Gábor: Növények evolúciós változásainak genetikai elemzése 115
MTA Biológiai Tudományok Osztályának 1967. május 3-án tartott ülése 121

Megjelent 1967. IX. 24.

Index: 26.496

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK

KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTI

STRAUB F. BRUNÓ

X. KÖTET 3—4. SZÁM

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

1967

BIOL. OSZT. KÖZL.

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK
KÖZLEMÉNYEI

A SZERKESZTŐ BIZOTTSÁG TAGJAI
DUDICH ENDRE, GYŐRFFY BARNA, SOÓ REZSŐ,
SZENTÁGOTHAI JÁNOS, TÖRŐ IMRE, ZÓLYOMI BÁLINT

SZERKESZTI
STRAUB F. BRUNÓ

TECHNIKAI SZERKESZTŐ
DÉZSI LÁSZLÓ

SZERKESZTŐSÉG: MTA BIOLÓGIAI OSZTÁLYA BUDAPEST V., NÁDOR U. 7.

KIADÓHIVATAL: BUDAPEST V., ALKOTMÁNY U. 21.

A Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Osztályának Közleményei változó terjedelmű füzetekben jelennek meg. Négy füzet alkot egy kötetet. Évenként egy kötet jelenik meg.

Az MTA Biológiai Osztályának Közleményei részére kéziratok a következő címre küldendők:

Budapest V., Nádor u. 7., Dézsi László technikai szerkesztő.

Minden szerzőt 100 különlenyomat és nyomtatott ívenként 400 forint tiszteletdíj illet meg megjelent munkájáért. Közlésre el nem fogadott kéziratokat a szerkesztőség lehetőleg visszajuttat a szerzőhöz, de felelősséget a beküldött kéziratok megőrzéséért vagy továbbításáért nem vállal.

A Közlemények előfizetési ára kötetenként beföldi címre 40 forint, külföldi címre 60 forint. Megrendelhető belföldre az Akadémiai Kiadónál (Budapest V., Alkotmány u. 21. Bankszámla: 05-915-111-46 sz.) külföldre a „KULTÚRA" Könyv- és Hírlap-Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest I., Fő utca 32. Bankszámla: 43-790-057-181 sz.) vagy annak külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

A Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Tudományok Osztálya és Orvosi Tudományok Osztálya a következő idegen nyelvű folyóiratokat adja ki:

Acta Biochimica et Biophysica
Acta Biologica
Acta Botanica
Acta Chirurgica
Acta Medica
Acta Microbiologica
Acta Morphologica
Acta Paediatrica
Acta Physiologica
Acta Zoologica

E lapok hivatottak a magyar biológiai és orvosi tudományok eredményeinek legjavával a külföldet megismertetni.

A cikkek angol, német, francia vagy orosz nyelven jelennek meg, a szerző kívánsága szerint, összefoglaló pedig további egy ill. két nyelven. A dolgozatot magyar vagy a megfelelő idegen nyelven az alábbi címekre kell beküldeni:

Acta Biochimica et Biophysica szerkesztősége, Budapest XI., Karolina út 29. (Dr. Boross László).
Acta Biologica szerkesztősége, Budapest IX., Tűzoltó u. 58. (Dr. Bernád Irén).
Acta Botanica szerkesztősége, Budapest XIV., Vajdahunyadvár, Növénytár (Dr. Allodiatoris Irma).
Acta Chirurgica szerkesztősége, Budapest VIII., Üllői út 78/b. Urológiai Klinika (Dr. Rényi-Vámos Ferenc).
Acta Medica szerkesztősége, Budapest VIII., Szigony u. 43. KOKI (Dr. Stark Ervin)
Acta Microbiologica szerkesztősége, Budapest IX., Gyáli út 4. OKI (Dr. Dömök István)
Acta Morphologica szerkesztősége, Budapest IX., Tűzoltó u. 58. Szövet- és Fejlődéstani Intézet (Dr. Bernád Irén).
Acta Paediatrica szerkesztősége, Budapest VIII., Bókay János u. 53. I. sz. Gyermekklinika (Dr. Véghelyi Péter).
Acta Physiologica szerkesztősége, Pécs, Rákóczi út 80. (Dr. Korányi Lajos).
Acta Zoologica szerkesztősége, Budapest VIII., Baross u. 13. Természettudományi Múzeum (Dr. Soós Árpád).

A MIKROBIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK FEJLŐDÉSE A SZOVJETUNIÓBAN

WEISZFEILER GYULA

MTA Mikrobiológiai Kutató Csoportja, Budapest

Mint a biológia más területén is, a mikrobiológiai kutatások a Szovjetunióban a forradalom előtti Oroszország kiemelkedő tudósainak munkáiból indultak ki. Ez utóbbiak közül alapvető felfedezéseikkel járultak a mikrobiológiai tudomány fejlődéséhez: MECSNYIKOV I. I., akinek phagocitózis elmélete a darwinizmus elvein épült fel és még ma is az immunitástannak egyik sarkkövét képezi. IVANOVSZKI D. I. 1892-ben a dohány mozaik betegség vírusának felfedezésével a víruskutatás alapjait vetette meg. VINOGRADSZKI SZ. N. 1887-ben a talajbaktériumok autotroph tulajdonságait mutatta ki, és az általa kidolgozott szelektív tenyésztési módszerek ma is a talaj mikrobiológia alapját képezik. OMELJANSZKI V. L. a cellulóz és pektin tartalmú anyagok bakteriális lebontását, a levegő nitrogénjét megkötő baktériumok jelentőségét mutatta ki. CENKOVSZKI L. S. Pasteurnek a juhok anthrax (lépfene) elleni védőoltására kidolgozott attenuált törzsei helyett új, hatékony vakcinát állított elő. GAMALEIA N. F. kimutatta a baktériumok lithiumsók hatása folytán fellépő heteromorphozisát, s STRAUS-szal együtt a madártuberkulózis baktériumát írta le. STEFANSZKI a róla elnevezett patkánylepra kórokozóját fedezte fel.

Míg a cári Oroszországban a mikrobiológiai kutatások nem részesültek erkölcsi és anyagi támogatásban s így nem fejlődtek olyan mértékben, mint más nyugati országban, a Nagy Októberi Szocialista Forradalom, mint a tudomány más területein is, hatalmas fejlődést biztosított. Ennek alapját képezik új kutatóintézetek, amelyek közül kiemelkedő a Szovjetunió Tudományos Akadémiája Mikrobiológiai Intézete, a Mikroorganizmusok Biokémiájának és Fiziológiájának Intézete, a Szovjetunió Orvostudományi Akadémiájának Gamaleiáról elnevezett Mikrobiológiai és Epidemiológiai Intézete, a Vinográdszkiról elnevezett Virológiai Intézete, az Új Antibiotikumok Intézete. Az Összszövetségi Mezőgazdasági Mikrobiológiai Intézet, a Fehérje Bioszintézisének Intézete, az egyes szövetségi köztársaságok Tudományos Akadémiáinak mikrobiológiai intézetei, az egészségügyi minisztériumok mikrobiológiai intézetei és számos intézetnek mikrobiológiai részlegei. Természetesen a tudományegyetemek, orvosi, mezőgazdasági és különböző ipari szakfőiskolák mikrobiológiai tanszékein szintén folynak intenzív kutatások.

Az elmúlt 50 év alatt a mikrobiológia terén dolgozó kutatók száma legalábbis százszorosára megnőtt a forradalom előttihez képest. Ezek között számos akadémikus, egyetemi tanár és természetesen nagyszámú a fiatal kutatógeneráció. Így alakultak ki egyes kiemelkedő kutatók körül iskolák, mint NADSON, KRICSEVSZKI, SILBER, TIMAKOV, KRASZILNYIKOV, ZSDANOV, CSUMAKOV, SAPOSNYIKOV stb.

A mikrobiológiai kutatásokat áthatja a dialektikai materializmus marxista szelleme és ennek alapján az elméleti kutatások magas értékelése, de annak is szem előtt tartása, hogy a tudomány az embernek az érdekeit kell, hogy szolgálja és így gyakorlati alkalmazást is kell, hogy találjon. Természetesen ezeknek az elveknek az eltorzítása súlyos hibákhoz vezethet és ilyen volt a személyi kultusz idején BOSJANnak a fellépése, amelyet azonban gyorsan felszámoltak és amely nem hagyott maga után nyomot. Nehéz egy rövid összefoglaló keretében áttekintést adni a mikrobiológia területén folyó kutatásokról és azok eredményeiről, és ezért csak az egyes kutatási területeken elért kiemelkedő eredményeket említjük meg.

Az általános mikrobiológia terén egyike a központi problémáknak, amelyekkel szovjet kutatók foglalkoztak, a mikroorganizmusok evolúciójának és változékonyságának kutatása. A röntgensugarak mutagén hatását jóval MÜLLERnek drosophilákon végzett klasszikus megállapításai előtt NADSON (1925) mutatta ki. A mikroorganizmusok rendszertanát új alapokra fektette fejlődéstani szempontokkal KRASZILNYIKOV, akinek számos megállapítása, különösen az actinomyceták terén, ma már nemzetközi elismerést is talált. Az utolsó évtizedben a baktériumok öröklődő tulajdonságainak nukleinsavval kapcsolatos megváltoztatását elsősorban BELOZERSZKYnek tanulmányai alapján, valamint mutagén tényezők hatását vizsgálják: TIMAKOV, IMSENYECKY, ALIKHANJAN. A vírusok és fágok genetikai kutatása terén, a dohány mozaik vírusa vizsgálatában RIZSKOV, a poliomyelitis vírusa mutációjának, markerjeinek vizsgálatában GENDON, AGOL értek el komoly eredményeket. A bakteriális ontogenezis és cytológia, a baktériumok magstruktúrájának tanulmányozásában PESKOV kimutatta, hogy az egyszerű osztódáson kívül bonyolult folyamatok mehetnek végbe a külső körülményektől függően. A tuberkulózis baktérium változékonyságának törvényszerűségeit tanulmányozták LUBARSZKY, KEDROWSKY, TOGUNOVA, WEISZFEILER.

A baktériumok protoplasztjainak, L formáinak és a *Mykoplasmá*hoz tartozó mikroorganizmusok genetikai összefüggéseit tanulmányozták TIMAKOV és KOGAN.

A baktériumok anyagcseréjének vizsgálatában LEBEGYEV (1921) kimutatta, hogy bizonyos heterotroph gombák a molekuláris CO_2-t tudják asszimilálni. A levegő nitrogénjének asszimilációját és annak mechanizmusát KOSZTICSEV (1926), FJODOROV (1945—52) a modern molekuláris biológia szemléletének megfelelő szinten vizsgálták.

A mikroorganizmusok fiziológiájának tanulmányozásában fontos megfigyeléseket tettek az autotroph baktériumok és egysejtű algák anyagcseréje és biokémiai aktivitása terén. SAPOSNYIKOV V. N., RABOTNOVA, BELOZERSZKY a fiziológiai evolució törvényszerűségeit tanulmányozzák. Az egysejtű algák mint mikroorganizmusok, amelyek jelentős bioszintetikus képességgel rendelkeznek, sokoldalú vizsgálat tárgyát képezik és egyben az algatömegtenyésztés problémáit behatóan vizsgálják: PINEVICS, SZEMENYENKO. Pigmentképző, fotoszintetikus aktivitással rendelkező baktériumok biokémiai tulajdonságait tanulmányozta KONDRATYEVA.

A tengerek bakteriális flóráját behatóan vizsgálták ISZACSENKO és KRISZ, akiknek munkái ezen a téren minden további kutatáshoz alapvetőek. Mikroorganizmusoknak a kőolaj keletkezésében való szerepének vizsgálatában és a kőolajban való szaporodása tanulmányozásában TAUSZON (1925) új kutatási irányt nyitott meg, és egyúttal ezek a munkák szolgáltak alapul kőolajtermékeknek, mint táptalajnak mikroorganizmusok szaporítására való felhasználásában, ami új utat nyit az emberiség előtt a növekedő emberi és állati fehérjeszükségletnek bakteriális szintézis alapján való kielégítéséhez.

Mint ismeretes, az antibiotikumok felfedezése a mikroorganizmusok egymáshoz való antagonista viszonyán alapszik. Ezen a téren KRASZILNYIKOV (1936) vizsgálatai az actinomycetáknak baktériumnövekedést gátló tulajdonságairól alapul szolgáltak, mint ezt maga WACHSMANN is elismeri, a Streptomycin felfedezéséhez. Sikerült az utóbbi 20 év folyamán számos új antibiotikumot felfedezni: Mycetin, Aspergilin, Albumycin, Gramicidin, Mikrocid stb.

Az orvosi mikrobiológia terén a szovjet mikrobiológusok és víruskutatók jelentős eredményeket értek el a fertőző betegségek elleni oltóanyagok kidolgozásában. A CALMETTE által kidolgozott tuberkulózis elleni BCG vakcinát, amelynek hatékonysága ma már kétségtelen, behatóan tanulmányozták és kidolgozták a liofilizált vakcinát, amely lehetővé teszi ennek a különben igen rövid élettartamú oltóanyagnak tartósítását s ezáltal széles körű alkalmazását a világ minden részében. Az élő vakcinák kidolgozása terén kimagasló eredményeket értek el a GAISZKY és ELBERT által kidolgozott élő tularaemia elleni vakcinával, amely egy attenuált tularaemia törzs immunizáló képességén alapul. VERSILOVA a brucellózis elleni élő vakcina széles körű alkalmazását tette lehetővé munkáival.

A víruskutatás terén, a vírus és gazdasejt viszonyát az intracelluláris sejtszaporodást vizsgálta ZSDANOV. A távol-keleti encephalitis kórokozójának, a kullancs encephalitis vírusának felfedezése ZILBER és munkatársai nevéhez fűződik (1937). Ma már a kullancs encephaltis ellen is hatékony oltóanyagot állítanak elő. Ezenkívül mind ennek a betegségnek, mind más zoonózisnak a terjedésével kapcsolatban igazolódott PAVLOVSZKY elmélete a természetbeni fertőzési gócokról, amelyek szabadon élő állatok latens fertőzésén alapszanak. Az influenza elleni védőoltást ZSDANOV, SZMOROGYINCEV tanulmányozták.

A poliomyelitis elleni küzdelemben a Szovjetunió első helyen áll a SABIN által kidolgozott élő, attenuált vakcina tanulmányozása és alkalmazása terén. (CSUMAKOV, SZMOROGYINCEV, VOROSILOVA.) A szovjet víruskutatók segítségével szerveztük meg Magyarországon 1959 óta a poliomyelitis elleni védőoltásokat, amelyek hazánkban is ennek a betegségnek a gyakorlati felszámolását biztosították.

Kimutatták a haemorrágiás nephrosonepthritis vírus eredetét, amely más európai országokban, Magyarországon, Kínában és Japánban is előfordul.

A rosszindulatú daganatok víruseredetének tanulmányozása, a sejt malignizációja terén jelentős eredményeket értek el ZILBER, SVETMOLDAVSZKY, akik kimutatták, hogy a Rous sarcoma vírusa, amely szárnyasokból lett kitenyésztve, emlősökben is daganatképzéshez vezet. Ezek a vizsgálatok ma már széles körű, nemzetközi kutatások kiinduló pontjául szolgálnak. ZILBER, DEUTSCH munkái a víruseredetű daganatok elleni immunizálás új útjaira mutatnak; a vírus elleni immunitás nem specifikus tényezőjének, az interferonnak tanulmányozása terén ERMOLEVA, ZEITLONOK új módszereket dolgoztak ki, úgynevezett interferonogének alkalmazásával, amelyek a szervezetben interferonképződéshez vezetnek (vinylpirilidan, prodigiozan).

A fertőző betegségek antibakteriális kemoterápiájának tanulmányozásában jelentős eredményeket értek el ERMOLEVA, PLANELES, GAUZE.

Az immunitás problémáinak kutatása egyrészt szesszilis antitestek vizsgálatára irányult, KRICSEVSZKY, majd a Pavlov-i tan — az idegrendszer szerepéről vegetatív folyamatokban — alapján ZDRADOVSZKY és munkatársai irányításával vezetett új eredményekhez.

Az állatorvosi mikrobiológia terén több fertőző betegség kórokozóját fedezték fel. A háziállatok icterohaemoglobinuriájának kórokozóját egy *leptospirát* TYERSZKICH és MIHIN, a lovak toxikus gombás megbetegedését, sztachiobotriotoxicosist DROBOTKO, a rénszarvasok nekrobacillózisát REVNYIVIH, a lovak fertőző encephalomyelitisének vírusát LÖWENBERG, VISELESZKY; a lovak fertőző anaemiájának vírusát KOLJAKOV, PINUSZ. Az állatok fertőző megbetegedései diagnózisának új módszereit dolgozták ki komplement kötési, antigének és allergének előállításának takonykórnál, paratuberkulózisnál, brucellózisnál: VLADIMIROV, RUZSENCEV. Számos új oltóanyagot állítottak elő sertéspestis, leptospirózis ellen. GINZBURG egy toknélküli *anthrax* törzs szelekciójával új alapokra fektette a PASTEUR által bevezetett lépfene elleni védőoltásokat. Ezenkívül gyógyítási célokra immunsavók és bakteriophagok alkalmazását dolgozták ki számos bakteriális és vírus okozta megbetegedésben.

A mezőgazdasági és ipari mikrobiológia terén kimagasló eredményeket értek el. MISUSZTIN, KRASZILNYIKOV mikroorganizmusok szerepét tanulmányozták a talajban végbemenő biokémiai folyamatokban szelektív táptalajok segítségével. A gabona tartósításával kapcsolatosan felmerülő mikrobiológiai tényezők vizsgálatával foglalkoztak PODJAPOLSZKAJA, MIRZOJEVA.

A silózás mikrobiológiai folyamata különösen fontos a háziállatok takarmányozásához. Ezen a téren ZUBRILIN, GARDER kidolgozták a bakteriális tevékenység irányításának és a siló tartósításának legkedvezőbb feltételeit. Ezenkívül bizonyos magas fehérjetartalmú élesztőgombák segítségével a silótakarmány tápértékének javítását dolgozták ki. Bakteriális eredetű vitaminok (B_2, A, B_{12}) segítségével jelentősen fokozták az állattenyésztés produktivitását.

Az ipari mikrobiológia területén számos mikroorganizmust alkalmaztak a bakteriális bioszintézisre s úgyszintén erjedési folyamatokhoz. JERUSALEMSZKY a mikroorganizmusok folyamatos tenyésztésének feltételeit dolgozta ki és erre alkalmas berendezést szerkesztett. BUDKEVICS és KOSZTICSEV a citromsav mikrobiológiai szintézisét dolgozták ki. IVANOV, PALLADIN az alkoholos erjedés biokémiai folyamatát tanulmányozták s egyben az ebben részt vevő mikroorganizmusok fiziológiáját. A kőolajforrások bakteriális flórájának szerepét TAUSZON, ISZACSENKO és mások tanulmányozták. Újabban előtérbe került a kőolaj tisztításánál mint melléktermék keletkező származékok (paraffin) alkalmazhatóságának kérdése baktériumok szaporítására, hogy így emészthető és takarmányozásra alkalmas fehérjét nyerhessünk bioszintézis útján. Ma már kísérleti üzemek vannak, amelyekben mind kőolaj származékokon, mind cellulóz hydrolizátumokon bakteriális fehérjét nagy mennyiségben állítanak elő. Jellemző arra, hogy milyen nagy jelentőséget tulajdonít a szovjet állam az alkalmazott mikrobiológiai kutatásoknak és azok gyakorlati érvényesítésének, hogy a Szovjetunió minisztertanácsa mellett egy ezzel a feladattal foglalkozó, nagy hatáskörű irányító szerv létesült.

A Szovjetunió fennállásának 50. évfordulója az egész tudomány és ezen belül a mikrobiológia nagyszabású fellendülésének tanúja. Modern kutatóintézetekben a legjobb műszerekkel felszerelve, odaadással dolgozik sok ezer szovjet mikrobiológus a szocialista társadalom felépítésén, amelyben ma már alapelv az, hogy a tudomány termelőerő és a társadalom fejlődéséhez a tudomány fejlesztése nélkülözhetetlen követelmény.

ALKYLÁLÓ VEGYÜLETEKKEL A CREPIS CAPILLARIS SZÁRAZ MAGVAIBAN KIVÁLTOTT CHROMOSOMA MUTÁCIÓK

N. P. DUBININ és L. G. DUBININA

Szovjet Tudományos Akadémia Általános Genetikai Intézete, Moszkva

Az alkyláló vegyületek chromosoma aberrációkat, azaz átrendeződéseket (1) és génmutációkat (2) kiváltó mutagén hatásának vizsgálata több olyan sajátos jellegzetességet derített fel, amelyekben ezeknek a vegyületeknek a hatása mind az egyéb kémiai mutagének, mind a sugárzás hatásától különbözik. Kiderült, hogy az alkyláló mutagén a sejtciklus ún. G_2 fázisában nem okoz chromosoma átrendeződéseket; ezek csak akkor jelentkeznek, ha a DNS szintézis idején az S fázisban kezelt sejtek már mitosisba lépnek, és ezt nevezzük „késleltetett" mutagén hatásnak. Minden chromosoma, amely a kezelés pillanatában a G_1 vagy S fázisban volt, képes mutálódásra. Ilyenkor minden átrendeződés chromatida jellegű. Ebben különbözik az alkyláló vegyületek hatása az egyéb kémiai mutagénekétől és a sugárzásétól, amelyek a chromosomákra a sejtciklus minden fázisában hatnak, és chromatida valamint chromosoma típusú mutációkat egyaránt kiváltanak.

Különösen érdekes a chromosoma sajátossága és az alkyláló vegyület közötti kölcsönhatás a G_1 fázisban. Ilyen kölcsönhatásra nem a sugárzásra jellemző chromosoma, hanem chromatida változások lépnek fel. Kérdés, ha a mutagén csak a meglevő egyetlen chromosoma fonalra hat, mégis miért olyan átrendeződéseket idéz elő, amelyek képződéséhez két fonal jelenléte szükséges. Ebben a kérdésben két álláspontot ismerünk.

Az egyik nézet azokból az adatokból indul ki, melyek szerint az igen nagy reakcióképességű alkyláló mutagén, amikor a sejtre hat, ezt a mutagén sajátságát gyorsan elveszti. Így az elsődleges sérülés a chromosomában rejtett potenciális megváltozásként jelentkezik (3, 4, 5). Ebből kiindulva természetes lenne azt feltételeznünk, hogy az ilyen rövid ideig tartóan hatásos mutagén a G_1 fázisban olyan rejtett változásokat okoz az egyetlen chromosoma fonálban, hogy azok később, amikor az S fázisban a két chromatida képződik, tényleges chromatida típusú mutációkká válnak.

A másik nézet viszont abból a feltevésből indul ki, hogy a sejtben az aktív mutagénnek vagy termékeinek sajátságai hosszabb ideig változatlanul megmaradnak, és ezzel feleslegessé válik a chromosoma hosszan tartó rejtett változásainak feltételezése.

A késleltetett mutagén hatás feltevését FROESE—GERTZEN-ék 1964-ben (6) árpaszemek ethylmethansulfonattal kezelése alapján állították fel. Már korábbi, diepoxybutan kísérletekből kiderült, hogy mosásra a mutagén utóhatása kiküszöbölődik, *Crepis capillaris* gyökérben ethyleniminnel végzett chromosoma mutációs kísérletek alapján SIDOROV, SOKOLOV és ANDREEV 1965-ben (8) arra a megállapításra jutottak, hogy a tartósan hatékonynak megmaradó mutagén a chromosomákra csak azokban az *S* fázisba lépő sejtekben hat, amelyekben a DNS szintézisekor a chromatidakba megváltozott előfokozat épült be. Szerintük ez minőségi különbség az alkyláló vegyület hatása és a sugárzás, az oxypurinok és egyéb kémiai mutagének hatása között.

Azonban ez a második nézet, hogy a mutagén vagy annak termékei a sejtben órákkal a teljes sejtciklus után is még képesek megfelelő mértékben mutációkat kiváltani, eléggé vitathatónak tűnik. GREEN és KRIEG (9) ezt a lehetőséget phagokkal végzett kísérleteikben valóban teljesen ki is zárták. Kimutatták, hogy extracelluláris phagot ethylmethansulfonattal kezelve, a mutációk a phag első, második és rákövetkező replikálódásai után jelentkeztek. Amikor egyazon baktériumsejtet mutagénnel kezelt és nem kezelt phagokkal fertőzték, mutációk csak a kezelt phagokban léptek fel. Ha nem a phag DNS molekulájának rejtett megváltozása lenne a lényeges, hanem a mutagén bevitele a baktériumsejtbe a kezelt phagokkal, úgy a mutagén a baktérium sejtben a nem-kezelt phagokra is hatott volna.

1946-ban AUERBACH és ROBSON (10) közölték, hogy a *Drosophila* spermiumok mustárgázzal kezelését követően génmutációkat csak a hím szülő chromosomáiban figyeltek meg. Ha viszont a nőstény állatok mustárgázzal kezelése után néhány órával történt azok megtermékenyítése, a hím szülőtől származó chromosomákban mutációkat nem találtak. Világos, hogy ha a spermium a petesejtbe a mutagénnel együtt került volna be, vagy ha a mutagén a kezelt nőstényekben hatékonyan megmaradna, a kísérlet eredményei mások lettek volna.

KIHLMAN és ODMARK (11) kimutatták, hogy az 1, 3, 7, 9-tetramethylurinsav (TMU) a *Vicia faba* gyökerében csak a G_2 fázisban levő sejtekben idéz elő chromosoma rendellenességeket. A kezelés pillanatában G_1 és S_1 fázisban levő sejtekben mutáció nem jelentkezik. Márpedig, ha a TMU a sejtekben megmaradt volna, akkor mutációknak a G_1 vagy az *S* fázisból G_2 fázisba kerülő sejtekben is fel kellett volna lépniök.

A patkánymáj természetesen szinkronizálódott sejtpopulációjában dipinnel kiváltott mutabilitás tanulmányozása kimutatta (12), hogy a mutagén tartósan megmaradása feltevésével szemben az *S* fázis utáni kezelésre bekövetkező mutációk gyakorisága kisebb, mint a G_1 fázis utáni kezelésre, ha ez utóbbi néhány órával az *S* fázis bekövetkezése előtt történt.

A legtöbb adat arra utal, hogy az alkyláló vegyületek képesek a chromosomában rejtett változásokat előidézni. Ilyen nézőpontból ezek a mutagének a

chromosomákra a sejtciklus bármelyik fázisában hatnak. Azonban e potenciális változások megnyilvánulása, vagyis a chromosoma átrendeződés megjelenése a DNS fázishoz időzített, és így csak chromatida típusú változásokat eredményez. Bármely mutagén tényező és elsősorban az alkyláló vegyületek hatásának legjellegzetesebb sajátossága az, hogy mutációkat azokban a sejtekben idéz elő, amelyek a mutagénnel kezelve voltak, és hogy a mutációk bizonyos idő múltával, gyakran a következő sejtnemzedékben jelennek meg. AUERBACH és ROBSON (10) mutatták ki, hogy a *Drosophila* spermiumra ható alkyláló vegyületek először a kezelt spermiumok chromosomáiban jelentkező mutációkat váltanak ki, és hogy a mutációk a pete fejlődésének különböző szakaszaiban, bizonyos számú sejtnemzedék után jelennek meg, ami mozaikosságot eredményez. Az alkyláló vegyületeknek az a képessége, hogy a G_1 fázisban hatva ún. teljes mutációkat váltanak ki, vagyis, hogy a meglevő egyetlen fonál egész locusára kiterjedő teljes génváltozásokat, jelenleg a *Drosophila*-nál (13, 14, 15), árpánál (16, 17, 18), a kukoricánál (19), *Neurospora*-nál (20), egérnél (21) és egyéb szervezeteknél egyaránt bizonyított.

Az így előttünk álló kép ellentmondó. Amikor az alkyláló vegyületek chromosoma rendellenességeket okoznak, úgy látszik, hogy nem képesek a G_1 fázisban meglevő chromosoma egész fonalának megváltoztatására, ahogy az bekövetkezik, amikor génmutációk indukálódnak. A *Drosophila*-nál az alkyláló vegyületek hatására a spermiumokban fellépő génmutációknak csak mintegy 50%-a teljes (22), viszont X-sugarakkal kiváltott mutációknál 93—95% (22, 23).

A teljes génmutációk fellépése azonban megmagyarázható az alkyláló vegyületek tisztán chromatida jellegű hatásának feltevése alapján.

Mindkét testvér chromatidában azonos változások megjelenésének lehetősége elképzelhető ún. „rezonancia" mutációnál, amikor a potenciális változások isolocus-törés típusú mutációkba alakulnak át, vagy amikor azok a G_1 fázisban közvetlenül kiváltódnak. Ha ilyen mechanizmus érvényes a génmutációkra, akkor olyan kép alakul ki, ami külsőleg semmiben sem különbözik a G_1 fázisban, azaz az egy fonálban fellépő teljes mutációtól.

De vajon lehet-e azonosítani a chromosoma átrendeződés megjelenésének és a génmutációnak a mechanizmusát? A DNS molekulán belül a nukleotidok rezonancia mutációja a polynukleotid láncokban egészen más lenne, mint a chromatida képzésben? Ha ez utóbbi típusú rezonancia mutáció megvan a génmutációknál, nem kellene-e a mutálódó párban az allélek nagyobb változatosságának jelentkeznie?

SNYDER (24), majd pedig WATSON (25, 26) vizsgálták a bifunkcionális alkyláló vegyületekkel kezelt *Drosophila* nőstények receptaculumában tárolt spermiumokat és azt találták, hogy a chromosoma átrendeződések gyakorisága erősen emelkedett, viszont lethalis génmutációk nem léptek fel. Ezért úgy vélik, hogy lényeges különbség van az alkyláló vegyület mutagén hatására kiváltódott génmutációk és chromosoma átrendeződések sajátosságában.

Ezzel a kérdéssel összefüggésben igen érdekesek az alkyláló vegyületek mutagén hatásának kémiai alapjaira vonatkozó adatok. Az alkyláló vegyület hatásának kémiája szerint a chromosoma mutagéntől megtámadása lehetséges mind a DNS szintézis idején az *S* fázisban, mind a DNS szintézis távollétében, tehát a G_1 és G_2 fázisokban. A mutációt minden esetben a DNS molekulának az alkyláló vegyülettel közvetlen reakciója okozza (27, 28, 29).

ALEXANDER-ék (31), továbbá BROOKES és LAWLEY (28) a bi- és polyfunkcionális alkyláló vegyületek hatásában a keresztkötések képződését, mint fontos sajátosságot derítették fel, ami megakadályozza a DNS kettős fonalának szétválását alacsony ion-erősségű oldatban. Ezek a keresztkötések okozhatják a chromosomák rendellenességeit, különösen pedig az isolocus jellegű töréseket. NAGATA-ék (32) mutatták ki, hogy a monofunkcionális alkyláló vegyületek hatására a DNS molekulában mind a két fonál megsérülhet. Így tehát a DNS molekulának alkylálása lehetne a chromosoma rendellenességek megjelenésének közvetlen oka. Chromosoma mutációk főleg a guanin 7-es helyzetű nitrogénjének alkylálására jelentkeznének (29), és a desoxyriboz-kötés felszakadása okozná a molekula maradékának a törését (34).

Mindezen eredmények alapján érthetetlen, hogy az alkyláló vegyületek miért nem képesek rendellenességeket kiváltani, ha a chromosomákra a G_1 és G_2 fázisokban hatnak.

Jelenleg elég általánosan elfogadott az a felfogás az alkyláló vegyületek hatásának minőségi jellegzetességéről, hogy egyedül chromatida-típusú rendellenességeket képesek kiváltani. Mi azonban kimutattuk (35, 36, 37), hogy a hagyma gyökerének sejtjeiben, amelyben chromosoma rendellenességek nem késleltetett mutációs folyamattal természetes körülmények között is fellépnek, az alkyláló vegyületek képesek a G_1 fázisban töréseket okozni. Itt azonban a vizsgálati anyagnak az a sajátossága, hogy természetes körülmények között is fellépnek chromosoma rendellenességek, a képet bonyolította.

Összegezve az előbbieket, napjainkban elfogadott az a nézet, hogy az alkyláló vegyületek csak chromatida átrendeződéseket idéznek elő, amikor a chromosomára a DNS szintézis idején közvetlenül hatnak, vagy a már előzőleg képződött potenciális változások utóhatásaként ebben a fázisban realizálódnak.

KIHLMAN, az alkyláló vegyületek hatására bekövetkező késleltetett mutagenezis elméletének megalapítója egyik újabb közleményében (11) azt írja, hogy „ezek a vegyületek csak chromatida típusú átrendeződéseket idéznek elő, amelyek kizárólagosan a DNS szintézis fázisában levő sejtekben jelentkeznek". Emellett KIHLMAN lehetségesnek tartja, hogy a mutagén rejtett változásokat idézhet elő a G_1 fázisban. SIDOROV, SOKOLOV és ANDREEV (8) a mutagénnek a sejtekben hosszasan hatékonyan megmaradásának feltételezéséből kiindulva még tovább mennek és úgy vélik, hogy egyedül a DNS szintézisnek a fázisa az, amelyre az alkyláló vegyületek kezeléskor hatnak és amelyekben a chromosoma átrendeződések képződnek. A rejtett változás bekövetkezésé-

nek lehetőségét ők kizárják, egybevetve az alkyláló vegyületek hatását a bázis analógoknak a DNS-be beépülésével, annak szintézise folyamán.

E nézetekkel kapcsolatban igen érdekesek a *Crepis capillaris* száraz magvainak ethylénimin kezelésével végzett kísérletek.

NEMTSOVA (38) már korábban kimutatta, hogy a *C. capillaris* száraz magvainak besugárzásakor az összes rendellenesség chromosomalis jellegű, tehát a nyugvó magban minden sejt a G_1 fázisban volt. Nagyon érdekesnek ígérkezett az ilyen sejtpopulációra alkyláló vegyülettel hatni, amit ANDREEV, SIDOROV és SOKOLOV (8, 39) végeztek el. Az eredmény elég nyilvánvaló volt, bármely rögzítési időben mindig csak chromatida jellegű aberrációt figyeltek meg (1. táblázat). A szerzők következtetése szerint „a késleltetett hatású mutagénnek (ethylenimin) a ciklus fázisainak csak az egyikében, mégpedig a chromosoma replikálódásával egy időben hatnak", és a mutagén tartós fennmaradásának megállapított ténye kizárja egyes szerzőknek az osztódó sejtekben rejtett változások keletkezésére vonatkozó feltételezését (39).

1. táblázat

Az ethylenimin hatása a *Crepis capillaris* száraz magvaira; ANDREEV, SIDOROV és SOKOLOV [38] nyomán

Rögzítés ideje, óra	Vizsgált sejtek száma	Chromatida átrendeződések	
		száma	%
2	554	36	6,50 ± 1,05
8	672	23	3,42 ± 0,70
12	1018	88	8,64 ± 0,88
16	1000	38	3,80 ± 0,61

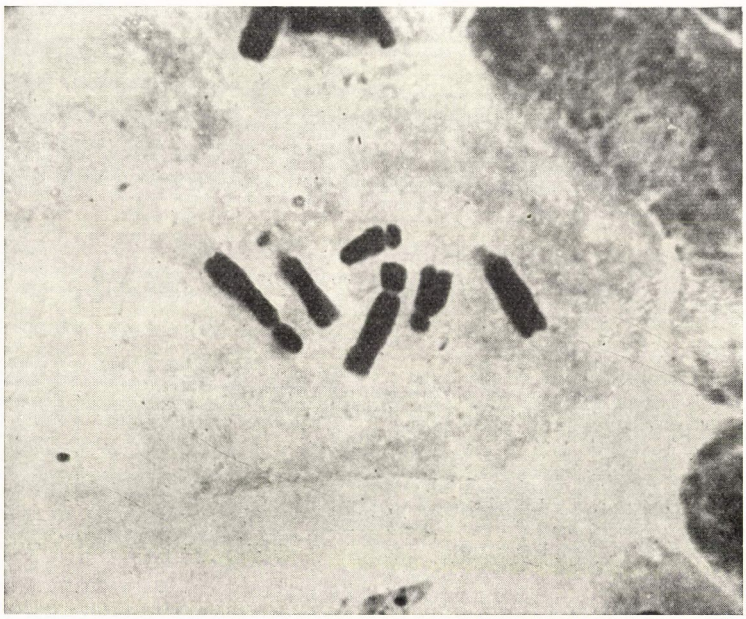
Ezt a nézetet már korábban megvitattuk (5), mégis további tényekre volt szükség, amelyek vagy véglegesen megerősítik az alkyláló vegyületek hatásának előbbiekben ismertetett sajátosságát, vagy pedig felfedik azokat a körülményeket, amelyek mellett ezek chromosoma mutációkat okozhatnak a DNS szintézisétől függetlenül. Erre vonatkozó adatainkat itt közöljük, melyek a vizsgált kérdésnek új megvilágítását is nyújtják.

Anyag és módszer

Kísérleteinkhez *Crepis capillaris* száraz magvait kezeltük két alkyláló vegyülettel, éspedig 0,04M ethylmethansulfonattal (EMS) és $2{,}3 \times 10^{-3}$ illetve $2{,}3 \times 10^{-2}$M ethyleniminnel (EI), valamint a radiomimetikus maleinhydrazid (MH) 0,001M oldatával. A magvak 3 órás mutagén kezelés után desztillált vízzel voltak gondosan lemosva, és petricsészében 0,05%-os colchicin oldattal átitatott szűrőpapírra helyezve. A gyökér növekedésének legkoraibb szakaszá-

ban, amikor az első mitosisok megjelentek, történt az első rögzítés, a továbbiak pedig különböző időpontokban, néhány esetben még 80—100 órával is a kezelés után.

A *Crepis capillaris* sejtjeiben a morphologiailag egyedenként könnyen azonosítható három chromosoma párt először NAVASCHIN (40) írta le: ezt a 6 chromosomás diploid szerelvényt (AA, CC, DD) a 1. ábra mutatja be.



1. ábra. Crepis capillaris diploid chromosoma szerelvényében azonosítható három chromosoma pár (AA, CC, DD)

A chromosoma átrendeződések megállapítása metaphasisban történt ecetsavas carminos készítményekben. A növekedő gyökerek colchicines kezelése következtében az összes diploid sejt a mutagénnel kezelés után első osztódási ciklusban volt.

Kísérleti eredmények

A) *Természetes mutációs folyamat*

A *Crepis capillaris* friss magvaiban a természetes mutációs folyamat a késleltetett mutagenesis típusa szerint megy végbe. A friss magvakban chromatida jellegű változások jelentkeznek, melyeknek gyakorisága sejtenként 1%-nál kisebb. Azonban a magvak öregedése folyamán, általában egy év múlva, a mutációk gyakorisága emelkedik, és chromosoma jellegű mutációk is kezdenek fellépni. Kísérleteink első sorozatát körülbelül 1 évig tárolt magvakkal végez-

2. táblázat

Természetes mutációk a *Crepis capillaris*ban

	Metaphasis	Ártendeződések	Átrendeződések	Átrendeződés tipusok						Chromosoma átrendeződések	
				Isolocusok	Mikrofragmentumok	Chromatida deletiok	Dicentrikus	Szimmetrikusan kicserélődött	Inverziós		
	száma		%	chromosomák						száma	%
Tárolt magvak (egy éves)	8375	81	0,96	36	4	16	15	8	2	25	0,29
Friss magvak (két hónapos)	7521	11	0,14	4	—	7	—	—	—	—	—

tük, míg a másodikat a magvak begyűjtése után két hónapig tároltakkal. Az eredményeket a 2. táblázat mutatja be.

B) *Kísérletek az ethylmethansulfonatnak száraz magvakra gyakorolt mutagén hatására*

Az EMS igen erős mutagén hatékonyságának a felfedezése az utóbbi idők egyik igen jelentős eseménye. Az EMS alkyláló vegyület és az alkylalkán-sulfonátok csoportjába tartozik; képlete $C_2H_5OSO_2CH_3$, azaz monofunkcionális methyl és ethyl csoportot tartalmaz.

Az EMS erős mutagén hatását 1957-ben a *Drosophila*-ra FAHMY és FAHMY (41), a *Neurospora*-ra KOLMARK (42) mutatta ki; majd ugyanezt a hatást megállapították baktériumokra és phagokra (43, 44), árpára (16, 17, 18), kukoricára (19), egérre (21) és egyéb szervezetekre is. Az EMS chromosoma átrendeződését kiváltó mutagén hatékonyságát MOUTSCHEN és MOUTSCHEN—DAHMEN (45), RIEGER és MICHAELIS (46) és FAVERT (17) tanulmányozták. E kísérletek eredményei ellentmondóak voltak; így FAVERT nem talált EMS hatásra megváltozást a chromosomákban. De a későbbi kísérletek (46, 48, 49) tisztázták a helyzetet. Kiderült, hogy az EMS-nek gyenge a chromosoma rendellenességeket kiváltó mutagén hatása, ha azonban a sejtek előzőleg Cu^{++}, Zn^{++}, vagy egyéb anyagok ionjaival voltak kezelve a thiol vegyületek gátlására, és ha a kezelés megfelelő pH mellett történt, akkor a chromosoma átrendeződések gyakorisága lényegesen megnövekedett.

A mutagén hatására bekövetkező sérülést helyreállító rendszer károsodásával összefüggő néhány kérdés vizsgálatára Cu^{++} oldatban (0,03 mg/100 ml Cu_2So_4) előáztatott *C. capillaris* magvakat 3 órán át kezeltük 0,04M EMS oldattal. E kísérletek eredményei meglepőek voltak (3. táblázat).

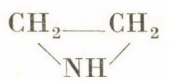
A mitosisba lépő első sejtek nagy, 12,2%-os mutabilitást mutattak és a 40 észlelt átrendeződés közül 27 típusos chromosomalis változás volt. Az összes vizs-

gált metaphasis közül 8,2%-ban volt chromosoma mutáció, amelyek a G_1 fázis folyamán jelentkeztek. A kontrollban a chromosoma mutációk gyakorisága csak 0,29%. EMS hatására kialakult dicentrikus chromosomákat a 2. ábra mutatja be.

Eszerint ez a kép egészen különbözik attól, amikor az összes átrendeződés chromatida típusú.

C) *Kísérletek az ethyleniminnek száraz magvakra gyakorolt hatására*

Az EI mutagén hatását 1948-ban RAPOPORT (50) mutatta ki *Drosophila* kísérleteiben, chromosoma rendellenességet kiváltó képességét pedig SCHKVARNIKOV (51). Az EI, melynek szerkezeti képlete



monofunkcionális alkyláló vegyület, és napjainkban elterjedten használt a kémiai mutagenesis vizsgálatában.

$2{,}3 \times 10^{-3}$M EI-nel kezelt száraz magvakkal végzett kísérletek eredményeit a 4. táblázat mutatja be.

Eszerint, miként az EMS kezeléskor is, az EI hatására chromosoma típusú rendellenességek léptek fel 0,9%-os gyakorisággal. Ilyen chromosoma mutációkat mutat be a 3a és 3b ábra.

Az EI nagyobb, $2{,}3 \times 10^{-2}$M koncentrációja erősen késleltette az első mitosisok bekövetkezését, ezek 31 óra helyett csak 52 óra múlva jelentkeztek. A teljes mutációs arány igen magasnak bizonyult, elérte az 55,6%-ot (5. táblázat).

A chromatida jellegű rendellenességek aránya nagyobb mértékben emelkedett, mint a chromosoma jellegű mutációké. A chromatida átrendeződések között megfigyeltünk több-találatos mutációt is (4. ábra).

A chromatida kicserélődések száma viszonylag növekedett, míg a chromatida deletiok száma kétszeresével csökkent. A chromosoma mutációk relatív arányának a növekedése az abszolút értékek szerint nyilvánvaló, mégis ez a chromatida átrendeződések számának gyarapodása mögött elmaradt. A táblázat adataiból kitűnik, hogy a chromosoma átrendeződéseknek 5,6%-a chromosoma-jellegű változás volt; így dicentrikusak fragmentummal, szimmetrikus kicserélődések, invertálódások (5a és 5b ábrák).

Mindent egybevetve a teljes mutációknak dózistól függése bonyolult kérdés, aminek megoldását az egyes szerzők különböző utakon kísérelik meg (52).

a)

b)

2. ábra. Chromosoma átrendeződések a száraz magvak G_1 fázisban levő sejtjeinek ethylmethansulfonattal kezelésének hatására

a) Aszimmetriás kicserélődés a két D chromosoma között; egy dicentrikus és egy chromosoma-fragmentum pár (nyilak)

b) Aszimmetriás kicserélődés az A és D chromosoma között; a D chromosoma disztális része az A chromosoma rövid karjával egyesült (nyíl)

3. táblázat

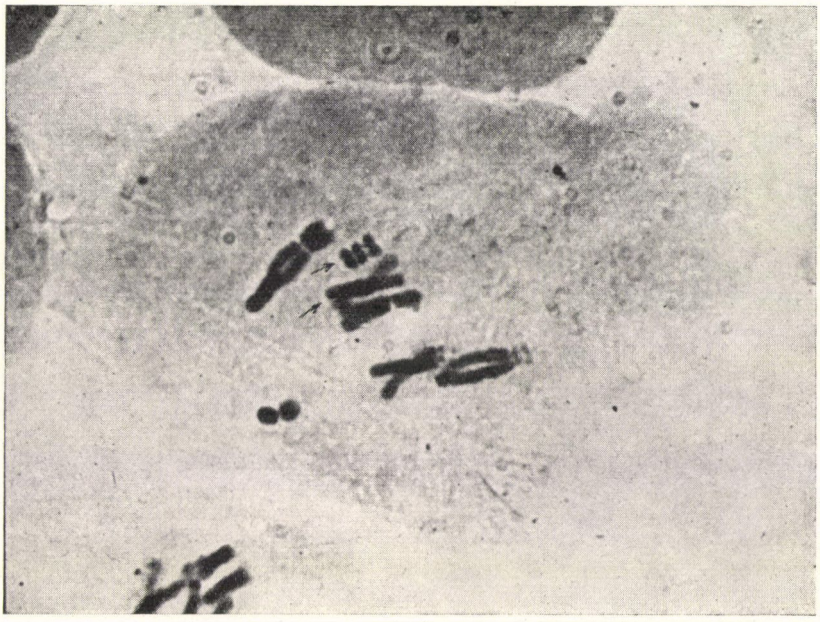
Ethylmethansulfonat hatása a *Crepis capillaris* száraz magvaira

Rögzítés ideje a növekedés kezdetétől	Metaphasisok száma	Átrendeződést mutató sejtek száma	Átrendeződések száma	Átrendeződések, %	Átrendeződések természetes mutációk nélkül, %	Isolocusok	Mikrofragmentumok	Chromatida			Chromosoma			Összes chromosoma átrendeződés a vizsgált metaphasisok %-ában		t	p
								Deletiók	Aszimmetriás kicserélődések	Szimmetriás kicserélődések	Aszimmetriás kicserélődések	Szimmetriás kicserélődések	Invertálások	Összesen	Természetes mutációk nélkül		
0	327	39	40	12,2	11,2	11	0	2	0	0	13	12	2	8,2	$7,9 \pm 1,45$	5,4	$< 0,001$
13	1453	41	41	2,7	1,74	16	1	12	7	1	3	1	0	0,27		—	—
27	618	18	18	2,9	2,0	5	0	5	2	2	2	1	0	0,48	0,19	0,68	$> 0,05$

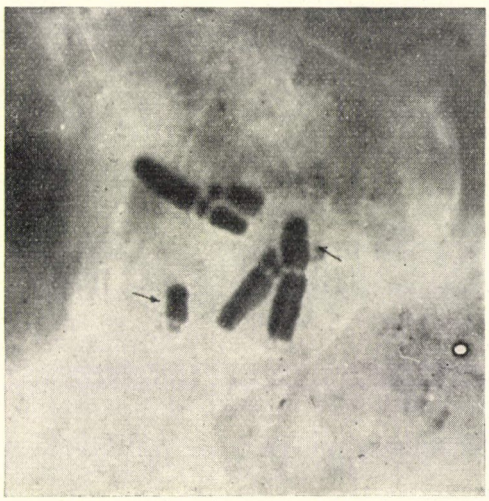
4. táblázat

Az ethylenimin hatása a *Crepis capillaris* száraz magvaira

Rögzítés ideje a növekedés kezdetétől	Metaphasisok száma	Átrendeződést mutató sejtek száma	Átrendeződések száma	Átrendeződések, %	Átrendeződések természetes mutációk nélkül, %	Isolocusok	Mikrofragmentumok	Chromatida						Chromosoma					Összes chromosoma átrendeződés a vizsgált metaphasisok %-ában		t	p
								Deletiók	Aszimmetriás kicserélődések	Szimmetriás kicserélődések	Triradialisok	Interstitialis deletiók	Gyűrűk	Dicentrikusok	Szimmetriás kicserélődések	Invertálások	Gyűrűk	Összes chromosoma átrendeződés	Összesen	Természetes mutációk nélkül		
0—38	11 949	491	524	4,4	3,44	1,87	12	150	47	16	1	2	2	60	45	1	1	107	0,90	$0,61 \pm 0,14$	7,1	$< 0,001$



a)

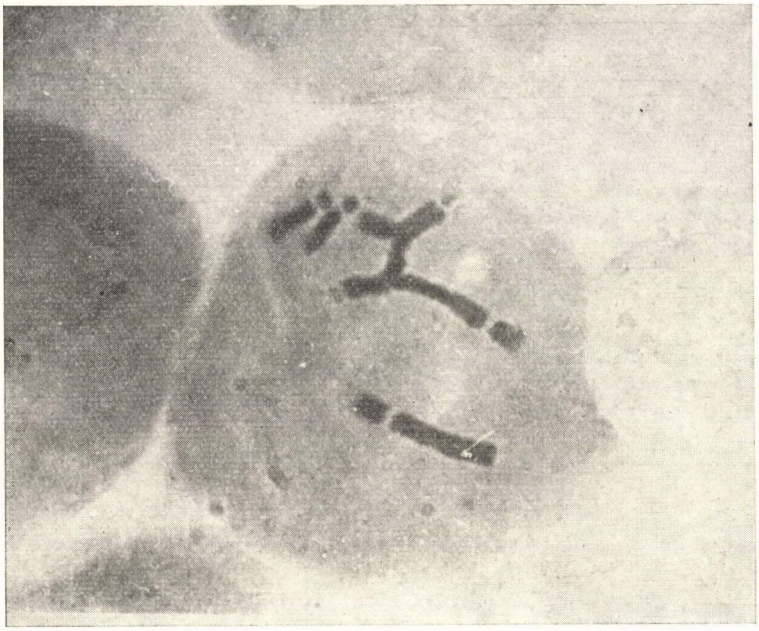


b)

3. ábra. Chromosoma átrendeződések a száraz magvak G_1 fázisban levő sejtjeinek $2{,}3 \times 10^{-3}$ M ethyleniminnel kezelésének hatására

a) Aszimmetriás kicserélődés a két C chromosoma között; a chromosoma rövid karjaiból kialakult dicentrikus és egy nagy chromosoma-fragmentum pár (nyilak). Ezenkívül egy megrövidült A chromosoma és egy töredék pár az A chromosomában történt isolocus törés következményeként

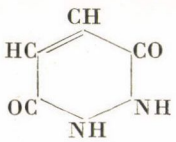
b) Szimmetriás kicserélődés az A és D chromosoma között; az A chromosoma rövid karja a D chromosoma darabjának áthelyeződésével erősen meghosszabbodott, az utóbbi megrövidült (nyilak)



4. ábra. Hármas chromatida jellegű kicserélődés a két D és az A chromosoma között

D) *Kísérletek a maleinhydrazid száraz magvakra gyakorolt mutagénhatásáról*

A MH egyike azon radiomimetikus vegyületeknek, amelyeket napjainkban chromosoma rendellenességek kiváltására általánosan használnak. Szerkezeti képlete:



Miként az alkyláló vegyületek, úgy ez is az aktív anyagcsereállapotú sejteknél késleltetett hatást mutat, és kizárólag chromatida jellegű átrendeződéseket okoz.

A MH 0,001M oldatával kezelt száraz magvakkal végzett kísérletek eredményeit a 6. táblázat összesíti.

A mutabilitás ebben az esetben viszonylag alacsony, csak 4,14% és a kezelés utáni 49-ik órára már leesik 1,5%-ra. Tehát a MH, amit bázisanalóggal szoktak összehasonlítani feltételezve azt, hogy a DNS szintézisekor hat, képes a száraz magvakban a G_1 fázisban chromosoma törést előidézni, és chromosomajellegű rendellenességeket okozni; így kiváltott chromosoma mutációkat a 6a és 6b ábrák mutatnak be.

5. táblázat

Az ethylenimin ($2{,}3 \times 10^{-2}$ M) hatása a *Crepis capillaris* a diploid sejtek első mitosisban történt 3 órás kezelésekor

Rögzítés ideje a növekedés kezdetétől	Metaphasisok száma	Átrendeződést mutató sejtek száma	Átrendeződések száma	Átrendeződések, %	Átrendeződések természetes mutációk nélkül, %	Isolocusok	Mikrofragmentumok	Chromatida: Deletiók	Chromatida: Aszimmetriás kicserélődések	Chromatida: Szimmetriás kicserélődések	Chromatida: Triradialisok	Chromatida: Interstitialis deletiók	Chromatida: Gyűrűk	Chromatida: Hármas kicserélődések	Chromosoma: Dicentrikusok	Chromosoma: Szimmetriás kicserélődések	Chromosoma: Invertálások	Összes chromosoma átrendeződés a vizsgált metaphasisok %-ában: Összesen	Összes chromosoma átrendeződés a vizsgált metaphasisok %-ában: Természetes mutációk nélkül	t	p
0—47	370	160	206	55,6	54,64	85	9	29	41	10	2	6	2	1	12	8	1	5,6	$5{,}31 \pm 1{,}3$	4,2	$< 0{,}001$

6. táblázat

A maleinhydrazid (0,001 M) hatása a *Crepis capillaris* száraz magvaira

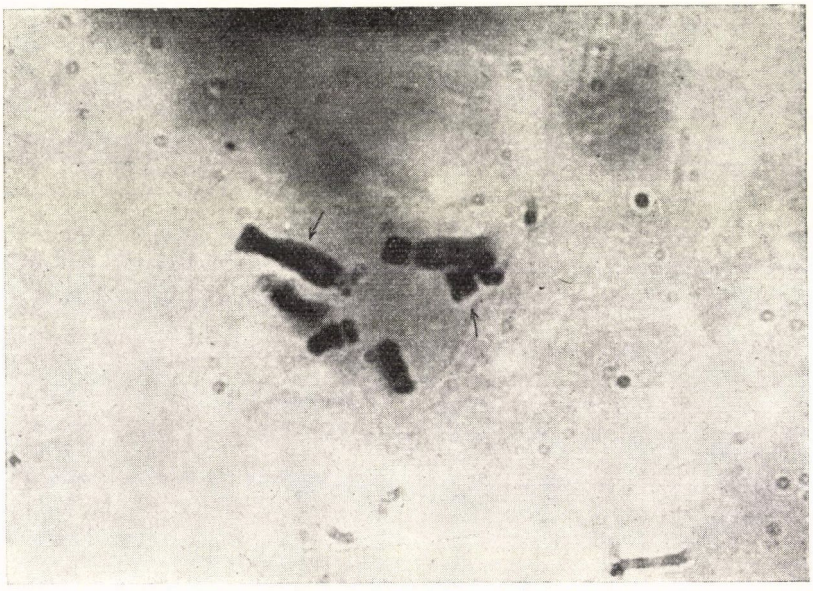
Rögzítés ideje a növekedés kezdetétől	Metaphasisok száma	Átrendeződést mutató sejtek száma	Átrendeződések száma	Átrendeződések, %	Átrendeződések természetes mutációk nélkül, %	Isolocusok	Mikrofragmentumok	Chromatida: Deletiók	Chromatida: Aszimmetriás kicserélődések	Chromatida: Szimmetriás kicserélődések	Chromosoma: Gyűrűk	Chromosoma: Aszimmetriás kicserélődések	Chromosoma: Szimmetriás kicserélődések	Összes chromosoma átrendeződés a vizsgált metaphasisok %-ában: Összesen	Összes chromosoma átrendeződés a vizsgált metaphasisok %-ában: Természetes mutációk nélkül	t	p
0	1114	42	42	4,14	3,18	16	6	4	0	0	1	8	7	1,3	$1{,}01 \pm 0{,}38$	2,6	$< 0{,}01$
2—9—20	1585	24	24	1,5	0,54	9	2	6	1	1	0	3	2	0,3	0,0	—	—

7. táblázat

Az ethylenimin ($2{,}3 \times 10^{-2}$ M) hatása a *Crepis capillaris* „késleltetett" természetes mutációval jellemzett száraz magvaira a diploid sejtek első mitosisban történt 3 órás kezelésekor

Rögzítés ideje a növekedés kezdetétől	Metaphasisok száma	Átrendeződést mutató sejtek száma	Átrendeződések száma	Átrendeződések, %	Átrendeződések természetes mutációk nélkül, %	Isolocusok	Mikrofragmentumok	Deletiók	Chromatida: Aszimmetriás kicserélődések	Chromatida: Szimmetriás kicserélődések	Chromatida: Triradialisok	Chromatida: Interstitialis deletiók	Chromatida: Hármas kicserélődések	Chromatida: Gyűrűk	Chromosoma: Dicentrikusok	Chromosoma: Szimmetrikus kicserélődések	Chromosoma: Invertálások	Összes chromosoma átrendeződés a vizsgált metaphasisok %-ában: Összesen	Összes chromosoma átrendeződés a vizsgált metaphasisok %-ában: Természetes mutációk nélkül	t	p
0—70	4693	1482	1778	37,8	37,7	790	58	234	306	95	14	35	4	1	133	94	14	241	$5{,}13 \pm 0{,}32$	13,6	$< 0{,}001$

a)

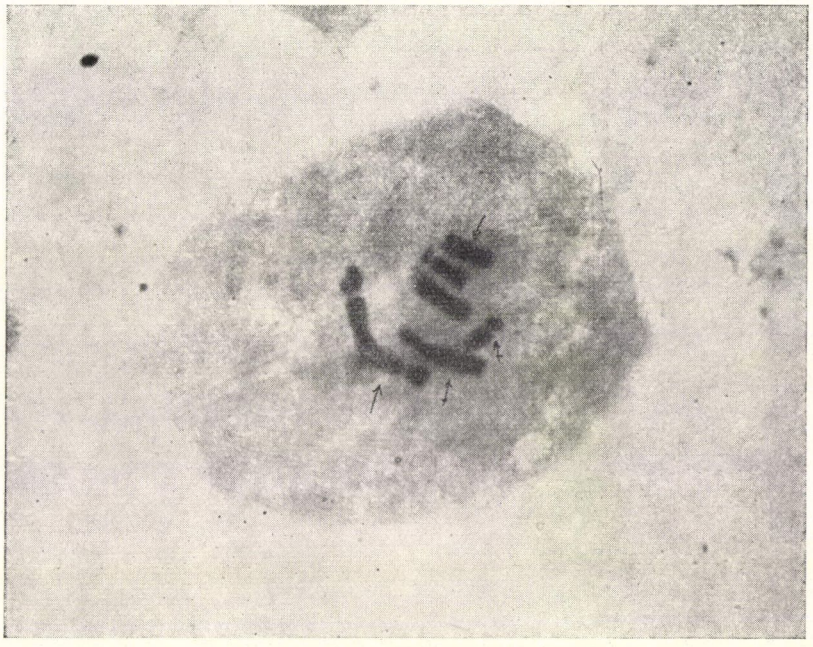


b)

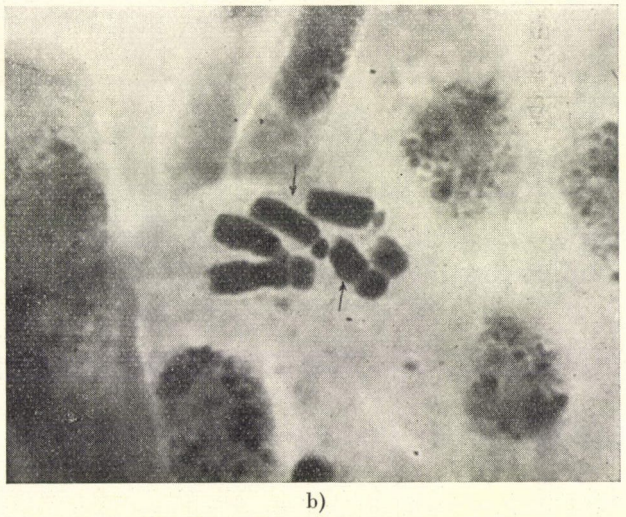
5. ábra. Chromosoma átrendeződések a száraz magvak G_1 fázisban levő sejtjeinek $2{,}3 \times 10^{-2}$ M ethyleniminnel kezelésének hatására

a) Aszimmetriás kicserélődés a C és D chromosoma között; egy dicentrikus és egy chromosoma-fragmentum pár (nyilak)

b) Szimmetriás kicserélődés az A és D chromosoma között; a D chromosoma erősen meghosszabbodott, az A chromosoma disztális végének elvesztésével megrövidült (nyilak)



a)



b)

6. ábra. Chromosoma átrendeződések a száraz magvak G_1 fázisban levő sejtjeinek maleinhydraziddal kezelésének hatására.

a) Aszimmetriás kicserélődés a két chromosoma között és egy chromosoma-fragmentum pár (nyilak). Ugyanitt a C és D chromosoma kicserélődésével kialakult dicentrikus és egy második nagy fragmentum pár (áthúzott nyilak), ezenkívül az AA dicentrikus rövid karjának egyik chromatidájának törésével egy chromatida jellegű rendellenesség is van, a chromatida töredék a dicentrikus közepe mellett fekszik

b) Szimmetriás kicserélődés az A és C chromosoma között; az A chromosoma darabjának áthelyeződésével a C chromosoma meghosszabbodott (nyilak)

Ezen eredmények alapján igen érdekesnek ígérkezett a *Crepis* 1966-ban begyűjtött, friss magvaival is kísérletet beállítani; ezekre a magvakra jellemző kell legyen a „késleltetett" természetes mutáció, ha az összes létrejövő átrendeződés chromatida jellegű. Valóban a kísérletben fellépett összes rendellenesség mind chromatida jellegű volt.

Az alkyláló vegyületeknek száraz magvakban chromosoma mutációt kiváltó képességére világos kép adódott az EI erős koncentrációjának (egészen 2,3 $\times$ 10^{-2}M-ig) alkalmazásakor (7. táblázat), amikor 241 chromosoma átrendeződést lehetett találni (7a és 7b ábra), ami 5,13%-ot tesz ki.

E) *Száraz magvakkal végzett kísérletek általános eredményei*

Az EMS, EI és MH száraz magvakra gyakorolt hatására beállított kísérletek legfontosabb eredménye annak a ténynek a megállapítása, hogy mind a három vegyület képes meghatározott intracelluláris feltételek mellett a G_1 fázisban a chromosomákra hatni és átrendeződéseket előidézni. A sérülések legtöbbje mint chromatida jellegű rendellenesség nyilvánul meg (8a, 8b és 8c ábrák).

Felmerül a kérdés, hogy az alkyláló és egyéb hasonlóan ható vegyületek hatására a száraz magvakban miért alakulnak ki chromosoma átrendeződések, és miért nem, ha csíranövények voltak kezelve. Száraz magvakban minden sejt a G_1 fázisban van, ami lehetővé teszi, hogy az erre ható mutagének chromosoma rendellenességeket váltsanak ki. A csíranövényekben azonban nem-szinkronizált sejtpopuláció van, a sejtek egy része a G_1 fázisban, egy másik része az S, míg a többi a G_2 fázisban van. Mi a G_1 és S sejtek aránya, mely utóbbiakra az alkyláló vegyületek szintén hatnak? G. P. MAKEDONOV H^3-thymidines kísérletének (még nem közölt) adatai szerint a *C. capillaris* csíranövényekben, 2,3 $\times$ 10^{-3}M EI hatására a colchicin oldatban növekedéskor a G_1+ M tartama 6,9 óra, az S fázisé 5,6 és a G_2+ prophasis 5,2 óra. Ez azt mutatja, hogy ha az alkyláló vegyületek a csíranövényekben chromosoma átrendeződéseket váltanak ki, úgy az kétszer kevesebb lesz, mint amikor nyugvó állapotú magvakra hatnak. Ezt tehát figyelembe kell venni, ha a mutagéneknek a nyugvó magvak és a csíranövények sejtjeire gyakorolt hatását értékeljük.

Azonban ezen adatok alapján mégsem magyarázható meg az a különbség, amit jelenleg a magvak és a csíranövények mutagenesisénél tapasztaltunk. Ugyanis, ha a csíranövényekben aktív anyagcseréjű és nem-szinkronizált sejtpopulációra hatnak az alkyláló vegyületek, chromosoma rendellenességet egyáltalán nem lehetett találni.

a)

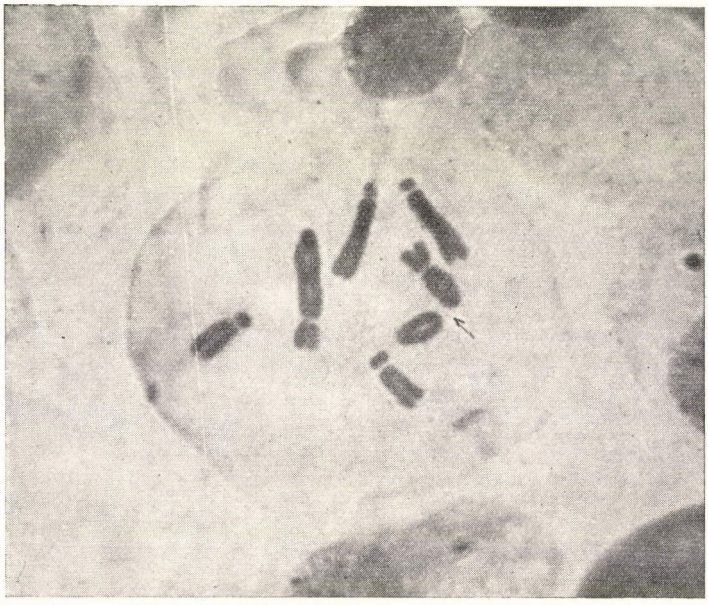
b)

7. *ábra.* Chromosoma átrendeződések a „késleltetett" természetes mutációval jellemzett száraz magvak $2{,}3 \times 10^{-2}$ M ethyleniminnel kezelésének hatására

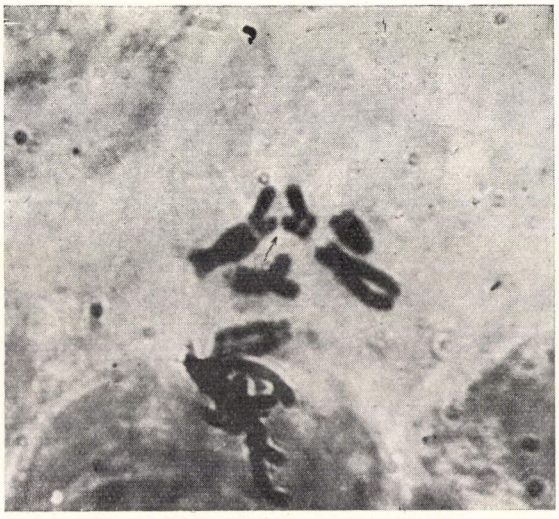
a) Aszimmetriás kicserélődés a két A chromosoma között; egy dicentrikus és egy chromosoma-fragmentum pár (nyilak)

b) Összetett szimmetriás kicserélődés a két A és C chromosoma között; egy nagy A chromosoma alakult ki, a másik A és csaknem az egész C chromosoma áthelyeződésével, jól látszanak a C chromosomák rövid karjának mikrofragmentumai (nyíl) és a megrövidült A chromosoma

a)



b)



c)

8. ábra. Chromatida jellegű átrendeződések és egy isolocus törés a száraz magvak G_1 fázisban levő sejtjeinek alkyláló vegyülettel kezelésének hatására
a) Chromatida részkieséss a D chromosoma disztális végén (nyíl)
b) Isolocus törés; láthatók az egyesült proximális töredékek (nyíl) és egy egyesült disztális töredék
c) Chromatida jellegű kicserélődés a C chromosoma és az A chromosoma rövid karja között (nyíl)

Megbeszélés

Eredményeink arra utalnak, hogy az az általánosan elfogadott felfogás, amely szerint az alkyláló vegyületek minden körülmény között csak chromatida jellegű átrendeződéseket képesek kiváltani, nem helytálló. Ilyen egyoldalú nézet azért alakulhatott ki, mert eddig az alkyláló vegyületek hatását csak élénk anyagcsere állapotú sejtekben tanulmányozták. Kísérleteink kimutatták, hogy az alkyláló vegyületek hatására a G_1 fázisban chromosoma sérülés következik be, ami bizonyos számú chromosoma jellegű átrendeződés képzéséhez vezet. Most még nem tudjuk megadni a biokémiai vagy fizikokémiai magyarázatát azoknak az intracelluláris különbségeknek, amelyeket az anyagcsere különböző szintjei határoznak meg. Valószínű, hogy a rejtett károsodás rögzülésének ideje különböző feltételek mellett nem azonos. Ez a potenciális sérülés a csíranövény sejtjeiben oly hosszan megmaradhat, hogy az összes rejtett változás az *S* fázisig eljut, és abban mint chromatida jellegű átrendeződés realizálódik. Másrészt a magvakban az *S* fázis kezdete a mutagénnel kezelés idejétől olyannyira eltolódik, hogy ezért a chromosoma átrendeződések korábban, már a G_1 fázison belül megjelennek.

Az élénk anyagcsere-állapotú sejtekben egy igen aktívan működő helyreállító rendszer vehet részt ezekben a jelenségekben, ami miatt a sérülés rögzü-

lésének ideje késlekedik, és így a potenciáli schromosoma változásból chromatida deletionak a képződését teszi lehetővé. Egészen nyilvánvaló, hogy nemcsak egyedül a száraz magvakban, hanem anyagcsere sajátságaikban különböző egyéb növényi és állati sejtrendszerekben is az alkyláló vegyületek hatására a G_1 fázisban chromosoma sérüléseknek és chromosoma átrendeződések képződésének kell mutatkoznia.

Eredményeinkből világosan kitűnik, hogy az alkyláló vegyületek a G_1 fázisban hatnak a chromosomára. A sejten belüli körülményektől függően vagy chromatida jellegű aberrációkat idéznek elő (csíranövények és állatok élénk anyagcseréjű sejtjeiben), vagy egyaránt chromatida és chromosoma jellegű átrendeződéseket (száraz magvakban és valószínűleg egyéb, csökkent anyagcseréjű sejtekben is).

További vizsgálat szükséges, hogy az élénk anyagcseréjű sejtek G_2 fázisában az alkyláló vegyületek miért nem hatnak, és majd kiderül, hogy vannak-e olyan intracelluláris körülmények ebben a fázisban is, amikor az alkyláló vegyületek hatására a chromosomák károsodhatnak.

Kihlman (1) és több újabb szerző szerint az alkyláló vegyületeknek a chromosoma átrendeződések kiváltásánál megnyilvánuló sajátossága, hogy a mutagén a G_2 fázisban hatástalan és hogy minden chromosoma változás az S fázisban nyilvánul meg. Sidorov, Sokolov és Andreev (53) arra a következtetésre jutottak, hogy a késleltetett hatású alkyláló mutagének közvetlenül a chromosoma kettőződésére hatnak, a DNS precursorokat megváltoztatva, de hatásuk csak az S fázisban nyilvánul meg.

A kísérleti tények alapján azonban egy másik nézetet kell elfogadnunk, amely szerint az alkyláló vegyületek a sejtciklus bármelyik fázisában hatnak a DNS molekula-szerkezetére, e hatás megnyilvánulása azonban a sejten belüli feltételektől függ. A késleltetett mutagenesis, amikor a mutagén a G_2 fázisban a chromosomákra nem hat, és minden átrendeződés csak az S fázisban nyilvánul meg, az élénk anyagcseréjű sejttípusra jellemző. Az a tény, hogy száraz magvak kezelésére, amikor minden sejt G_1 fázisban van, mind chromosoma, mind chromatida jellegű átrendeződés fellép, arra utal, hogy a mutagén először potenciális változásokat idéz elő, amelyek közül egyesek a G_1 fázisban mint chromosoma átrendeződések nyilvánulnak meg, míg mások az S fázisban mint chromatida változások.

Az eredmények alapján érthetővé válik az a tény, hogy az alkyláló vegyületek hatására valódi génmutációk lépnek fel a *Drosophila* (13, 14, 15), vagy az egér spermiumában (21), a *Chlorella* sejtekben (54), stb. Az alkyláló vegyületek hatásának az elve ezekben az esetekben megegyezik azzal, ami száraz magvak kezelésekor a chromosoma átrendeződések kiváltásánál kaptunk. Így tehát, legalábbis az élő sejtekre vonatkozóan, eléggé igazolható az alkyláló vegyületeknek DNS molekulára gyakorolt kémiai hatásának az elve, ami nem függ szükségszerűen a DNS autoreprodukáló képességétől.

Az alkyláló vegyületeknek a gyenge anyagcseréjű sejtekre (száraz magvak) gyakorolt hatásának ez az újonnan felfedezett elve kétségtelenül általános jellegű, és nem csupán a *Crepis capillaris* magjaira korlátozódó. RAMANNA és NATARAJAN (55) közölték 1965-ben, hogy három alkylalkansulfonát típusú vegyület, éspedig ethylmethansulfonat, methylethansulfonat (MES) és Myleran árpaszemekre hatásával chromatida és chromosoma jellegű átrendeződéseket figyeltek meg. Majd RAO és NATARAJAN (56) a MES, n-propylmethansulfonat és n-butylmethansulfonát mutagén hatásának qualitativ jellemzését adták meg, és kimutatták a dicentrikus chromosomák jelenlétét is. Ugyanezt találták MOUTSCHEN és DEGRAEVE is (57). Azonban az összes említett munkában e tények elvi jelentőséget nem nyertek, mivel a szerzők kísérleteikben az alkylalkansulfonátok csoportján belül maradtak. Mi kísérleteinkben az EMS hatás mellett az ethylenimin és maleinhydrazid hatását is vizsgáltuk, mely utóbbi hatásmechanizmusát gyakran szokták a bázisanalógokéval hasonlónak tekinteni. Tehát a *Crepis* és az árpa magvai az alkyláló vegyületekre hasonlóan reagálnak.

Az alkyláló vegyületek azon új hatásának a felfedezése, hogy bizonyos körülmények között képesek chromosoma-jellegű átrendeződéseket is kiváltani, további tág lehetőségeket nyújt ezen mutagén hatások sajátosságának és e hatásokat módosító okoknak széleskörű kísérletes vizsgálatához.

Kísérleteink alapján az ionizáló sugárzások és a kémiai mutagének mindenféle típusának hatására bekövetkező mutációs folyamat alapján egy elvileg egységes kép alakul ki, abból a feltételezésből kiindulva, hogy a DNS molekula e hatások célpontja. Mindezen esetekben függetlenül a hatás elsődleges vagy másodlagos jellegétől a DNS molekuláris szerkezetére történik a hatás és függetlenül attól, hogy az autoreprodukálásra képes-e vagy sem. Emellett a DNS szintézisének az ideje a mutagenesisnek egy sajátos típusú hátterét jelenti a megváltozott precursoroknak a képződő DNS molekulába beépülésével.

A mutagenesis jellegzetessége elvileg a különféle mutagén tényezők által a DNS molekula szerkezetében okozott sérülés kezdeti sajátosságában mutatkozó különbségekben rejlik. Az elsődleges chromosoma sérülések rejtett változási típusúak. A különböző típusú potenciális változások lefolyása függ a sejtciklus fázisától, amely alatt a potenciális változás időben és jellegében megnyilvánul, a helyreállító rendszer működésétől és egyéb intracellularis módosító tényezők hatásától. A kérdés ilyen megközelítésével a mutációs elmélet kutatásában napjainkban új fejlődési irányok bontakozhatnak ki.

Következtetések

1. Az alkyláló vegyületek mutagén hatásának mai elmélete nem mentes bizonyos belső ellentmondásoktól. Egyrészt a késleltetett mutagenesis képét találjuk a chromosoma átrendeződések kiváltásakor, mivel a mutagén a G_2

fázisra nem hat. A G_1 vagy S fázis kezelése után minden mutáció csak a DNS molekula szintézisének folyamán, az S fázisban nyilvánul meg, és egyedül chromatida jellegű átrendeződések keletkeznek. Azt tartják, hogy az alkyláló vegyületek nem képesek G_1 fázisban a chromosomák törésére, és ezért nem képződnek hatásukra chromosoma jellegű átrendeződések. Másrészről, számos szervezetben valódi génmutációk kiváltásakor kiderült, hogy ezek a nem-kettévált chromosomákban a DNS szintézisének S fázisban végbemenetele nélkül bekövetkezhetnek. A génmutációs eredményekkel megegyezően az alkyláló vegyületek mutagén hatása kémiai alapjainak vizsgálata kiderítette, hogy ez esetben a DNS molekula a célpont, függetlenül annak autoreprodukáló képességétől.

2. Az alkyláló vegyületek mutagén hatása vizsgálatában felmerült ilyen ellentmondásokat bizonyítékul lehetett tekinteni arra, hogy egyrészt a chromosoma átrendeződése, másrészt a génmutáció folyamatában bizonyos qualitativ különbségek vannak. Ezek bizonyos minőségi sajátosságokat is bizonyítanak (ugyanis csak az S fázis alatt volt a hatás megfigyelhető) a sugárzások és egyéb kémiai mutagénekhez viszonyítva, amelyek a sejtciklus minden fázisában megváltoztatják a chromosomákat.

3. Az alkyláló vegyületek specifikus hatása mellett szóló fontos érveket kaptunk a *Crepis capillaris* száraz magvainak kezelésével végzett kísérleteinkben, ahol az összes sejt a szintézist megelőző G_1 fázisban volt, és nem-kettévált chromosomákat tartalmazott. Az ilyen magvak ethyleniminnel kezelése után csak chromatida átrendeződéseket kaptunk, ami annak volt tulajdonítható, hogy a mutagén tartósan hatékonyan megmarad (8, 39), és így hatott a chromosomákra, amikor a növekedő gyökércsúcs sejtjei az S fázisba jutottak.

4. Három alkyláló vegyület, az ethylmethansulfonat, ethylenimin és maleinhydrazid hatására vonatkozó néhány újabb tényt állapítottunk meg. A metaphasisok vizsgálata kiderítette, hogy az alkyláló vegyületek és a maleinhydrazid a G_1 fázisban a chromosomákra hatva, chromosoma és chromatida jellegű átrendeződéseket egyaránt kiváltanak, ha a sejtekben csökkentett az anyagcsere (száraz magvak). A chromosoma átrendeződések minden fő típusát (dicentrikusak, szimmetrikus kicserélődések, átfordulások) megkaptuk. Friss magvaknál végzett kísérletekben, melyekben spontán csak chromatida átrendeződések képződnek 0,14%-os gyakorisággal, $2{,}3 \times 10^{-2}$ koncentráció hatására a chromatida megváltozások mellett 5,13%-os gyakorisággal chromosoma mutációkat is találtunk. A kb. 1 éves magvakban az ethylmethansulfonat 7,9%, $2{,}3 \times 10^{-3}$M ethylenimin 0,61% és $2{,}3 \times 10^{-2}$M koncentrációban 5,3% chromosoma mutációt váltott ki, míg a maleinhydrazidra 1,02% gyakoriságig léptek fel chromosoma jellegű mutációk.

5. Az eredmények arra az elvi lehetőségre utalnak, hogy a DNS molekula, függetlenül annak autoreprodukálásra képességétől, az ionizáló sugarak, alkyláló vegyületek és az egyéb kémiai mutagének hatásának a találati cél-

pontja. A DNS szintézis ideje egy sajátos típusú mutagenesisnek a színtere azáltal, hogy a megváltozott precursorok a DNS-t alkotó molekulába ekkor beépülnek és így a bázisanalógok hatása valóban a DNS szintéziséhez időzített. A különféle típusú ionizáló sugárzások hatásának a specifikussága összefügg azoknak a DNS molekula szerkezetére gyakorolt hatása kezdeti sajátosságával. Az egyes mutagén típusokra a DNS molekulában sajátosan bekövetkező potenciális változások menetét, továbbá a sejtciklus különböző szakaszaiban végbemenő biokémiai és egyéb sajátságokkal összefüggő folyamatok határozzák meg. A különféle mutagén tényezők hatására, valamint különböző sejtfeltételek mellett a rejtett változások különféle típusai alakulhatnak ki, a rejtett változások valódi mutációba átmenetének az ideje variálhat, és ugyanígy a potenciális változásokat a folyamatok módosítására képes sejten belüli egyéb körülmények is megváltoztathatják.

A sejten belüli feltételek sajátosságának a sérülés végső típusával összefüggésére igen szép példa az, amikor alkyláló vegyületek egyrészt csíranövényekre, másrészt száraz magvakra hatnak. Első esetben, erős anyagcsere állapotú sejtek feltételei mellett egy nem-szinkronizált sejtpopulációban csak chromatida jellegű átrendeződések jelentkeznek. Második esetben, amikor száraz magvakban szinkronizált és gyenge anyagcseréjű sejtekre történik a hatás, chromosoma és chromatida jellegű mutációkat egyaránt tartalmazó chromosomalis átrendeződések jelentkeznek.

E kérdések bonyolultsága vizsgálatának kétségtelenül nagy szerepe lesz a mutáció folyamata általános elméletének továbbfejlesztésében.

IRODALOM

1. Kihlman, B. A.: Biochemical aspects of chromosome breakage. Advan. Genet., **10,** 1—59 (1961).
2. Auerbach, C.: Chemically induced mosaicism in *Drosophila melanogaster*. Proc. Roy. Soc. Edinburgh, Ser B., **62,** 211—222 (1946).
3. Sobels, F. H.: Radiosensitivity and repair in different germ cell stages of *Drosophila*. Genetics Today, **2,** 235—255 (1963).
4. Kimball, R. F.: The induction of reparable premutational damage in *Paramecium aurelia* by the alkylating agent triethylene melamine. Mutation Res. **2,** 413—425 (1965).
5. Дубинин Н. П.: О некоторых узловых вопросах современной теории мутаций. Генетика, **7,** 3—20 (1966).
6. Froese-Gertzen, E. E., Konzak, C. F., Nilan, R. A. and Heiner, R. E.: The effect of ethyl methanesulfonate on the growth response, chromosome structure and mutation rate in barley. Rad. Botany. **4,** 61—69 (1964).
7. Kolmark, H. G., Kilbey, B. J.: An investigation into the mutagenic after-effect of Butadiene diepoxide using Neurospors crassa. Z. Vererbungslehre **93,** 356—365 (1962).
8. Сидоров Б. Н., Соколов Н. Н., Андреев В. С.: Мутагенный эффект этиленимина в ряде клеточных поколений. Генетика **1,** 113—122 (1963).
9. Green, D. M. and Krieg, D. R.: The delayed origin of mutants induced by exposure of extracellular phage T_4 to ethylmethane sulfonate. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., **47,** 64—72 (1961).
10. Auerbach, C., Robson, J. M.: Chemical production of mutations. Nature, **157,** 302 (1946).
11. Kihlman, B. A. and Odmark, G.: Deoxyribonucleic acid synthesis and the production of chromosomal aberrations by sterptonigrin, 8-ethoxycaffeine and 1,3,7,9-tetramethyluric acid. Mut. Res., **2,** 494—495 (1965).

12. Дубинин Н. П., Акифьев А. П., Полуновский В. А., Кондратьева И. Е.: Айнгорн Е. А. Исследование мутагенного последействия на синхронной популяции соматических клеток. Генетика (1967), в печати.
13. Рапопорт И. А.: Зависимость этилениминовых мутаций от дозы и стадии гаметогенеза. Бюлл. МОИП, сер. биол. 67, вып. **1,** 109 (1962).
14. Carlson, E. A., Oster, J. J.: Comparative mutagenesis of the dumpy locus in *Drosophila melanogaster*. II Mutational mosaicism induced without apparent breakage by a monofunctional alkylating agent. Genetics, **47,** 561—576 (1962).
15. Browning, L. S., Altenburg, E.: Gonadal mosaicism as a factor in determining the ratio of visible to lethal mutations in Drosophila. Genetics, **46,** 1317—1321 (1961).
16. Ehrenberg, L. Å., Gustafsson, U. Lundqvist: Viable mutations induced in barley by ionizing radiation and chemical mutagens. Hereditas, **47,** 243—282 (1961).
17. Favret, E. A.: Somatic mutations of four genes for albininism in barley induced by X-rays and ethyl methanesulfonate. Hereditas, **46,** 622—634 (1960).
18. Nilan, R. A.: The Cytology and Genetics of Barley 1951—1952. Washington State University Press, Pullman, Wash. (1964).
19. Amano, E., Smith, H. H.: Mutations induced by ethyl methanesulfonate in maize. Mut. Res., **2,** 344—351 (1965).
20. Westergaard, M.: Chemical mutagenesis in relation to the concept of the gene. Experientia, **13,** 224—234 (1957).
21. Cattanach, B. M.: Chemically induced mutations in mice. Mut. Res., **3,** 346—353 (1966).
22. Altenburg, E., Browning, L. S.: The relatively high frequency of whole-body mutation compared with fractionals induced by X-rays in *Drosophila* sperm. Genetics, **46,** 203—211 (1961).
23. Глембоцкий Я. Л., Абелева Э. А., Гроздова Т. Я., Мяснянкина Е. Н.: Мозаицизм на. следования у D. melanogaster сцепленных с полом рецессивных летальных мутаций-Сб. «Действие излучений на наследственность» М. Из-во «Наука» (1966).
24. Snyder, L. A.: Evidence of an essential difference between point mutations and chromosome breakage induced by triethylene melamine in *Drosophila* spermatozoa. Z. Vererbungslehre, **94,** 182—189 (1963).
25. Watson, W. A. F.: Evidence of an essential difference between the genetical effects of mono- and bi-functional alkylating agents. Z. Vererbungslehre, **95,** 374—378 (1964).
26. Watson, W. A.: Further evidence of an essential effect of mono- and bi-functional alkylating agents. Mut. Res. **3,** 455—457 (1966).
27. Brookes, P., Lawley, P. D.: Evidence of the action of alkylating agents on deoxyribonucleic acid. Exptl. Cell. Res., Suppl., **9,** 521—524 (1963).
28. Brookes, P., Lawley, P. D.: Reaction of some mutagenic and carcinogenic compounds with nucleic acids. J. Cellular Compar. Physiol., **64,** Suppl. I, 111—127 (1964).
29. Lawley, P. D.: The action of alkylating agents on DNA. „Deoxyribonucleic acid". Proceedings of the Annual Reunion of the Society de Chimie de Chimie Physique. **133,** (1962).
30. Freese, E.: Molecular mechanisms of mutations. In J. N. Taylor, Molecular Genetics, Part I, Academic. Press, New York, 65—111 (1963).
31. Alexander, P., Cousens, S. F., Stacey, K. A.: The reactions of the mutagenic alkylating agents with protein and nucleic acids. Ciba Found. Symp. Drug Resistance in Micro-Organisms, 294—318 (1958).
32. Nagata, C., Imamura, A., Saito, H., Fukui, K.: Changes of π-electron distribution of deoxyribonucleic acid after alkylation and their possible relation to the biological effect. Japan J. Cancer Res., **54,** 109—117 (1963).
33. Freese, E.: The influence of DNA structure and base composition on mutagenesis. Genetics Today, **2,** 297—306 (1963).
34. Lett, J. T., Parkins, G. M. and Alexander, P.: Physico-chemical changes produced in DNA after alkylation. Arch. Biochem. Biophys. **97,** 80—83 (1961).
35. Дубинин Н. П., щербаков В. К., Мокеева Н. П.: Цитогенетический анализ мутагенного эффекта новой группы химических мутагенов и некоторые закономерности естественного и индуцированного мутирования хромосом. Генетика **2,** 73 (1965).
36. Дубинин Н. П., Щербаков В. К., Кеслер Г. Н.: Фазы клеточного цикла и мутагенный эффект алкилирущих соединений Генетика **2,** 79 (1965).
37. Дубинин Н. П., Щербаков В. К., Кеслер Г. Н., Бабурина Н. Д.: Влияние алкилирующих агентов на хромосомы в стадии до синтеза ДНК. ДАН СССР 168, **4,** 932 (1966).
38. Немцова Л. С.: Последействие быстрых нейронов в семенах Crepis capillaris. Радиобиология т. 4, вып. 1 (1965).

39. Андреев В. С., Сидоров Б. Н., Соколов Н. Н.: Причины длительного мутагенного действия этилнимина. Генетика, **6,** 28—36 (1966).
40. NAWASCHIN, M.: Morphologische Kernstudien der *Crepis*-Arten in bezug auf die Artbildung. Zeitschr. f. wiss. Biol. Abtlg. B. **2,** 98—112 (1925).
41. FAHMY, O. G. and FAHMY, M. J.: Mutagenic response to the alkyl methanesulfonates during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. Nature, **180,** 31—33 (1957).
42. KÖLMARK, G.: Mutagenic properties of certain esters of inorganic acids investigated by *Neurospora* back mutations test. C. R. Lab. Carlsberg., Ser. Physiol. **26,** 205—220 (1957).
43. LOVELESS, A.: Increased rate of plaque-type and host-range mutation following treatment of bacteriophage *in vitro* with etyl methanesulfonate. Nature, **181,** 1212—1213 (1958).
44. LOVELESS, A. and HOWARTH, S.: Mutation of bacteria at high levels of survival by ethyl methanesulfonate. Nature, **184,** 1780—1782 (1959).
45. MOUTSCHEN, J., MOUTSCHEN-DAHMEN: L'action du myleran sur les chromosomes chez *Hordeum sativum* et chez *Vicia faba*. Hereditas, **44,** 18—36 (1958).
46. RIEGER, R. and MICHAELIS, A.: Chromatid Aberrationen nach Einwirkung von Äthylmethanesulfonate auf Primärwurzeln von *Vicia faba* L. Ber. u. Mttlg. dtsch. Akad. Wiss. Berlin **8,** 230—243 (1960).
47. MOUTSCHEN-DAHMEN, J. and M.: Influence of Cu^{++} and Zn^{++} ions on the effects of ethyl methanesulfonate (EMS) on chromosomes. Experientia, **19,** 144—145 (1963).
48. MOUTSCHEN-DAHMEN, J. and M.: Interactions ioniques dans les effects radiomimetiques du methane sulfonate d'ethyl (EMS) sur les chromosomes de *Vicia faba*. Radiation Botany, **3,** 297—310 (1963).
49. MOUTSCHEN, J. and DEGRAEVE, N.: Influences of thiol-inhibiting substances on the effects of ethyl methanesulfonate (EMS) on chromosomes. Exper., **21,** 200—202 (1111).
50. Рапопорт И. А.: Действие окиси этилена глицида и гликолей на генные мутации. ДАН СССР, **60,** 3 469—472 (1948).
51. Шкварников П. К.: Влияние некоторых химических соединений на хромосомные перестройки у растений ДАН СССР **59,** 1337 (1948).
52. EPLER, J. L.: Ethyl methanesulfonate induced lethals in *Drosophila*. Frequency-dose relations and multiple mosaicism. Genetics, **54,** I, 31—36 (1966).
53. Сидоров Б. Н.: Высокоактивные вторичные алкилирующие мутагены. Соколов Н. Н. Генетика **7,** 125—133 (1966). Андреев В. С.
54. Шевченко, В. А., Аникеев И. Д., Ваулина Э. Н.: Кинетика мутационного процесса хлореллы при действии этиленимина Эксп. мутагенез растений живот. и микроорганизмов. I Изд. Моск. Об-ва Испыт. природы, стр. 149 (1965).
55. RAMANNA, M. S., NATARAJAN, A. T.: Studies on the relative mutagenic efficiency of alkylating agents under different conditions of treatment. Ind. J. Genet., **25,** 24—25 (1965).
56. RAO, R. N., NATARAJAN, A. T.: Mutagenicy of some alkyl alkanesulfonate in barley. Mut. Res., **2,** 132—148 (1965).
57. MOUTSCHEN, J., DEGRAEVE, N.: Comparative efficiency of arsenicals in modifying effects of ethyl methanesulfonate (EMS) on barley chromosomes. Experientia, **21,** 706—707 (1965).

40 ÉVES A TIHANYI BIOLÓGIAI KUTATÓINTÉZET*

SALÁNKI JÁNOS

Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Kutatóintézete, Tihany

A természettudományok, s azon belül a biológia XIX. században megindult fejlődése és jelentős kezdeti sikerei az élővilág megismerésének és törvényszerűségei megértésének igényét rendkívüli mértékben felfokozták. Az addig egy-egy egyetem vagy mecénás jóvoltából támogatott kutatások egyre szélesebb társadalmi érdeklődést és megbecsülést váltottak ki. Így létesültek Európa számos országában, már részben állami támogatással, olyan biológiai intézetek, melyek az élővilág rendszerének, környezethez való alkalmazkodásának, az öröklékenységnek, az élőlények szerkezetének és életműködésének kutatását voltak hivatva szolgálni. E célok érdekében és ilyen módon jött létre még a múlt század végén a nagyhírű Nápolyi Zoológiai Állomás, a Szevasztopoli, a Helgolandi, a Rovinyói, Arcachoni Biológiai Állomás, majd e század elején a Volgai, Plymouthi, Lunzi Biológiai Állomás, hogy csak néhányat említsek a sok közül.

Nem véletlen, hogy ezeket az intézeteket többnyire tenger mellett létesítették. A törzsfejlődés különböző láncszemeit alkotó növény- és állatfajok előfordulása, a fajták és változatok gazdagsága legteljesebben a tengerben, az élet egykori bölcsőjében adott ma is. Természetes tehát, hogy a kutatók, akiket az élet keletkezésének és titkainak megismerése vonzott, ilyen helyeken vélték megtalálni azokat a feltételeket, azt a miliőt, ahol feltett kérdéseikre választ kaphattak, ahol a vizsgálataikhoz szükséges élőlényekhez legkönnyebben hozzájuthattak.

Ilyen aspektusban lehet és kell értelmezni azt a határozott törekvést is, ami hazánk természettudományos köreiben már a századforduló előtt egy biológiai állomás létesítésére irányult. A kor kiváló természetkutatói, Herman Ottóval és Lóczy Lajossal az élen, világosan látták és megfogalmazták egy, a magyar biológusok számára létesítendő biológiai állomás szükségességét. Voltak ugyan viták a fölött, hogy Fiumében, a tengerparton létesüljön-e ilyen kutatóhely, vagy pedig a Balatonon, mely ebben az időben Európa geológiailag leg-

* Elhangzott a Biológiai Kutatóintézet 40 éves fennállása alkalmából tartott ünnepi ülésen, 1967. szeptember 1-én.

inkább feltárt tava volt, a vita azonban teoretikus maradt, mert az állam anyagi támogatását ekkor megnyerni nem sikerült. Az első világháború kitörése teljesen félreállította az ilyen irányú terveket, és a gondolat csak a 20-as években tört ismét utat magának, amikor Angliában, Németországban, Olaszországban, a Szovjetunióban, Jugoszláviában és másutt az ilyen létesítmények már javában virágoztak.

A biológia fokozatosan, egyre előkelőbb helyet foglalt el eredményei révén a tudományok között, amit kellő felvilágosító munkával végre hazánkban is sikerült a vezető körök gondolkodásába átültetni, és őket az ügy támogatására megnyerni. Más országok példái is serkentőleg hatottak, s így ha megkésve is, de végül sikerrel járt a tudomány hűséges művelőinek és agitátorainak fáradhatatlan buzgalma: az 1926 augusztusában történt alapkőletétel után, 1927. szeptember 5-én Tihanyban megnyílt a Magyar Biológiai Kutatóintézet, és ezzel 40 évvel ezelőtt létrejött hazánkban az első, kizárólag tudományos célokat szolgáló, alapkutatásokat folytató, a biológia művelésére rendelt intézet.

Amikor szerte a világon az első biológiai intézetek működni kezdtek, s még e század első harmadában is, a kutatások középpontjában az állat és növényvilág leírása, a zártabb életterek botanikai és zoológiai feltérképezése, továbbá alaktani és szervezettani kérdések álltak. Ebben az időben élte virágkorát a rendszertan és a leíró biológiai tudományok, melyek megalapozták az élővilágról alkotott ismereteinket. De már ezekben az időkben megindult a biológiában annak az irányzatnak kibontakozása, mely a hangsúlyt nem a formák, szerkezet és jelenségek tüzetes megfigyelésére, leírására, tudományosan megalapozott csoportosítására, az élőlény mint egész és a környezet összefüggéseinek feltárására helyezte, hanem a szervezeten belüli jelenségek, a feltárt szerkezet és funkció kapcsolatának, a működések mechanizmusának kísérleti, experimentális úton való megismerését, megértését és befolyásolhatóságának kutatását tűzte ki célul. Különösen, ha ez utóbbit, a működés lényegének megértését és befolyásolhatóságát tekintjük, akkor érthető, hogy ezek a kérdések legsürgetőbben az alkalmazott biológia művelői, az orvos és agrárkutatók körében merültek fel, akik az idegi szabályozás, a szívműködés és keringésszabályozás, az emésztés, izomműködés, endokrin rendszer és más funkciók megismerése révén a betegségek gyógyításához, a fajok tulajdonságainak és változékonyságának, az alkalmazkodóképességnek, átöröklődésnek, táplálékfelvételnek és hasznosításnak megismerése révén a mezőgazdasági hozamok növeléséhez és gazdaságilag hasznosabb fajták kitenyésztéséhez vagy meghonosításához véltek szilárd tudományos bázist teremteni. Így érthető, hogy a biológiai ismeretek fejlesztésének a biológiai intézetek mellett az orvosegyetemek és agrárintézmények alapvető bázisává váltak, illetve, hogy a biológiai intézetekben a kísérleti biológia fejlődése nagyrészt az orvosok és agrárszakemberek irányításával alakult ki. Természetszerűleg az ilyen kutatásoknak már a vízi élettérrel általában semmi kapcsolatuk nem volt.

Amikor 40 évvel ezelőtt a Magyar Biológiai Kutatóintézet létrehozására sor került, már teret követelt a biológiának ez a viszonylag újabb irányzata is. Az akkori kormányzat úgy látta helyesnek, hogy egyidejűleg ez az igény is kerüljön kielégítésre, és a tihanyi intézet adjon helyet és lehetőséget mind rendszertani, mind experimentális kutatásokra. Ennek figyelembevételével teremtették meg a feltételeket a Balaton élővilágának kutatására, de emellett a biológia minden ágának művelésére, fejlesztésére és kibontakoztatására. Így létesült az Intézetben kezdettől fogva két osztály, a Balatoni Biológiai Osztály és az Általános Biológiai Osztály. Amint az Intézet 1928—29. évi jelentéséből kitűnik, „míg a Balatoni Biológiai Osztály munkakörében morfológiai, hydrobiológiai problémákon, a növekedés és ökológia kérdéseinek tanulmányozásán van a hangsúly, addig az Általános Biológiai Osztály az életjelenségek vizsgálatára és magyarázatára, physiologiai, fizikokémiai és biokémiai problémák megoldására törekszik". A két osztály közül a Balatoni Biológiai Osztály célkitűzései és kutatásainak határai voltak pontosabban megfogalmazva, amit két tényező biztosított: egyik a Balaton jelenléte, másik pedig az, hogy ez az Osztály tulajdonképpen örököse lett az 1925-ben Révfülöpön létesített Biológiai Állomásnak, mely két évi önálló működés után a tihanyi Intézet létesítésekor ebbe beleolvadt. Tulajdonképpen ez a révfülöpi állomás képezte magját az újonnan létesült Magyar Biológiai Kutatóintézet Balatoni Biológiai Osztályának, melynek osztályigazgatója Hankó Béla, a Révfülöpi Állomás addigi vezetője lett.

Az Általános Biológiai Osztály munkája az élettan, kórélettan, biokémia és öröklődéstan területén nagyrészt orvosok részvételével indult Verzár Frigyes egyetemi tanárnak, a Debreceni Orvostudományi Egyetem professzorának vezetésével, aki egyidejűleg az egész intézet igazgatója volt.

Ha visszatekintünk az Intézet 40 éves történetére, abban több periódust lehet felfedezni. Szervezetileg kezdetben a Magyar Gyűjteményegyetem része volt és a Nemzeti Múzeum fennhatósága alá tartozott, és csak 1951-ben vált az újjászervezett Magyar Tudományos Akadémia kutatóhelyévé. Az intézethez alapításakor kilenc kutatót és 5 fő kisegítő személyzetet neveztek ki, utóbbiak azonban elsősorban nem a laboratóriumi munkát voltak hivatva szolgálni. Tág teret kapott az Intézet vendégkutatók fogadására, akik különösen nyaranként bel- és külföldről egyaránt szép számmal érkeztek, s benépesítették a laboratóriumokat, könyvtárat és persze az intézeti Balaton-partot is. A harmincas évek nehéz gazdasági helyzete és az akkori kormány természettudományokat nem éppen pártoló politikája következtében később fokozatosan csökkent a kinevezett alkalmazottak száma. A II. Világháború évei alatt már mindössze 3 kutatóból állt a tudományos személyzet. Természetesen ezt az intézet tudományos aktivitása jelentősen megsínylette, a Balaton-kutatással pl. éveken keresztül csak egyetlen személy foglalkozott.

A felszabadulás után gyökeresen megváltozott tudomány- és kultúr-

politika eredményeképpen államunk gondoskodása az Intézet fejlődését alapvetően új vágányra terelte. Megnőtt az állandó alkalmazottak száma és jelentősen megjavult a kutatómunka anyagi ellátottsága. Így már 1946-ban 18 kinevezett kutató volt az intézetben. Ez később átmenetileg csökkent ugyan, és a 25 éves évforduló idején, 1952-ben 14 volt a kutatók száma, viszont a korábbinál több kutatási segéderő került alkalmazásra. A megnövekedett létszám a kutatómunka tervszerűségének lehetőségét is megteremtette, és ez követelménnyé is vált.

A felszabadulás fordulatot hozott az intézet nemzetközi kapcsolatainak fejlesztése terén is. A korábbi kapcsolatok megtartása mellett, megnyílt az út a Szovjetunió felé, ami könyvek, folyóiratok, kölcsönös látogatások és tanulmányutak formájában realizálódott, aminek hatása az intézet fejlődésében is megmutatkozott.

A munka ebben az időben is a biológia több részterületén folyt, de a diszciplínák önállósodási törekvése már kifejezésre jutott abban, hogy a Balatoni Biológiai Osztály Hidrobiológiai Osztállyá alakult, az Általános Biológiai Osztály helyett pedig önálló Állatélettan és örökléstani, Mikrobiológiai, pár évvel később pedig Botanikai Osztály létesült. Egy ideig az intézet Talajbiológiai Osztályaként működött az Akadémia egy Sopronban elhelyezett kutatócsoportja is.

Az Intézet munkájának ez a sokrétűsége magyarázatot ad arra, hogy a hazai biológusok zöme az elmúlt 40 év valamelyik szakaszában közvetlen dolgozója vagy vendégkutatója volt Tihanynak, s hogy lévén hosszú időn át ez az egyetlen hazai biológiai kutatóintézet, valóban központja, összefogója, találkozó munkahelye volt a magyar kutató biológusoknak. A sokrétű kutatási eredmény — melyek ismertetésére itt nincs mód —, főként pedig a Balaton élővilágának részletes feltárása mellett ebből adódott talán egyike a legfontosabbaknak, amit a Tihanyi Biológiai Kutatóintézet fennállása során a magyar biológiának adott: helyet nyújtott és lehetőséget teremtett olyan kutatások elmélyült folytatására, melyek másutt az országban még nem jutottak vagy nem juthattak szóhoz. Nyugodt éveket biztosított fiatal, önálló utakon járó kutatóknak, hogy egyéb elfoglaltságtól mentesen és talán kicsit a szokásosnál szabadabban úszva kialakíthassanak egy-egy új kutatási irányzatot, vagy felkészüljenek a későbbi nagyobb feladatokra. Végeredményben Tihany volt a bölcsője vagy legalábbis legelső otthona a hazai genetikai kutatásoknak, itt formálódott és szerveződött először a hazai nem orvosi mikrobiológia, bázist jelentett botanikai, biokémiai, orvosélettani és farmakológiai kutatások kibontakozásához és nem utolsósorban jelentős lökést adott produkciósbiológiai, haltenyésztési kutatások fejlesztéséhez. Tihanynak ezt a szerepét jelzi az, hogy a 40 év során itt dolgozott, összesen 59 kutató közül később 12-en kaptak egyetemeink valamelyikén tanszéket, néhányan pedig külföldön lettek egyetemi tanárrá.

A tihanyi intézet azonban nemcsak az első önálló hazai biológiai kutatóhely volt, de éppen szervezeti felépítése következtében egyben olyan szerephez is jutott, hogy falai között egyesítse a Magyarországon már korábban nagy tekintélynek örvendő és az akkoriban még csak fejlődő kutatási irányokat. Hazánkban az Intézetben találkozott először közvetlenül a leíró és az experimentális kutatási irányzat. Nem lehet azt állítani, hogy ez a találkozás mindig a pozitív oldalak egymás felé fordulásának jegyeit viselte magán, hogy a két irányzat kutatóinak összhangja mindig maradéktalan és magatartása egymást segítő volt az Intézetben. A tények azonban tanúsítják, hogy a hidrobiológiai kutatások, melyek különösen az első évtizedekben jelentős mértékben a Balaton élővilágának leírására irányultak, és az Általános Biológiai Osztály munkája kiegészítőleg és megtermékenyítőleg hatottak egymásra. Ilyen maga az a tény, hogy a Balatonban feltárt állat- és növényvilág egyik vagy másik képviselője vagy csoportja gyakran vált az experimentális munkát végző kutató kísérleti objektumává, és adott alkalmat addig ismeretlen jelenségek feltárására vagy megválaszolatlan kérdések megoldására.

Még a 30-as évek során például a balatoni compó halat, a Tinca vulgarist igen fontos élettani vizsgálatokra használták fel. E halnak a bele ugyanis a sima izomrétegeken kívül harántcsíkolt izomréteget is tartalmaz, és az izmok mindegyikét a bolygóideg, a n. vagus idegzi be. A bélműködés szabályozásának vizsgálata és farmakológiai tanulmányozása ahhoz a felismeréshez vezettek, hogy a sima és harántcsíkolt izomréteg egyaránt kolinerg mechanizmussal, vagyis az acetylcholin közreműködésével jön kontrakcióba, azonban az ingerületáttevődés helye egymástól eltérő gyógyszerhatástani sajátságokkal rendelkezik. Ez a felismerés egy akkoriban teljesen új, később más objektumokon is leírt fontos kérdésre hívta fel a figyelmet, nevezetesen, hogy az azonos humorális anyaggal működő ingerlékeny struktúrák kémiai receptorszerkezete eltérő lehet, aminek ismerete a szelektív befolyásolhatóság szempontjából igen fontos.

A Balaton volt kiindulópontja az 1950-es években megindult algakutatásnak, melyek ezen egysejtű növényi szervezetek táplálékfelvételének, anyagcsereviszonyainak és optimális tenyésztési körülményeinek megismerésére irányultak. A munka kezdetben teljesen hidrobiológiai igénnyel indult: az algáknak a Balaton életében játszott szerepének tisztázását tűzte ki célul. A téma azonban később a kutatókat olyan kérdések felvetésére ösztönözte, ami az algát már elvonatkoztatta a Balatontól, bevitte a laboratórium falai közé. Több mint 100 törzs összegyűjtése után fiziológiai és kémiai módszerekkel azok kísérleti algológiai vizsgálata, majd tömegtermesztésének kutatása indult meg, és hozott értékes eredményeket.

A legutóbbi években a tavi kagylók ritmikus és periodikus aktivitása idegi szabályozásának egyes kérdéseit, különösen az aktivitás ökológiai feltételektől való függését vizsgálva, ugyancsak kapcsolatot lehetett találni

hidrobiológiai kérdésekkel. A kagylók aktivitása ugyanis szorosan összefügg azok filtrációs tevékenységével, aminek a víztisztítás szempontjából nagy fontossága van. A vizsgálatok szerint bizonyos kémiai ágensek, valamint a víz fizikai állandóinak megváltozása az aktivitást csökkentik és ezáltal a víztisztítás biológiai feltételeit rontják. Az idegi szabályozás vizsgálata ily módon hidrobiológiai problémákkal is kapcsolatos. E néhány példán túlmenően jelentkeztek ezek az összekötő szálak az Intézet története folyamán sok más vonatkozásban is.

A kölcsönösség elve alapján az Intézetben folyó experimentális kutatások sem maradtak hatás nélkül a Balatoni, ill. örököse, a Hidrobiológiai Osztály munkájára. A Balaton-kutatás a kezdeti időkben a dolog természeténél fogva leíró, rendszertani jellegű volt és bizonyos vonatkozásokban ma is az. Egyre inkább kialakult és maradandóvá válik azonban az a felismerés, hogy a kísérleti biológiai metodikát a hidrobiológiai kutatások sem nélkülözhetik. Egyre kevésbé lehet megelégedni — mint ahogy világszerte már hosszú idő óta nem elégszenek meg — az élőlények begyűjtésével, fajok szerinti szétválogatásával, az újonnan előkerült fajok listába vételével. A cél a mélyebb összefüggések felismerése, és ehhez gyakran szükség van olyan vizsgálatokra, ami már az experimentális kutatások kereteibe tartozik.

A kísérleti biológia módszereinek a Balaton-kutatásra gyakorolt hatása leginkább a tavi tápanyagforgalomra vonatkozó vizsgálatokban jelentkezett és jelentkezik ma is. A táplálékláne vizsgálatának csak egyik, úgyszólván szemmel látható oldala az, hogy mi mivel él. Az azonban, hogy a táplálék milyen mértékben kerül hasznosításra, hogy a szervezet növekedése és anyagfelhalmozása mikor optimális, mikor nem, hogy ezeknek a viszonyoknak milyen szerepük van a társulások kialakulásában vagy megbontásában, hogy a külső hatások, fizikai és vegyi feltételek megváltozása miért idéz elő hasznos vagy káros változást a vízi élettérben, ill. várható-e hogy valami új faktor ilyet előidéz — mindez olyan kérdése a Balaton biológiájának, amire választ csak kísérleti módszerek alkalmazása, fiziológiai és kémiai folyamatok elemzése adhat. Az utóbbi évtizedben a Hidrobiológiai Osztály munkájában ilyen kutatások is teret kaptak.

Így függött és függ össze, volt és van kölcsönhatásban egymással az Intézetben az alapításkor kialakított két irányzat. A célkitűzés és törekvés, ami a megnyitáskor elhangzott beszédekből is tükröződik, mindenképpen helyes volt. Elősegítette ez a szervezeti felépítés, az így adott munkafeltételek, a biológia legkülönbözőbb irányainak művelését az Intézetben, ami a biológia hazai fejlődése szempontjából igen jelentősnek bizonyult.

Az Intézet sokirányúságának és a kutatások teljes szabadságának természetesen megvoltak nemcsak előnyei, de árnyoldalai is. A sokféle irányzat ugyanis általában nem egymás mellett, hanem egymást követően létezett és fejlődött, ami kifelé a profil gyakori változásában, belül pedig a gyakori

személycserékben, nemegyszer belső torzsalkodásokban, bizonytalanságban is tükröződött. Ez nem is tette lehetővé, hogy az Intézetben eddigi története folyamán a biológia valamely részterületén hosszabb hagyományokkal rendelkező kutatási profil, káderképző hely, igazi iskola alakuljon ki. Ennek legfőbb okát — bármilyen furcsán hangzik is — nagyrészt az Intézet földrajzi fekvésében kell keresnünk.

Amikor az Intézet megépítésére sor került, elhelyezésének legfőbb szempontja az volt, hogy a Balaton mellett ott létesüljön, ahonnan az egész tó könnyen elérhető, s ne ragadjon le a félsziget által kialakított egyik vagy másik medencében. Ezért esett a választás — egyéb szempontok mellett — a tihanyi félszigetre, mely mélyen benyúlik a Balatonba és a hely kínálja az alkalmat az egész víz bejárására. Ez a választás ezen egyetlen szempontnak kétségtelenül jól megfelelt, és egy állandó kutatógárdát fenn nem tartó biológiai állomás számára kielégítő szempont is. Egyidejűleg azonban olyan helyen létesült az Intézet, mely mind a fő közlekedési lehetőségektől, mind városoktól eléggé távol van ahhoz, hogy sok nehézséget és kellemetlenséget okozzon az állandóan itt élő azon családoknak, akiket a falusi környezet, ellátás, üzlethálózat és iskolaviszonyok nem elégítenek ki. Amennyire nyugalmat és jó feltételeket biztosított a hely az elmélyült kutatómunkára, annyira gondot okoztak a közlekedési nehézségek, a városi élettől való elzártság, a munka utáni kikapcsolódási lehetőségek hiánya, s nem utolsósorban az, hogy más tudományos intézetektől és egyetemektől, azok tanáraitól és hallgatóitól, és természetesen szellemi életétől is az Intézet az év nagy részében el volt zárva.

Ez volt a legfőbb oka annak, hogy az Intézet kutatógárdája mindig igen fiatal volt, 5—10 évnél hosszabb ideig kutatók itt ritkán maradtak, és legkésőbb a gyerekek középiskolába menetelének idején legtöbb kutató az Intézettől más helyre távozott. A felszabadulás óta is ritka kivételnek számított, ha valaki 40. életévét az Intézetben töltötte. Az elmenő idősebbek rendszerint fiatalabb munkatársaikat is magukkal vitték, s így az esetek többségében nemcsak a tudományos iskola kialakulásának, de a téma továbbvitelének feltételei sem maradtak meg.

Tudom, hogy biológusok körében nem egyértelmű ennek a jelenségnek negatív vonásként való értékelése. Vannak olyan vélemények, hogy itt a környezeti feltételek lényegesen megkönnyítik azt az egészséges kádercserét, szellemi felfrissülést, amit egyetlen kutatóintézet sem nélkülözhet, és hogy azok az irányzatok és kutatók, amelyek és akik arra érdemesek, másutt megtalálták és megtalálják a megfelelő helyet és lehetőséget a továbbfejlődésre, kutatásaik kiszélesítésére és iskola kialakítására is. Kétségtelen, hogy az Intézet 40 éves története nem zárja ki az ilyen eszmefuttatás létjogosultságát. Ez azonban csak olyan feltételek mellett képzelhető el, amikor egy-egy kutatási profil kialakítása nem kíván jelentős anyagi ráfordítást, és amikor

nincs határozott törekvés és elképzelés a kutatások és tudományterületek fejlesztésére.

A helyzet azonban ma alapvetően nem így áll a biológiában sem. Mindenekelőtt nem így áll azért, mert a hazai biológiai kutatások helyzete ma teljesen más, mint volt 40 évvel ezelőtt, az Intézet alapításakor.

A felszabadulás után, a Magyar Tudományos Akadémia újjászervezését követően kialakult tudománypolitika valamennyi tudományterületen jelentős anyagi eszközöket biztosított az alapkutatások fejlesztésére. Akadémiai intézetek egész hálózata épült ki, amellett az egyetemi kutatások is nagymértékben kiszélesedtek. A Biokémiai, Botanikai, Genetikai Kutatóintézetek, a tanszékek mellett működő kutatócsoportok a biológia egy-egy területe számára önálló munka- és fejlődési lehetőséget biztosítanak, sőt ehhez kell sorolni az Agrár és Orvosi Osztály egyes intézeteit is, ahol ugyancsak általában biológiai alapkutatás is folyik. Megszűnt tehát az az igény, hogy Tihany a biológia minden ágának helyet adjon, nem ez az egyetlen biológiai kutatóintézet ma már az országban, sőt messze nem is a legnagyobb.

Másrészt, a reális tényekkel számolva, azt is tudomásul kell venni, hogy egy ilyen nagyságrendű intézet a maga 18 kutatójával és 32 egyéb dolgozójával ma már nem is vállalkozhatna arra, hogy a biológia minden területén munkálkodjék, ill. hogy a biológia minden ága számára tudja biztosítani a kutatási feltételeket. Az elmúlt 20 esztendő folyamán a biológia tudománya, azt lehet mondani, gyökeresen átalakult. A korszerű technika behatolása az élet kérdéseinek tanulmányozásába a problémák új megközelítési lehetőségeit tárta fel. Az elektronmikroszkóp 5—10 Å-ös felbontóképessége nemcsak a szövetek szerkezetének fénymikroszkóppal nem is sejtett részleteit tárta és tárja fel a kutatók előtt, de alkalmas molekulán belüli elrendeződés vizsgálatára is. Az izotóptechnika önmagában is, de egyéb kémiai módszerekkel párosítva különösen érzékeny vizsgálómódszerré vált anyagcserefolyamatok, alapvető kémiai átalakulások és a kémiai szerkezet tanulmányozására. Nagyérzékenységű mérőműszerek olyan kis anyagmennyiségek mennyiségi meghatározását teszik lehetővé, melyek nagyságrendekkel alatta vannak a korábbi kvalitatív meghatározhatóságnak. A fiziológia és elektronika együttes alkalmazása az ingerület és ingerlékenység sejtszinten való vizsgálatának eddig nem remélt lehetőségeit tárta fel. Egyre precízebb módszerek állnak rendelkezésre a szervezeten belül lejátszódó folyamatok krónikus, direkt megfigyelésére, illetve befolyásolására, valamint továbbélő szövetek vizsgálatára, és így tovább. Ezeknek a módszereknek az alkalmazása azonban kivétel nélkül igen költséges, és még ha az alapfelszerelés rendelkezésre áll is, azoknak különböző területeken való felhasználása sok segédfelszerelést és speciálisan képzett, gyakorlott személyzetet igényel. De ez önmagában még nem minden. A biológiai kutatások világméretekben bekövetkezett kiszélesedése eredményeképpen kialakult új diszciplínák a kérdésfelvetés, a módszer

és az idő korlátozott volta miatt egymástól eléggé függetlenül fejlődnek tovább, ami oda vezet, hogy gyakran a biológia más-más területein dolgozó kutatók egymás problémáit részleteiben nem értik, sőt gyakran nem is ismerik. A felhalmozott anyag áttekintése és rendszerezése az egyéni munka helyett így is egyre inkább a kollektívák munkáját követeli, s kutatócsoportok, sőt kutatóintézetek munkája lehet hatékony ott, ahol régebben egy-egy kutató önállóan is sikerre számíthatott. Szükségszerűen alakultak ki tehát önálló intézetek, speciális felszereltséggel, személyzettel, könyvtárral, olyan kutatókkal, akik a biológia meghatározott területén vannak otthon, s akik kutatócsoportba tömörülve éveken át dolgoznak egy-egy témán. Szükségszerűen ilyenné kellett formálódnia a tihanyi Biológiai Kutatóintézetnek is, ha lépést akar tartani problematikában, metodikában és eredményekben a korszerű követelményekkel. Szűkíteni kellett tehát profilját és szerves részévé kell válnia annak az általános tudománypolitikai elgondolásnak, ami a Biológiai Tudományok Osztályának 1962-ben történt megalakításával és egy új biológiai kutatótelep tervbe vett létesítésével a biológiai alapkutatások hazai korszerű fejlesztését tűzte ki célul.

Ezek az elgondolások a Tihanyi Intézetben két kutatási irány fenntartását és fejlesztését határozták meg, olyanokét, melyek egyike sem rendelkezik önálló kutatóintézettel, sőt, nem foglaltatik benn azok egyikében sem. Ez a Kísérleti Állattan gerinctelen állatok vonatkozásában és a Hidrobiológia, különös tekintettel a Balaton biológiai problémáinak kutatására.

A Kísérleti Állattan ilyen aspektusban a korábbi évek során is volt rövidebb-hosszabb ideig képviselve az Intézetben, nagyobb és önálló jelentőségre azonban csak az elmúlt 5 év alatt tett szert. Ez a periódus egybeesett azon országos követelmény megvalósulásával, hogy a kutatási erőket és eszközöket koncentrálni, a témák számát csökkenteni, s a kutatások színvonalát célirányos munkával növelni kell. 1962 őszén ennek szem előtt tartásával kezdődött el a Kísérleti Állattani Osztály átszervezése. Ez egyes korábbi témák befejezésével, mások félbehagyásával járt együtt, és az egész Osztály, nagyrészt újonnan kinevezett kutatókkal, egyetlen probléma komplex vizsgálatát tűzte ki célul. Ez a téma általánosságban szólva a gerinctelen állatok idegi és humorális szabályozó rendszerének, vagyis neurobiológiájának kutatása. A vizsgált kérdést kezdetben szerény metodikai lehetőségek között morfológiai, fiziológiai és enzimkémiai oldalról kezdtük megközelíteni, szem előtt tartva az idegrendszeri szabályozás mechanizmusában szerepet játszó szerkezeti, élettani, kémiai jelenségek egységét és kapcsolatát.

Az Osztály munkájának középpontjában jelenleg Molluskák idegrendszere szerkezetének, elemi ingerületi jelenségeinek, valamint ezzel összefüggő biokémiai sajátosságainak kutatása áll. Ehhez kapcsolódva fontos részét képezi a kutatásoknak egyes ritmikusan működő effektor szervek, mint a szív és a záróizom élettanának és funkcionális morfológiájának vizsgálata, s végül

az idegi integráció, az idegrendszer komplex regulációs működésének tanulmányozása.

Az elmúlt 5 év során a Biológiai Tudományok Osztályának hathatós támogatásával lényegében sikerült megteremteni a Kísérleti Állattani Osztályon a színvonalas munka feltételeit. Korszerű élettani laboratóriumok állnak rendelkezésre a legszükségesebb elektrofiziológiai műszerekkel. A morfológiai laboratóriumok fény- és elektronmikroszkópos, valamint hisztokémiai munkához szükséges berendezésekkel el vannak látva. Emellett a korszerű kémiai munka lehetőségei is egyre inkább kialakulnak. Az elmúlt évek kutatómunkája már nemzetközileg elismert eredményeket is hozott több területen. Éppen ezért vállalkozott az Intézet arra, hogy a 40 éves évfordulót egyebek mellett nemzetközi jellegű, a Gerinctelen Állatok Neurobiológiája szimpoziummal is ünnepelje.

Az utóbbi időben a Hidrobiológiai Osztály munkája is új vágányokon halad. Az elmúlt években szisztematikusabbá és sokrétűbbé tettük a Balaton élővilágának folyamatos megfigyelését, az élőlénytársulások alakulásának és változásának vizsgálatát. Ennek érdekében a korábbi hat helyett kilenc főre bővítettük az osztály kutatóinak létszámát, egyidejűleg vízi mikrobiológiai és ichtiológiai laboratórium kialakítását kezdtük meg. Már másodéve folyik a balatoni nyíltvíz és a nyíltvízi iszap biológiájának újrafelmérése, és azt reméljük, hogy a jövő év folyamán ez a munka befejezést is nyer. Emellett a tápláléklánc által meghatározott szempontok figyelembevételével anyagforgalmi kutatások is folynak, különösen a zsírképzés, raktározás és mobilizálás, valamint a fehérjeemésztés kérdéseinek tisztázására. Ezeknek a kutatásoknak a fejlesztése érdekében az utóbbi években ugyancsak jelentős összegeket fordítottunk részben nagyműszerek beszerzésére, részben speciális laboratóriumok kialakítására. Nagy jelentőségűek azok a paleolimnológiai vizsgálatok, melyek az utóbbi években kezdődtek az Intézetben, s melyeknek időszerűségét a 40. évforduló idején az Intézetben rendezett I. Nemzetközi Paleolimnológiai Szimpozium is jelzi.

Az Intézet mindkét osztályának munkája, mint a Biológiai Osztály hatáskörébe tartozó kutatások többsége, kifejezetten alapkutatás jellegű. Célja alapvető biológiai törvényszerűségek feltárása, általánosítható következtetések levonása, s mint ilyen, része a természet objektív megismerésére irányuló törekvéseknek. A gerinctelen állatok neurobiológiája kutatásának közvetlen célja azoknak a szerkezeti sajátságoknak, működési alapelveknek, a működés során lejátszódó fizikai, kémiai, biológiai folyamatoknak, az abban szerepet játszó anyagoknak, minél részletesebb feltárása és megismerése, melyeken az idegrendszer működése felépül. Bármennyire távol látszódjék is állni egy kagyló vagy csiga idegrendszere az emberétől, az ott felfedezhető jelenségek, a működés elemi szinten való tisztázása nemcsak a központi szabályozó rendszer filogenetikai útjának megértéséhez visz el, hanem közvetve

segítséget ad az emberi idegrendszer élettanának, kóroktanának és kémiai, gyógyszertani befolyásolhatóságának megértéséhez is. Ugyanígy a Balaton biológiájának és esetleges változásainak megfigyelése, a balatoni élőlények táplálkozási viszonyainak, anyagcseréjének és az azzal összefüggő kérdéseknek a vizsgálata kapcsolatban van a Balaton sokrétű hasznosításával, valamint a vízi élettéren belüli termelés kérdéseivel is. Nem célunk, és nem is lehet feladatunk, hogy a kérdéseket úgy tegyük fel, ahogyan gyakorlati emberek, neurológusok, mezőgazdászok és halászok felteszik. De kötelességünk és törekvésünk, hogy azokra az általunk feltárt ismeretekre, összefüggésekre és eredményekre, melyek gyakorlati hasznosításra alkalmassá tehetők, ráirányítsuk a figyelmet, s ezzel a tudomány közvetlen termelőerővé válását is szolgáljuk.

Annak ellenére, hogy az Intézet ma már nem központja a hazai biológiai kutatásoknak, a 40 éves tradíciókhoz híven, a közvetlen kutatómunkán keresztül kapcsolatot igyekszik tartani minél több hazai és külföldi biológiai kutatóhellyel. Ezért a gerinctelen állatok neurobiológiája és a hidrobiológia területén dolgozókat vagy a probléma iránt érdeklődőket és mindazokat, akik metodikai igényeit ki tudjuk elégíteni, mint vendégkutatókat a jövőben is szívesen látjuk, és örömmel vesszük, ha az Intézet munkájába bekapcsolódnak. Ugyanígy tovább kívánjuk fejleszteni azt a legutóbbi években kialakult gyakorlatot, hogy lehetőséget nyújtunk egyetemi hallgatóknak nyári szakmai gyakorlatra és diplomamunka készítésére is. Így azoknak, akik a tudományos munka iránt érdeklődést tanúsítanak, már hallgató korukban lehetőséget adunk egy kutatóintézet mindennapi életébe való betekintésre, sőt, a munkába való bekapcsolódásra, tanulásra, fejlődésre is. Ezen túlmenően az eredeti elgondolásoknak megfelelően, az Intézet ma is alkalmas hely a hazai biológusok találkozására, szűkebb szakmai megbeszélésekre, szimpoziumok, konferenciák, tanfolyamok megrendezésére. Az Intézet épületének és felszerelésének az elmúlt 5 év alatt végrehajtott teljes felújítása magában foglalta az Intézet vendégházának felújítását is. Kutatólakások építése eredményeképpen az ma teljes egészében eredeti rendeltetését szolgálja, és alkalmas 30—35 vendég tartós elhelyezésére. Az a magány, csönd és nyugalom, ami az Intézetet az év jelentős részében körülveszi, kitűnő környezet tanfolyamok, tudományos tanácskozások résztvevői, vagy elmélyült alkotómunkát végzők számára.

Ilyen módon sok mai és leendő biológusnak válhat a tihanyi Biológiai Kutatóintézet a jövőben is kedves munkahelyévé, hasznos eszmecserék otthonává, fiatal és idősebb, különböző intézetekben és problémákon dolgozó kutatók találkozóhelyévé, és szolgálhatja az itt folyó állandó kutatómunkán túl is a magyar biológia továbbfejlesztésének ügyét.

Nem lenne teljes az Intézet megnyitásának 40 éves évfordulójáról való megemlékezésem, ha nem esnék szó arról a szerepről, melyet az Intézet a szűk szakmai kérdéseken s a biológia tudományának fejlesztésén túl betölt. Ez a

szerep is többrétű, de annak csupán két vonását említem meg. Egyik az Intézet társadalmi-politikai szerepe a község és a megye életében, másik pedig a természettudományos ismeretterjesztő munkából való részt vállalás helyi és országos méretekben is.

Tihany község szemében az Intézet régen valami szokatlant, talán titokzatosat és arisztokratikusat is jelentett. A felszabadulás utáni évek, a község társadalmi helyzetének gyökeres megváltozása, az általános műveltség emelkedése, az Intézetnek, s elsősorban a megváltozott szemléletű kutatóknak a falu társadalmi életébe való bekapcsolódása ezt a helyzetet alapvetően megváltoztatta. Részt vállal az Intézet a helyi államhatalmi és politikai szervek munkájában, a járás, megye életében, gondjainak megszüntetésében, törekvéseinek megvalósításában. Jelentős munkát végez hosszú évek óta számos kutató a biológiai ismeretterjesztő munkában, előadásokat tart nemcsak Tihanyban, de más községekben, városokban, valamint a megyében szervezett országos rendezvényeken is, és így járul hozzá a lakosság körében a természettudományos ismeretek növeléséhez, a materialista világszemlélet alakításához. Ez a tevékenység nem áll ellentétben a kutatómunkával, sőt, kiegészíti azt, mert ez is érezteti azt a felelősséget, mely hazánk és népünk felvirágoztatásáért valamennyiünkre hárul.

Az Intézet kutatókollektívája és minden dolgozója tudatában is van ennek a felelősségnek és arra törekszik, hogy miközben munkájával, eredményeivel, szakterületén hozzájárul korunk biológiai problémáinak megoldásához, legyen aktív részese társadalmi problémák megoldásának is, és ezáltal az Intézet a jövő évtizedekben is teljesíthesse azt a feladatot, melyet az Akadémia, államunk, a dolgozó nép remél és joggal el is vár tőle.

BESZÁMOLÓ A VII. NEMZETKÖZI BIOKÉMIAI KONGRESSZUSRÓL

FARKAS GÁBOR

ELTE Növényélettani Tanszék, Budapest

A VII. Nemzetközi Biokémiai Kongresszust 1967. augusztus 19—25 között a Nemzetközi Biokémiai Unió irányítása mellett a Japán Tudományos Tanács szervezte Tokióban. A kongresszuson, a mintegy 1500 japán résztvevőt beleértve, körülbelül 5000 biokémikus vett részt a világ minden tájáról. A létszámot tekintve az előző (New York-i) Nemzetközi Biokémiai Kongresszussal szemben bizonyos visszaesés mutatkozott, aminek elsősorban a nagy távolság és az ezzel együtt járó költségtöbblet volt az oka. Világos, hogy egy európai fővárosban rendezendő legközelebbi világkongresszuson már olyan létszámgyarapodással kellene szembenézni, amely a kongresszus szakmai sikerét veszélyeztetné, nem beszélve az 5—10 000-es résztvevő tömeggel együtt járó elhelyezési nehézségekről. Az ilyen jellegű lebonyolítási nehézségek a kongresszus szervezésének a lehetőségét néhány államra korlátozzák, ami a tudományos fejlődés egészét illetően nem egészséges. Ezek a gondolatok szerepeltek S. Ochoa, a Nemzetközi Biokémiai Unió elnökének megnyitó beszédében is, és felmerült, hogy a tokiói legyen az utolsó nagy nemzetközi kongresszus a biokémia egészéből. Végül is azonban elvetették azt a gondolatot, hogy a jövőben csak kisebb, jól körülhatárolt témakörökből legyenek szimpoziumok. Viszont elhatározták, hogy a következő kongresszus (Róma) témakörét szűkíteni kell és a résztvevők létszámát is korlátozni kell. Ezen elképzelések gyakorlati megvalósítása természetesen nem lesz egyszerű.

A témakörök bizonyos fokú koncentrálása már ezen a kongresszuson is megtörtént. Egyrészt ezt célozta a hét szimpozium: I. Biopolimerek szerkezete és működése; II. Biopolimerek bioszintézise; III. Az enzimműködés mechanizmusa; IV. Sejtszerveződés; V. Anyagcsereszabályozás; VI. Bioenergetika; VII. A fejlődés biokémiája. A szimpoziumokat egészítette ki egy-egy jól körülhatárolt, kisebb területről tartott ún. kollokvium. Ez utóbbiak is tulajdonképpen szűkebb területről tartott szimpoziumok voltak. A 14 kollokvium közül jellemzésképpen csak néhány példát említek: Triptofán anyagcsere; Kozmobiokémia és geobiokémia; Új módszerek a peptidek és proteinek szekvencia-analízisében stb. Egy-egy szimpoziumon belül 30—40 előadás, egy-egy kollokvium keretében pedig 5—6 előadás hangzott el. Mindezt nagyszámú

„felajánlott előadás" (contributed papers) egészítette ki. Ezeket is szekciókba szedték, és többnyire sikerült kialakítani aránylag egységes tematikájú üléseket. A szekciókba sorolt előadások száma közel volt a 2000-hez. Emiatt nem mindegyik előadás megtartására került sor. Mindezeken felül a kongresszus előtt és után számos szimpoziumot rendeztek különféle tárgykörökből. Egy ilyen 3 napos szimpoziumon („Biochemical Regulation in Plants") vett részt a kongresszust megelőzően e beszámoló szerzője is.

A kongresszus szimpoziumokra és szekciókra szakadását két plenáris ülés előzte meg, két-két plenáris előadóval. A plenáris előadásokhoz fűződik a kongresszus jelentős magyar sikere, amennyiben az egyik plenáris előadás megtartására Straub F. Brunó akadémikust, az MTA alelnökét kérték fel. Straub akadémikus nagysikerű előadását az enzimek SH- és SS-csoportjainak szerepéről tartotta az enzim—szerkezet (konformáció) és működés közötti kapcsolat dinamikus vonásait helyezvén a kérdés előterébe. Gondolatokban gazdag előadásának jellegzetessége — és megítélésem szerint értékes vonása — az volt, hogy a kérdésről nem általános review-t adott, hanem előadásának anyagát kevés kivétellel saját intézeteinek munkájából merítette. Az előadás a hazai biokémiai kutatás színvonalának jó propagandája volt. Ugyanabban a plenáris programban szerepelt H. G. Khorana, a Wisconsini Egyetem Biokémiai Intézetéből. Előadása és előadásának anyaga az organikus kémia eredményes alkalmazásának iskolapéldája volt a biokémia területén. A jelenlegi eredmények birtokában valószínűnek látszik, hogy kémiai (és részben enzimatikus) szintézissel rövidesen előállítható lesz az első olyan DNS-szekvencia (kód), amely ismert szerkezetű RNS (egy tRNS) szintéziséhez megfelelő templát.

A másik plenáris ülésen E. P. Kennedy „Újabb eredmények a membránok biokémiája területén" címmel tartott előadást, míg D. C. Phillips előadásának a címe „A lizozim és a protein-kristálykémia fejlődése" volt.

A kongresszus anyagának még ilyen dióhéjba foglalt ismertetésekor is le kellene mérnünk, hogy az utolsó kongresszus óta milyen irányban halad a biokémia. Azt úgy vélem mindjárt le lehet szögezni, hogy olyan lényeges „újdonság" bejelentése, amely azonnal forradalmi jellegű változásokhoz vezetne (mint pl. 1961-ben Moszkvában a Nirenberg—Mathaei-féle kísérletek ismertetése vagy 1954-ben a Párizsi Botanikai Kongresszuson a fotoszintetikus foszforilálás felfedezésének a bejelentése volt), nem történt. A tokiói kongresszus is azt tükrözte, hogy a jelenlegi időszakban erősen dominálnak a nagy kutatócsoportokra épülő, fáradságos analitikai munkák, amelyek alapját képezik az új, elvi jelentőségű következtetések levonásának. Ilyennek tekinthető a ribonukleinsav bázis-szekvenciák (és ennek alapján a másodlagos és harmadlagos szerkezet) vizsgálata, valamint az enzimfehérjék térszerkezetének a tisztázása, hogy abból az aktív centrumok minél jobb ismerete mellett a hatásmechanizmusokra fény derüljön. A nukleinsav-vonalon talán Sanger

és munkatársainak új szekvencia-analízis módszerét lehet kiemelnünk, amely első ízben vezetett egy hosszabb (nem tRNS) ribonukleinsavlánc teljes bázisszekvenciájának a feltárásához. A fehérjeszerkezet kutatása területén pedig a chimotripszin háromdimenziós struktúrájának a megállapítását említhetjük röntgendiffrakciós analízissel. Ez utóbbi révén a mioglobin, lizozim és az RN-áz mellett most már a negyedik fehérje térszerkezete vált ismeretessé. Ezektől a munkáktól várhatjuk az enzimműködés megértésében a legnagyobb mértékű haladást.

Rohamosan fejlődik, és ennek megfelelően döntő súllyal szerepelt a kongresszuson, a regulációs biokémia is, tisztán enzimológiai és biokémiai-genetikai vonalon egyaránt. Az idei év e téren is jelentős újdonságot hozott két represszor izolálása révén. A kongresszus anyagából azonban inkább az volt az ember benyomása, hogy jelenleg a megkezdett út részleteinek a kimunkálása folyik, és olyan dolog nem merült fel, amely alapjaiban változtatná meg a jelenlegi képet. Értékes új részletekkel azonban ez a terület is jelentősen gazdagodott, csak úgy, mint sok más, amelyeknek még az említésére sincs lehetőség.

Végezetül és nem utolsósorban ki kell emelni, hogy a nagy távolságot figyelembe véve viszonylag jelentős létszámú magyar delegáció járt Tokióban. Straub F. Brunó akadémikuson és a jelen beszámoló szerzőjén kívül az akadémiai küldöttség tagja volt Dénes Géza, Keleti Tamás és Telegdi Mariann. Részt vett a kongresszuson még Tankó Béla professzor, Horváth István, valamint Fejér Domokos, aki jelenleg Ghanában tanít.

RNS-DNS HIBRIDIZÁCIÓS TANFOLYAM, NÁPOLY, 1967. JÚNIUS 5—24.

VENETIANER PÁL

BOTE Orvosi-Vegytani Intézete, Budapest

A tudományos információcserének a kongresszusok és szimpoziumok mellett újabban egyre jobban terjedő formája a magasszintű továbbképző tanfolyam. Ilyeneket rendszerint turisztikailag is vonzó helyeken rendeznek, korlátozott számú résztvevővel, egy szűkebb, körülhatárolt kutatási terület alaposabb megismerése céljából. A nápolyi Nemzetközi Genetikai és Biofizikai Laboratórium egyik fő célkitűzése ilyen továbbképző kurzusok rendezése. A nemrégen létesült, kiválóan felszerelt, modern intézetet az olasz kormány és egy nagy amerikai egyetem támogatja. Ennek a támogatásnak és az igazgató Buzzati-Traverso professzor kiváló szervező képességének köszönhető, hogy a nagyszámú állandó munkatárs és a hosszabb időn át itt dolgozó vendégkutatók mellett az intézet helyet és felszerelést biztosít évi 2—3 tanfolyamnak is. Ezek közül az egyik, amelyről ebben a cikkben beszámolok, az RNS-DNS hibridizáció technikájával foglalkozott.

Ezt a kurzust részben maga a nápolyi intézet, részben az UNESCO finanszírozta — igen bőkezűen. Mind a 16 szerencsés résztvevő ottani teljes ellátását és többségük útját is fizették. A hallgatókat közel kétszáz jelentkezőből a tanfolyam vezetői és az UNESCO tudományos tanácsadó testülete, az ICRO (International Cell Research Organisation) választották ki, a szakmai követelmények mellett biztosítva a földrajzi és politikai változatosságot is. A 16 hallgató 4 világrészt és 12 országot (India, Ausztrália, USA, Kanada, Franciaország, Olaszország, Írország, Nagy-Britannia, Norvégia, Ausztria, Jugoszlávia, Magyarország) képviselt. Többségük több évi gyakorlattal rendelkező, tapasztalt kutató volt, ez a tény biztosította a viták és megbeszélések igen magas színvonalát. A tanfolyamot Dr. Sol Spiegelman vezette, az illinoisi egyetem (Urbana, Illinois, USA) mikrobiológiai intézetének professzora, akinek nevéhez fűződik a legkorszerűbb hibridizációs technika kidolgozása, és számos, a molekuláris biológia fejlődésében alapvető jelentőségű kísérlet elvégzése hibridizációs metodikák segítségével.

A tanfolyam többi előadói is Spiegelman iskolájából kerültek ki. S. Yankovsky (MIT, Cambridge, Mass., USA), D. Gillespie (Brandeis University, Waltham, Mass., USA), D. Giacomoni (Torino) és F. Ritossa (Nápoly) korább-

ban valamennyien vele dolgoztak, és mai munkájukra is láthatóan nagy befolyást gyakorol Spiegelman ötletgazdagsága, félelmetes logikája, metodikai pontossága és lázas munkatempója.

A hibridizációs metodika nem régi. Marmur és Doty 1960-ban leírták, hogy a DNS hődenaturáció után megfelelő körülmények között (magas sókoncentráció) lassan lehűtve „renaturálódik", vagyis a felszakadt hidrogénkötések újraképződnek és helyreáll az eredeti kettősspirál szerkezet. Ez a folyamat szigorúan specifikus, a reakciót csak komplementer láncok adják, heterológ DNS nem renaturálható. Spiegelman és Hall úgy gondolkoztak, hogy ha két komplementer DNS szál ilyen módon mintegy felismeri egymást, akkor hasonló reakció létrejöhet egy DNS szál és az általa szintetizált RNS között is, ugyanis a molekuláris biológia (ebben az időben még nem szigorúan bizonyított) elmélete szerint a DNS komplementer bázissorrendű RNS-t szintetizál. Ezt az elméletet éppen Spiegelman és Hall kísérlete bizonyította be a legfrappánsabban, amelyben kimutatták, hogy a fágfertőzés után keletkező RNS képes stabil kettőssláncú hibridmolekulát képezni a fág DNS-sel — és csakis azzal. A következő években kidolgozták az RNS-DNS hibridmolekulák ultracentrifugás és oszlopkromatografiás elválasztásának technikáit, és az új módszer segítségével sok fontos problémát vizsgáltak meg. Például kimutatták, hogy a riboszóma és a transzfer RNS egyaránt hibridizálható DNS-sel, tehát ezek a stabil RNS molekulák éppúgy közvetlen génproduktumok, mint a messenger RNS. Ezek a pontos kvantitatív mérések alkalmasak voltak a megfelelő DNS szakaszok hosszának meghatározására is. Nitrocellulóz kromatográfiás oszlopon megkötött DNS segítségével Bautz és Hall izoláltak egyetlen specifikus messenger RNS molekulát. A membránfilterek elterjedésével Nygaard és Hall jelentősen leegyszerűsítették a módszert, megállapítva, hogy a DNS-RNS hibrid membránfilter segítségével elválasztható a szabad RNS-től. Ezt a módszert fejlesztették tovább Gillespie és Spiegelman azzal, hogy az egész hibridizációs reakciót a membránfilteren végezték el. Ez a technika volt a tanfolyam gyakorlati munkájának alapja.

Munkánk Nápolyban reggelenként azzal kezdődött, hogy valamelyik előadó ismertette az aznapra tervezett kísérlet lényegét, technikai részleteit, és felhívta a figyelmet a megvalósítás esetleges nehézségeire, körülbelül úgy, ahogy ez egyetemi gyakorlatokon szokásos. A nap legnagyobb része, sokszor a késő éjszakai órákig, gyakorlati munkával telt el. Egy-egy kísérlet lezárása után összehasonlítottuk a különböző munkacsoportok eredményeit, magyaráztuk és leszűrtük a tanulságait. Délutánonként formális szemináriumok szerepeltek a napirenden. Ezek anyaga nem kapcsolódott közvetlenül a tanfolyamhoz, az előadók, illetve az intézetet abban a periódusban látogató külföldi kutatók beszéltek saját otthoni munkájukról. Ezenkívül a gyakorlatok közben adódó üres órákban a hallgatók adták elő otthoni munkájuk problémáit, terveit. Különösen érdekesek voltak azok a nem formális, sza-

bad viták, amelyek ilyen alkalmakkor bontakoztak ki a hibridizációs technika további alkalmazási lehetőségeiről.

A tanfolyam gyakorlati anyaga a következő volt:

1. hét: Hibridizáció oldatban. A hibrid kimutatása CsCl sűrűség gradiens centrifugálással, illetve MAK oszlopkromatográfiával.
Hibridizáció nitrocellulóz membránfilteren. Telítési görbe felvétele, idő- és hőmérséklet-függés kimérése. A hibridizáció specifitásának kimutatása. Kompetició homológ és heterológ RNS-el.
Ezen az első héten az előadók által előzőleg preparált tiszta radioaktív RNS és DNS készítményekkel dolgoztunk.

2. hét: Tiszta, tritiummal jelölt *Escherichia coli* DNS és ^{32}P-jelölt *E. coli* riboszóma RNS preparálása. Készítmények tisztaságának ellenőrzése. Hibridizáció a sajátkezűleg preparált nukleinsavakkal.

3. hét: Alkalmazás: A *Drosophila melanogaster* riboszóma RNS szintézisért felelős génszegmens relatív nagyságának meghatározása két különböző mutánsban, a hibridizációs technika felhasználásával. Natív DNS-RNS hibrid kimutatása.

E program megvalósítása során mód nyílt arra, hogy megismerkedjünk a módszer minden apróbb fogásával, lehetséges buktatóival, egyszóval azokkal a látszólag mellékes tényezőkkel, amelyeket még a legjobban megírt módszertani cikkekből sem lehet megtanulni, csak keserves személyes tapasztalat árán. Ennél is jelentősebb tanulságot biztosítottak azok a kritikai viták, ahol a kísérleti eredményekből levont különböző következtetések jogosultságát beszéltük meg, számos gyakorlati példa megtárgyalásával. A hibridizációs módszert alkalmazó számos munka méretett meg és találtatott könnyűnek az alapos és kíméletlen viták során. A hallgatók, akik többnyire azzal a céllal jelentkeztek, hogy a megtanult technikát a maguk munkájában azonnal alkalmazzák, egyet biztosan megtanultak: azt, hogy mit nem szabad csinálniuk. Hogy mit kellene csinálni, az jóval nehezebb kérdés. Ahogy az egyik előadó megfogalmazta: „Minden könnyű és evidens kísérletet ezzel a technikával már mi elvégeztünk. Az önök feladata az, hogy azokra a nehezebb problémákra találjanak megoldást, amelyekről mi, mint lehetetlenről, most lebeszéljük önöket."

Konkrétebben: Megtanultuk, hogy noha fizikokémiai alapjai meglehetősen tisztázatlanok (rejtély például, hogy miért kötődik specifikusan a denaturált DNS a nitrocellulóz filterhez), ez a látszólag primitív és empirikus úton kidolgozott technika meglepően pontos, reprodukálható és kvantitatív eredményeket szolgáltat. Megtanultuk, hogy minden egyes kísérlettípushoz ki kell dolgozni az optimális körülményeket (idő, hőmérséklet, koncentráció),

nem szabad az irodalomból készen átvett recepteket használni. Feltétlenül olyan RNS koncentrációra van szükség, amely telíteni képes a jelenlevő DNS összes komplementer kötő helyeit. E telítési szint alatt dolgozva nem nyerhetünk kvantitatíve értékelhető eredményeket. Megtanultuk tisztelni a felhasznált DNS és RNS tisztaságának alapvető követelményét. Minthogy ennek a követelménynek a betartása pillanatnyilag csak riboszoma és transzfer RNS esetén lehetséges, tehát szigorúan kvantitatív következtetéseket csak az ezekkel az anyagokkal végzett kísérletek eredményeiből lehet levonni. Ezt azért volt szükséges hangsúlyozni, mert a szakirodalom tanúsága szerint a kutatók nagy része messenger RNS problémák megoldására használja a hibridizációs technikát, és a tanfolyam hallgatóinak többsége is ilyen tervekkel foglalkozott. Messenger RNS nem állítható elő tisztán, és nehéz, szinte lehetetlen olyan mennyiségben preparálni, ami telíti a filteren levő DNS-t. Természetesen az előadók nem állították, hogy ebben az esetben egyáltalán nem használható a hibridizációs technika, csak nagyfokú óvatosságra intettek a kvantitatív következtetések levonásában.

Ahogy korábban már említettem, délutánonként formális szemináriumok szerepeltek a programban. A tanfolyam vezetőin kívül előadásokat tartottak: Tissières (Genf), Landy (Cambridge), Siekevitz (New York) és Schlesinger (Saint Louis). Nem tekinthetem feladatomnak, hogy ebben a rövid beszámolóban részletesen ismertessem valamennyi előadást, amelyet a tanfolyam során meghallgattam. Csak néhány olyan új módszert és kísérleti eredményt szeretnék megemlíteni, amelyekről szó esett és a tanfolyam időpontjában még nem voltak leközölve.

Kvantitatív hibridizációs vizsgálatoknál feltétlenül ismerni kell a membránfilteren megkötött DNS mennyiségét. Ennek legegyszerűbb módja ismert specifikus aktivitású jelzett DNS használata és a filter radioaktivitásának mérése. Ez a módszer azonban csak mikroorganizmusoknál alkalmazható, magasabbrendűeknél a DNS in vivo jelölése körülményes és költséges, sok esetben lehetetlen. Spiegelman és munkatársai ezért kidolgoztak egy in vitro metodikát, amelyben az izolált, tiszta DNS-t radioaktív dimetilszulfoxiddal metilálják olyan kíméletesen, hogy a DNS nem bomlik le, hibridizációs specifitása megmarad és radioaktivitása szinte tetszés szerint növelhető. Most próbálják a technikát alkalmazni RNS-re. Ugyanennek a problémának másik megközelítése a Yankovsky által kidolgozott kémiai DNS mérés magán a filteren.

Spiegelman intézetének központi témája az RNS bakteriofágok replikációjának mechanizmusa. Erről a problémáról szólt az a tartalmában és formájában egyaránt lenyűgöző előadás, amely a tanfolyamot zárta. Mint ismeretes, a kérdésről éveken át tartó tudományos háború zajlott két kutató csoport között. Jelenleg, többszöri kölcsönös véleményváltoztatás után, a szintézis mechanizmusának főbb vonásaiban egyetértenek a kutatók. Két

RNS-fág replikációjáért felelős specifikus enzimet sikerült tisztán előállítani. Ezekkel az enzimekkel a replikáció in vitro tanulmányozható. Egy rendkívül érzékeny poliakrilamid gél elektroforézis technika segítségével a szintézis intermedierjeit elkülönítették, kimérték keletkezésük kinetikáját és bázisösszetétel vizsgálatokkal azonosították őket. Az eredmények alapján bizonyítottnak tekinthető, hogy a fág-RNS-nek komplementerje (mínusz szál) szintetizálódik először, az így keletkezett kettőslánc RNS a szintézis első intermedierje. A továbbiakban az eredetivel megegyező (+) RNS láncok ezen a kettősspirálon szintetizálódnak. A tisztított és szigorúan specifikus RNS replikáz enzim segítségével Spiegelmanék megvalósítottak valami egészen újat, amit az előadásban úgy emlegetett, hogy „molekuláris evolúció a kémcsőben". Abból indultak ki, hogy mivel az enzim a megfelelő prekurzorok jelenlétében gyakorlatilag korlátlanul szintetizálja az RNS-t és a reakció terméke új szintézis-ciklus kiindulópontja, a reakcióelegy ismételt hígításával elérhető, hogy a szintézis továbbmenjen akkor is, mikor az eredeti (primer) RNS-ből már egyetlen molekula sincs jelen a reakcióelegyben. Feltevésük szerint a hígítás sokszori ismétlése, egyre rövidülő időközökben, darwini típusú szelekciós nyomást jelent a replikációs folyamatra. Nyilvánvalóan az ismételt hígítások során egyre szaporodik a rövidebb, félig kész molekulák aránya, és ha ezek replikálódnak, akkor a reakció terméke is rövidebb lesz. Ezt a hipotézist a kísérletek teljes mértékben igazolták. Néhány száz hígítás után az eredeti, kb milliós mólsúlyú fág-RNS-ből mintegy százezres mólsúlyú RNS-t nyertek. Ez a kis, mesterséges evolúcióval keletkezett RNS fertőzőképességgel már nem rendelkezett, de a specifikus replikáz enzimmel még reagált, sőt szintézise kb. ezerszer gyorsabb volt az eredetinél. Ennek az eredménynek elméleti jelentősége nyilvánvaló, de talán érdemes megemlíteni egy esetleges gyakorlati perspektívát. Ha előállítható egy olyan vírus nukleinsav, amely nem fertőzőképes, de szintézisének sebessége ezerszer nagyobb a természetes vírusénál, akkor ezt a molekulát esetleg fel lehet használni biológiai fegyverként a vírusos fertőzés leküzdésére.

Mint talán ebből a rövid beszámolóból is kitűnik, a magas színvonalú előadások meghallgatása és a gyakorlati munka nagyon hasznosnak bizonyult minden résztvevő számára. Emellett azonban feltétlenül ki kell emelni azt a nem kevésbé fontos tényt, hogy 16, nagyjából hasonló érdeklődésű és alapképzettségű, de különböző országokból érkező és különböző problémákkal foglalkozó kutató három héten át szinte egész napját együtt töltötte. Mindenki tudja, hogy tudományos kongresszusokon a kötetlen beszélgetések folyosón vagy fehérasztal mellett sokszor hasznosabbak, mint az előadások hallgatása. Ez a háromhetes együttlét az információcserének, a vitának, az új ötletek és perspektívák megtárgyalásának olyan bőségét jelentette, amely minden résztvevő számára emlékezetessé tette a tanfolyamot.

BESZÁMOLÓ A „RIBOSZOMA ÉS MESSENGER-RNS BIOKÉMIÁJA" SZIMPOZIUMRÓL

GAÁL ÖDÖN

BOTE Orvosi-Vegytani Intézete, Budapest

A szocialista országok tudományos akadémiái között működő, nukleinsav kutatásokat koordináló bizottság megbízása alapján rendezte meg a Német Demokratikus Köztársaság Tudományos Akadémiája és a Német Biokémiai Társaság ez év május 23—26-a között ezt a szimpoziumot a Thüringiai erdőben levő reinhardsbrunni kastélyban.

A szimpoziumon a szocialista országok mintegy 100 kutatóján kívül, körülbelül negyven kutató — jórészt mint meghívott vendég — vett részt. A meghívott vendégek mind a tudományág nemzetközileg elismert szaktekintélyei voltak. A szimpozium három és fél munkanapján 38 20—25 perces és 25—50 perces előadás hangzott el, angol nyelven. Sajnos, a programban biztosított idő a vitákra meglehetősen kevésnek bizonyult, így a szakmai megbeszélések jó része a közös étkezések alatt folyt.

A szimpozium a következő témákkal foglalkozott:

A) Riboszoma struktúra
B) Messenger-RNS bioszintézis regulációja
C) Riboszoma bioszintézis
D) Messenger-RNS állati szövetekben
E) Riboszoma és messenger-RNS kölcsönhatás
F) Fehérje szintézis
G) Antibiotikumok hatása a riboszomára.

Beszámolómban igyekszem átfogó képet nyújtani a szimpoziumról, a teljességre való törekvés igénye nélkül.

Az első problémakör bevezetőnek szánt előadását A. Sz. Szpirin (Moszkva) tartotta. Röviden ismertette a riboszoma struktúrájára vonatkozó régebbi adatokat, majd részletesen tárgyalta a riboszomák strukturális átalakulásait, melyeket három csoportra osztott:

a) A 70 S, ill. 80 S riboszomák disszociációja alegységekre
b) A kompakt struktúra fellazulása
c) Egyes fehérjecsoportok leszakadása sók hatására.

Előadásában rámutatott arra, hogy a fenti típusú átalakulások megfelelő körülmények között reverzibilisek, így a lehasított fehérjék képesek kötődni a fehérjét és RNS-t tartalmazó partikulákhoz, biológiailag aktív riboszomák képződése közben. Sőt, az izolált riboszoma-RNS is képes a riboszoma fehérjékkel újra egyesülni. Az ilyen — rekonstruált — riboszomák fizikai tulajdonságaik alapján megegyeznek az eredeti riboszomákkal, biológiai tulajdonságaik vizsgálata most folyik.

Egy másik előadásban Mary L. Petermann (New York) részletesen foglalkozott a máj riboszomák disszociációjával. Megállapították, hogy azonos Mg^{++}-riboszoma arány mellett, 37°-on nagyobb a disszociáció, mint 0°-on. A hőmérséklet érzékeny kötés vizsgálata még nem fejeződött be, de valószínűnek látszik, hogy az alegységek összekapcsolódásában a hidrofob külcsönhatások és a hidrogén híd kötések is részt vesznek. Petermann beszámolt arról is, hogy patkány máj riboszomából 0,5 M LiCl segítségével a legbázikusabb fehérjék leszakíthatók, és olyan nukleinsavat és fehérjét tartalmazó partikulák keletkeznek, amelyek nagyon hasonlítanak Szpirin által leírt „CM-like" partikulákhoz.

Több előadó foglalkozott a riboszoma fehérjékkel. Így H. Bielka és H. Welle (Berlin-Buch) különböző fajok riboszoma fehérjéinek poliakrilamid gél és immun elektroforéziséről, J. Horstmann (Erlangen) az élesztő riboszomákon, míg W. Rossowski és K. Zakrzewski (Varsó) embrionális és kifejlett patkány máj riboszomákon végzett vizsgálatairól számolt be. Petermann szintén közölt — már említett előadásában — máj riboszoma fehérjékre vonatkozó adatokat. Poliakrilamid gél elektroforézissel 17 fehérje komponenst mutattak ki patkány máj riboszoma nagyobb alegységében. A 17 komponens közül négy a fehérjetartalom 70%-át teszi ki. Ezek közül preparatív gél elektroforézissel két fehérjét tisztán is előállítottak, melyek molekulasúlya 14,800, ill. 28,600. A szimpozium rendezősége egy délutánt szentelt a riboszoma—RNS problematikájának tárgyalására.

K. S. Kirby és J. H. Parish (London) előadása — amelyet Kirby távollétében Parish tartott — a riboszoma-RNS izolálásának, stabilitásának és asszociációs tulajdonságainak vizsgálatával foglalkozott.

Bolgár kutatók, A. A. Hadjiolov, P. V. Venkov (Szófia) és mások, beszámoltak a máj riboszomákból izolált nukleinsavak szerkezetének vizsgálatáról. A RNS és fehérje riboszomán belüli kapcsolatáról egy novoszibirszki kutatócsoport munkájáról szóló előadásban hallottunk. D. G. Knorre beszámolt arról, hogy egy specifikusan uracillal és guaninnal reagáló karbodiimid származék (CMEC; N-ciklohexil-N'-β-[4-metilmorfolinium] etil karbodiimid p-toluenszulfonát) kevésbé kötődik az ép riboszoma nukleinsavához, mint az izolált riboszomális nukleinsavhoz.

A szimpoziumon tárgyalt második témakör a riboszomák bioszintézisével foglalkozott.

J. Sykes (Sheffield) előadásában a riboszoma bioszintézis regulációjának egy érdekes modelljét mutatta be. A modell szerint egy induktor-fehérje szükséges ahhoz, hogy a DNS láncon szintetizált RNS leszakadjon a DNS-ról, és így lehetőség nyíljon egy újabb RNS molekula szintézisére. Az induktor-fehérje ezután kapcsolatban marad a képződő riboszomával egészen addig, míg a riboszoma érése befejeződik. A kész riboszomáról megfelelő K^+-Mg^{++} aránynál szakad le, és képes részt venni a következő ciklusban.

B. H. Sells (Tennessee) előadásában kiemelte azt a kérdést, hogy mi a riboszomális fehérjék messenger-RNS-a. *E. colin* végzett kísérletei alapján valószínűnek látszik, hogy mint azt az irodalomban már korábban felvetették, a riboszoma-RNS messengerként részt vesz a riboszoma-fehérjék szintézisében, úgy hogy 70 S riboszomákkal poliszomát alkot. Arról, hogy a riboszomális RNS lehet-e a riboszoma-fehérjék messengere, több esetben alakult ki élénk vita, de egyértelmű állásfoglalás nem történt.

A szimpozium második napját a messenger-RNS-val kapcsolatos kérdések tárgyalása töltötte ki. A délelőtti ülésen a messenger-RNS szintézisének regulációja, délután pedig a „Messenger-RNS állati szövetekben" című téma került megtárgyalásra. Természetesen lehetetlen ezt a két témát élesen elválasztani. A probléma tárgyalásánál mintegy bevezetőül szolgált W. Zillig előadása, aki irodalmi adatok és munkatársaival végzett kísérletek alapján, átfogó képet adott a DNS-ban tárolt információ RNS-ba történő átírásának mechanizmusáról. Érdekes, de nagymértékben egyszerűsített számítások segítségével igyekezett O. Maaloe (Berkeley) felderíteni azokat a regulációs tényezőket, melyek szerepet játszhatnak a baktériumokban folyó RNS szintézis szabályozásában.

G. P. Georgiev (Moszkva) az állati sejtmagokban keletkező m-RNS szintézisével és a citoplazmába jutásával foglalkozott. Lehetségesnek tartja, hogy a laboratóriumában izolált messenger-RNS-t és fehérjét tartalmazó komplex — amelynek szerkezete annyiban hasonlít a poliszomákhoz, hogy ebben az esetben a messenger-RNS lánchoz fehérjék kapcsolódnak, úgy mint a poliszomák esetében a riboszomák — részt vesz a magból a citoplazmába irányuló transzport folyamatban. Ennek a komplexnek enyhe ribonukleázos kezelésével az általuk már korábban leírt, ugyancsak fehérjét és RNS-t tartalmazó, 30 S ülepedési állandójú részecskéhez jutottak el. A részecskék fehérje összetételének vizsgálata azt mutatta, hogy nem hasonlítanak sem a hisztonokra, sem a riboszomális fehérjékre. A magyar résztvevő számára külön érdekessége volt ennek a munkának, hogy Molnár J. — aki mint ösztöndíjas dolgozott Georgiev laboratóriumában — társszerzőként szerepelt.

Mélyreható és részletes elemzést hallottunk az állati szövetek messenger-RNS-airól H. R. V. Arnstein (London) előadásában, amelynek részletes ismertetése túlhaladná e beszámoló kereteit. Ezért itt csak az előadásban elhangzott messenger-RNS definíciót szeretném ismertetni. Arnstein szerint

egy valamilyen sejtből izolált RNS akkor tekinthető szigorúan véve messengernek, ha képes más sejtből készített, sejtmentes rendszerben irányítani egy olyan fehérjeszintézist, amely jellemző arra a sejtre, amelyből a vizsgált RNS-t izolálták, és amelyet nem képes szintetizálni a heterolog riboszomrendszer, az adott RNS távollétében.

A messenger-RNS és riboszoma közötti kölcsönhatások tárgyalásának bevezető előadását D. H. Hayes (Párizs) tartotta, aki ismertetésében — irodalmi adatokat is felhasználva — felsorolta mindazokat a faktorokat, amelyek szerepet játszhatnak a messenger-RNS riboszomához történő kötődésben. T. Hultin (Stockholm) az in vivo nem messengerhez kötött riboszomák tanulmányozásáról számolt be. Beszámolójában kiemelte, hogy az in vivo poliszoma képződéséhez feltétlenül szükséges a sejtek megfelelő energia-, valamint aminosav-ellátása. Az aminosavelvonással végzett kísérletei azt mutatják, hogy Chang szövetkultúra sejtjei különösen érzékenyek glutaminsav éheztetésre. Aminosav éheztetéskor nagyfokú poliszoma-bomlást figyeltek meg, és ezzel párhuzamosan csökkent az izolált riboszomák szintetikus aktivitása. A sejteket ismét teljes táptalajban inkubálva visszaalakultak a poliszomák. Ezt a folyamatot nem gátolta aktinomicin D, olyan koncentrációban, amely normálisan már csaknem teljesen gátolja a ^{14}C-uridin beépülését a RNS-be. Az aminosav-hiány hatására bekövetkező poliszoma elbomlásról Alexandra von der Decken és H. N. Munro is beszámolt. Előadásaik rövid ismertetésére még visszatérek.

H. Chantrenne, A. Burny (Brüsszel) és munkatársaik két előadásban — amelyeket Burny tolmácsolt — számoltak be a hemoglobin messenger-RNS izolálásáról. Az általuk nyúl retikulocitából izolált RNS frakció fontosabb tulajdonságai: szedimentációs konstansa: 9 S, enyhe ribonukleáz kezelésre is érzékeny, ^{32}P-vel in vivo gyorsabban jelölődik, mint a riboszoma RNS, kötődik a riboszomákhoz, és a molekula mérete elegendő a globinszintézishez szükséges információ hordozására. A fentiek alapján valószínű, hogy ez a nukleinsav a globin messengere, azonban eddig még nem sikerült segítségével sejtmentes rendszerben globinszintézist elérni. Érdekes megfigyelésről számolt be L. Nowak és W. Szer (Varsó). Azt találták, hogy olyan poliuridilsav analógok, amelyek nem rendelkeznek messenger aktivitással és nem képeznek komplexet poliadenilsavval, képesek kötődni *E. coli* riboszomákhoz, mégpedig ugyanarra a kötőhelyre, mint a poliuridilsav. Más analógokkal végzett kísérleteik arra utaltak, hogy a szintetikus polimer konformációjának van lényeges szerepe a riboszomához való kötődésben.

A „Fehérje szintézis" címen összegyűjtött előadások között több nagyon jó beszámolót hallottunk. F. Cramer (Göttingen) ismertetett egy nagyon elegáns módszert az ismert szekvenciával rendelkező dezoxiribonukleotidok szintézisére: polistirol alapú műgyantához kötött nukleotidhoz köti a sorontkövetkezőt. Egy nukleotid beépítése 90%-os kitermeléssel történik.

H. G. Zachau (München) ismertette a két általuk izolált szerin specifikus transzfer-RNS szerkezetét, összehasonlítva az addig ismert szerkezetű transzfer-RNS-ak szerkezetével. Megállapította, hogy a különleges nukleotidok távolsága egymástól az eddig ismert szekvenciájú RNS-akban azonos, de maguk a nukleotidok, valamint a közöttük levő bázis-sorrend különböző.

D. Grünberger és munkatársai (Prága) különböző aminosavak guanintartalmú kodonjainak és ezek guanin helyett inozint és azaguanint tartalmazó analógjainak hatását vizsgálták a specifikus transzfer-RNS kötésre. Kísérleteikből arra a következtetésre jutottak, hogy az aminoacil-t-RNS, triplet és riboszoma kötődésben nem csupán a Watson—Crick-típusú komplementer bázis-pár képzés, hanem más tényezők is részt vesznek.

J. Skoda (Prága) az anomális nukleidokat tartalmazó polinukleotidok messenger aktivitásáról beszélt. P. Szafranski (Varsó) természetes messengerek hatását vizsgálta *E. coli* rendszerben. Csehszlovák és szovjet kutatók három előadásban számoltak be a peptidil-t-RNS szintéziséről (I. Rychlich és S. E. Bresler leningrádi munkacsoportja).

A szimpozium befejező témája „Antibiotikumok hatása a riboszomára" címet kapta, de ebben a részben kapott helyet két olyan előadás, amelyeknek a témája a táplálkozási viszonyok hatása a poliszomákra és ezen keresztül a fehérje szintézisre volt. Alexandra von der Decken (Stockholm) rámutatott arra, hogy az aminosav mentes diétán tartott patkányok májában nagyfokú poliszoma bomlás figyelhető meg. Az éheztetett állatok májából izolált mikroszomák in vitro szintetikus aktivitása kisebb, mint az aminosav dús diétán tartott állatokból nyert mikroszomáké. Ez a különbség azonban elmosódik, ha az inkubált rendszer GTP-t is tartalmaz. Lehetségesnek látszik, hogy a GTP kötődik egy gátló faktorhoz, ennek alátámasztására azonban még további kísérletek szükségesek.

Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban álltak H. N. Munro (Cambridge, USA) eredményei. Ő az aminosav keverékkel etetett állatoktól egy eszenciális aminosavat, triptofánt vont el. Ennek következtében nagyfokú poliszomabomlást, majd később riboszomális alegységek felszabadulását lehetett megfigyelni.

Ténylegesen antibiotikum hatással csak három előadás foglalkozott. Szerzőik D. Vazquez (Madrid), Helga Kersten és W. Kersten (Münster) átfogó képet nyújtottak az antibiotikumok riboszomákra és a riboszoma nukleinsav szintézisére gyakorolt hatására.

Beszámolóm végére érve, ezúton is szeretném megköszönni a Magyar Tudományos Akadémiának, hogy kiküldetéssel lehetővé tette számomra a részvételt ezen a színvonalas és nagyon érdekes szimpoziumon.

MODERN FIZIKAI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA
A BIOLÓGIAI KUTATÁSBAN CÍMŰ KOLLOKVIUM
Tihany, 1967. szeptember 18—20

KRISTÁLY ÉS MOLEKULASZERKEZET VIZSGÁLATA RÖNTGENDIFFRAKCIÓVAL

SASVÁRI KÁLMÁN

MTA Központi Kémiai Kutató Intézete, Budapest

A tudomány mai állása és követelménye mellett mindazokon a szakterületeken, ahol az anyagok mechanikai, kémiai, fizikai vagy akár élettani sajátságaival foglalkoznak, nem lehet megelégedni azzal, hogy ismerjük az anyag kémiai összetételét. Emellett ismernünk kell az anyagban uralkodó energiaviszonyokat, amelyek meghatározzák az anyagi tulajdonságot mechanikai igénybevételnél, elektromos vezetésnél, kémiai reakciónál, élettani folyamatoknál stb. Az energiaviszonyok elsősorban attól függnek, hogy milyen az anyagot alkotó atomok elektronhéjszerkezete, viszonylagos mérete és szilárd, mondjuk kristályos fázisban és állandó konformációjú molekulában az atomok térbeli elrendezése, mely utóbbi az előzőknek következménye, de egyes esetekben az előállítás körülményeitől függően különböző is lehet.

Az atomok elektronhéjszerkezetének és az összetett anyag elektroneloszlásának energiaátmeneteire a spektroszkópiai módszerek adnak felvilágosítást és lehetőséget kvantitatív értékelésre. Néhány egyszerűbb esetben a spektroszkópiai eredményekből spekulatív úton a molekula konformációjára is lehet következtetni. Az atomok térbeli elrendezésének direkt meghatározására, azt lehet mondani mint kizárólagos módszer, a röntgendiffrakció ad lehetőséget. Elvileg minden esetben, amikor valamely anyag kristályos állapotban előállítható, az atomok geometriai elrendezése a röntgendiffrakciós kép alapján meghatározható.

Szilárd halmazállapotban az anyagok csaknem kizárólag mind kristályos fázisban jelennek meg. Ezen szerkezeten belül az anorganikus molekulák nem ismerhetők fel, és az atomok geometriai elrendezésének meghatározása az atomok koordinációját és a koordinációs csoportok kapcsolódását adja. Egészen más a helyzet az organikus molekulákat illetően. Ezek kisebb torzulástól eltekintve, konformációjukat megtartják akkor is, amikor szilárd fázisban kristályrácsba épülnek be. Ezért a röntgenszerkezet-vizsgálatnak az organikus és biológiai molekulák szerkezetmeghatározásánál igen nagy jelentősége van.

A röntgendiffrakció segítségével az atomok geometriai elrendezése ma már igen nagy biztonsággal határozható meg, és ennek alapján igen meg-

bízható intra- és intermolekuláris kötéstávolságokat és kötési szögeket kaphatunk. Ezek szolgáltatják a ma mindinkább előtérbe kerülő modern kvantumkémiai számítások kiindulási adatait.

A mai előadásomban nem kívánok belemélyedni a röntgendiffrakciós módszer részleteibe, és arra sem akarok rámutatni, hogy mint sajátítható el ez a módszer. Ez ma már annyira komplex, hogy egész embert követel. Ezért inkább csak rövid képet szeretnék adni arról, hogy mi az, amit a röntgendiffrakciós módszer nyújtani tud azok számára, akik valamilyen szempontból molekulaszerkezet után érdeklődnek. Ezzel burkoltan talán már meg is mondottam, hogy a módszer legeredményesebben akkor alkalmazható, ha a tisztán szerkezetkutató olyan kristályos anyag- vagy molekulaszerkezet meghatározásával foglalkozik, amely valamely határozott céllal egy más területen dolgozó szakembert, pl. kémikust vagy biológust érdekli. Ilyen esetben a szerkezet meghatározása nem a szerkezetért önmagáért történik, hanem egy előre kijelölt cél érdekében, amelyet a kémikus vagy biológus jelölt ki, aki teljes figyelmével csak az anyag előállításával és annak sajátságainak vizsgálatával foglalkozik, felhasználva a szerkezetkutatás eredményét. Ezzel azt akarom igazolni, hogy a szerkezetkutatás legeredményesebben kooperációs munka keretében végezhető. Ennek azonban alapfeltétele, hogy mindazok, akik a röntgendiffrakciós vizsgálatok eredményeit ilyen módon akarják felhasználni, némileg belelássanak a módszer lényegébe.

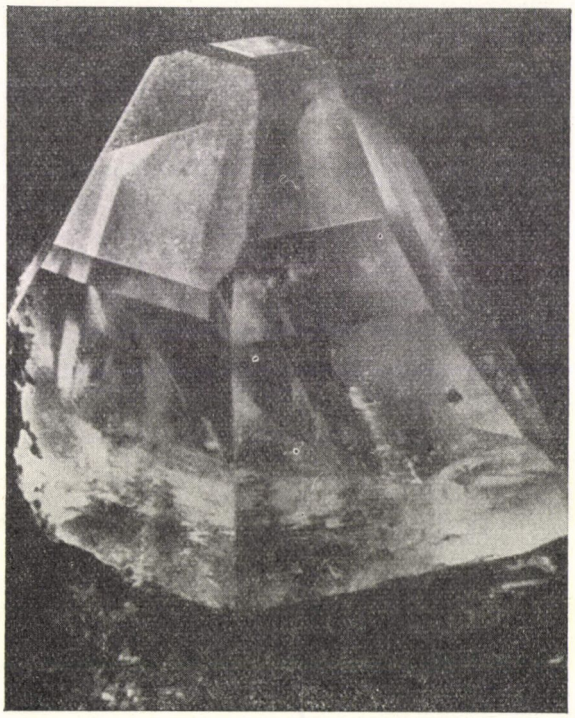
Ennek a célnak elérése végett úgy gondoltam, hogy először a szerkezetmeghatározás röntgendiffrakciós módszeréről rövid áttekintést adok. Utána egy konkrét példán, az általam meghatározott $C_{12}H_{20}$ szerkezeten bemutatom a szerkezetmeghatározás menetét és a belőle nyerhető eredményeket. Ebből látni fogjuk, hogy a módszer alkalmas arra, hogy a molekula konformációját meghatározzuk, a molekula és molekulán belüli atomok hőmozgását tanulmányozzuk. Olyan esetekben, amikor a kristály, ill. molekula csak könnyű atomokból áll, mód van arra is, hogy a hidrogének helyét is közvetlenül meghatározzuk. Ez utóbbi igen fontos tény a szerkezetben előforduló hidrogénkötések felfedése érdekében. Közben rá fogok mutatni azokra a tényezőkre is, amelyek a vizsgálati eredmények pontosságát befolyásolják.

A röntgendiffrakciós vizsgálatok kristályos anyagokon végezhetők el. A kristály szerkezetének vizsgálatához meghatározott nagyságú egykristályra van szükség.

Először arra a kérdésre kell felelnünk, hogy mit is nevezünk egykristálynak.

A kristály általában már morfológiájából, külső megjelenéséből felismerhető (1. ábra). Szabályos lapok határolják, amelyek határozott élekben metszik egymást. A lapok elrendezése a kristályra jellemző szimmetriát is elárulja. Ez a megjelenés azonban csak kísérője annak a belső atomi elrendeződésnek, amely mellett a szilárd fázist kristálynak nevezzük.

Kristályos fázisnak nevezzük az atomoknak vagy molekuláknak olyan szabályos térbeli elrendezését, amelyben bármely irányban minden atom egy, az illető irányra jellemző periódus szerint ismétlődik. Ilyen elrendezésben mindig kijelölhető egy legkisebb térbeli egység, parallelepipedon, amelynek szabályos ismétlődéséből épül fel a makroszkopikus kristály, amelynek morfológiája az atomelrendezés szimmetriáját tükrözi. Egy síkbeli periodikus



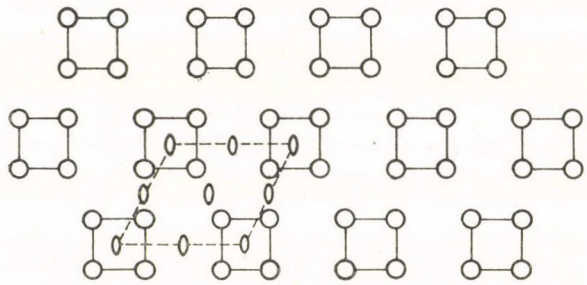
1. ábra. Topáz egykristály ($Al_2[F_2/SiO_4]$)

ismétlődést láthatunk a 2. ábrán. A legkisebb térbeli egységet a kristály elemi testének nevezzük. Ez az egy csúcsban összefutó három él viszonylagos nagyságától és az élek által bezárt szögektől függően a hét kristályrendszer egyikébe tartozhat. Az elemi testen belül az atomok a kristályra jellemző szimmetriák szerint sokszorozódnak. Ezek közül a pontszimmetriák azok, amelyek a makroszkopikus kristályon is felismerhetők. Az elemi testen belül azon atomok összességét, amelyek között nincsen szimmetriával kapcsolt, az elemi test aszimmetrikus egységének nevezzük. Az elemi test összes atomjainak térbeli elrendezése jelenti a kristály szerkezetét.

Ezek szerint a kristály szerkezetének meghatározása első fogalmazásban azt jelenti, hogy meghatározzuk az elemi test tengelyhosszait, szögeit és az

aszimmetrikus egységben levő atomok koordinátáit a tengelyhosszúságok mint egységek törtrészeiben kifejezve. Mindez a röntgendiffrakciós kép alapján történhet, amint azt a következőkben röviden látni fogjuk.

Vegyünk egy makroszkopikus kristályt, amelynek lineáris méretei 0,05—0,2 mm között vannak. Az elmondottak alapján ez annyi atomok által alkotott azonos térhálózatok egymásba tolt sorozatából áll, ahány atom van az elemi testben. Ennek egész egyszerű szemléltetését láthatjuk a 3. ábrán. Eszerint a makroszkopikus kristály atomokból álló térbeli rácsnak tekinthető. Ha ezt egy olyan sugárzással világítjuk meg, amelynek hullámhossza a rács identitásaival azonos nagyságrendű és a kristályon elhanyagolható abszorpció-



2. ábra. Síkbeli alakzat periodikus ismétlődése. Az alsó bal oldali sarokban az elemi cellát láthatjuk szimmetria elemeivel

val halad át, akkor az optikai fényelhajláshoz hasonló jelenséget észlelünk. Ilyen célra monochromatikus röntgen-, neutron- vagy elektronsugárzást használhatunk fel. Az utóbbi nagy abszorpciója miatt csak igen vékony felületi rétegek vizsgálatára alkalmas. Mi a továbbiakban a röntgendiffrakciós vizsgálatokkal foglalkozunk.

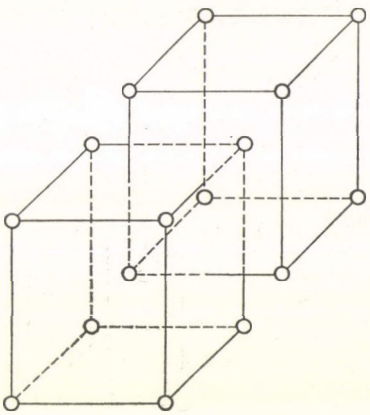
A kristályrácsban az atomi távolságok Å nagyságrendűek. Ilyen hullámhosszúságú röntgensugárzás csak könnyű atomokat tartalmazó kristályon halad át elhanyagolható abszorpcióval, ha annak mérete a fent megadott 0,05—0,2 mm. Ha egy ilyen méretű kristályt monochromatikus párhuzamos röntgennyalábbal világítjuk meg és a kristály után a direkt röntgenirányra merőlegesen fotográfiai lemezt helyezünk el, akkor azon bizonyos szabályszerűséggel elhelyezkedő diszkrét interferenciapontok sokaságát kapjuk. Ezt láthatjuk a 4. ábrán, amelynek magyarázatára később még visszatérünk. Az egyes interferenciapontokat azzal a három kis egész számmal (h, k, l) szokás jelölni, amelyek a diffrakció háromdimenziós rendjét adják.

Bragg már igen korán rámutatott arra, hogy a térbeli rács (hkl)-rendű diffrakciója úgy is értelmezhető, mint a kristály (hkl) Miller-indexű kristálytani síkjának röntgenreflexiója. A kristálytani síkról való reflexió feltételét az ugyancsak Braggtől származó

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d\,(hkl) \cdot \sin \vartheta \qquad (1)$$

egyenlet fejezi ki, ahol n a reflexió rendjét, d (hkl) a (hkl) Miller-indexű kristálytani sík identitástávolságát, ϑ pedig a reflexiós szöget jelenti, amelyet a síktól mérünk. Ennek kétszerese a direkt röntgensugárzás irányától számított diffrakciós szög. A röntgendiffrakciónak ilyen értelmezéséből származik, hogy a röntgendiffrakciós pontok helyett röntgenreflexiókról szokás beszélni.

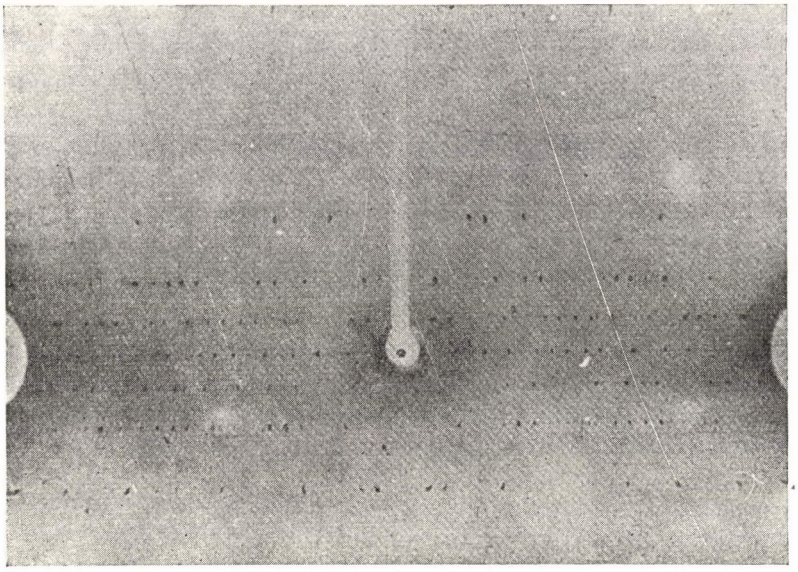
A (hkl) Miller-indexek kis egész számok, amelyek úgy aránylanak, mint a kristálytani sík tengelymetszeteinek reciprokai. Ilyenformán a kristálytani sík identifikálásához használhatjuk őket.



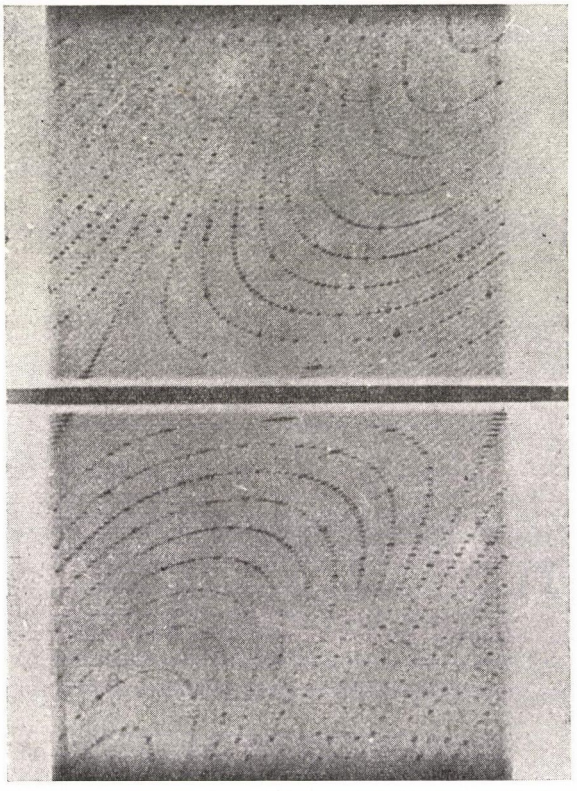
3. ábra. Egymásba helyezett két azonos alakú és nagyságú pontrács, egyetlen elemi testtel

A kristálytani síkok röntgenreflexiója az optikai fényvisszaverődéshez hasonlóan történik, azzal a megkötéssel, hogy röntgenreflexió csak diszkrét reflexiós szögek mellett lehetséges, amelyek a Bragg-egyenletet kielégítik. Ha tehát egy kristályról az összes lehetséges röntgenreflexiókat meg akarjuk kapni, akkor a kristályt a röntgensugár útjában forgatni kell, hogy a különböző kristálytani síkok az időben egymás után reflexiós helyzetbe kerüljenek. Ha a kristályt valamelyik kristálytani tengelye körül forgatjuk, amely a direkt röntgensugár irányára merőleges, akkor a direkt röntgensugár irányára ugyancsak merőlegesen elhelyezett fotografiai lemezen a 4a ábra szerinti röntgendiagramot kapjuk. Ez az ún. forgókristály felvétel. A kristály forgatását valójában úgy értjük, hogy bizonyos szögintervallumban oszcilláltatjuk. Amennyiben a kristály oszcillációjával szinkron a fotografiai lemezt az ekvátor síkjára merőlegesen állandó szögsebességgel elmozdítjuk, a 4b ábrán látható ún. Weissenberg-felvételt kapjuk.

A röntgenreflexiók könnyebb matematikai kezelése végett a kristályrácsot a hozzárendelhető reciprok rácsával szokás helyettesíteni. A kristály-



a)



b)

4. ábra. a) Oszcillációs röntgenfelvétel, b) Weissenberg-felvétel. Mindkét esetben a kristály forgatása kristálytani tengely körül történt

rácshoz a reciprok rácsot szemléletesen úgy szerkeszthetjük meg, hogy minden (*hkl*) Miller-indexű síkhoz meghúzzuk a rács kezdőpontjából kiinduló normálist, és ezen a kezdőponttól $1/d$ távolságú pontot megjelöljük. Itt d a kristálytani síknak a rács kezdőpontjától való távolságát, vagy más szavakkal a sík identitástávolságát jelenti, amely távolságban az azonos kristálytani síkok követik egymást. Az így megszerkesztett pontok összessége a reciprokrács. Ebben a reciprokrácsban a kristály minden egyes síkjának egy pont felel meg, melynek koordinátái azonosak a sík (*hkl*) Miller-indexeivel. A reciprokrács bevezetésével, mint az matematikailag könnyen megmutatható, a kristálytani sík reflexiója a reciprokrácspont reflexiójával helyettesíthető. Abban a helyzetben, amelyben a sík reflexiós helyzetben van, a reciprokrácspontja egy alkalmasan megadható ún. reflexiós gömb felületén van. Így értelmezhetjük a reflexió feltételét a reciprok rácsban.

A röntgendiffrakciós felvételek készítéséhez különböző felvételi módszerek állnak rendelkezésre, amelyek lehetővé teszik, hogy a lehetséges reflexióknak legalább 75—80%-át megkaphassuk, amit szükségessé tesz az, hogy a szerkezet meghatározásához sok reflexiós adatot kell felhasználnunk.

A röntgendiagramon megjelenő reflexiók geometriai elrendezéséből az elemi test tengelyhosszúságait és szögeit, a reflexiók intenzitásai alapján pedig az atomok helyét határozhatjuk meg az elemi testben.

Az elemi test V térfogatának, a kristály s sűrűségének és a kérdéses kristályos anyag kémiai összetételének (M, molekulasúly) ismeretével az elemi testben levő molekulák számát a

$$Z = \frac{V \cdot s}{1{,}66\, M} \qquad (2)$$

képlet alapján számíthatjuk ki.

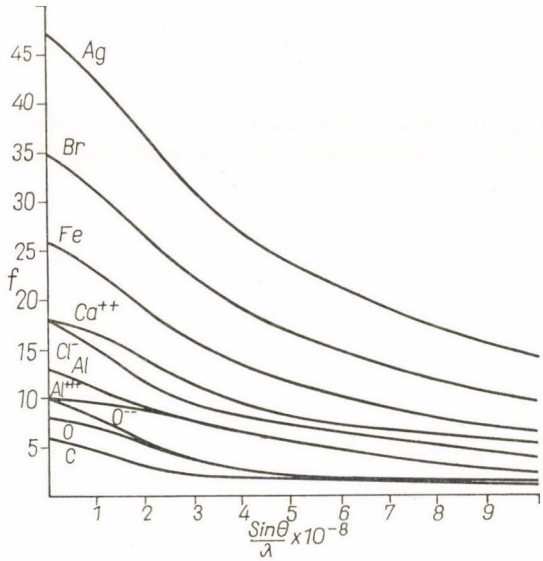
Amikor a kristályt röntgensugárzással megvilágítjuk, akkor minden atom külön-külön a ráeső röntgensugárzást a tér minden irányában szórja. Ez a szórás az atom elektronjain történik, és azért annál nagyobb, minél több elektronja van az atomnak.

Az atom elektronfelhőjének kiterjedése olyan, hogy bármely két pontjából szórt sugárzás koherens, és azért a különböző irányokban szórt párhuzamos sugarak interferálódnak. Az interferencia mértéke annál nagyobb, minél nagyobb a szórási szög a direk röntgenirányhoz képest. Ha az interferenciát minden irányban az atom egész térfogatára összegezzük, megkapjuk az atomok ún. röntgenszórási görbéjét.

Az atomok szórásgörbéjét néhány esetben sikerült kísérletileg meghatározni. Arra az esetre, amikor az atomok elektroneloszlása gömbszimmetrikus, a röntgenszórási görbéket elméletileg többen is számították. A kísérletileg meghatározott és elméletileg számított görbék minden esetben megegyeznek, azért a számított szórási görbéket minden atomra elfogadhatjuk.

Az atomszórási görbéket $\sin\vartheta$, ill. $\sin\vartheta/\lambda$ függvényében szokás megadni, ahol 2ϑ a szórási szöget, λ pedig a hullámhosszúságot jelenti. A szórási görbék viszonyszámokat adnak meg, amelyek bármely szórási szögnél megadják az atomnak egyetlen elektronhoz viszonyított szórását. A direkt irányban, ahol interferencia nem lép fel, ez éppen az atom elektronjainak számával egyenlő. Ettől eltérő irányokban az atomi szórástényező az 5. ábra szerint változik.

A számított atomi szórásgörbék arra az esetre vonatkoznak, amikor az atomok nyugalomban vannak. Az atomok a kristályrácsban általában ter-



5. ábra. Néhány atom röntgenszórás görbéje

mikus mozgást végeznek egyensúlyi helyzetük körül. Ilyen esetben a röntgenszórás kissé elmosódik és a szórásgörbék az

$$f = f_0 \cdot \exp\left(-B\frac{\sin^2\vartheta}{\lambda^2}\right) \tag{3}$$

egyenletnek megfelelően módosulnak. Az egyenletben f_0 az atom nyugalmi szórástényezője, B pedig az u termikus rezgésamplitúdóval ($B = 8 \cdot \pi^2 \cdot u^2$) összefüggő izotróp hőmozgástényező.

Az atomok hőmozgása rendszerint anizotróp, amikor is a hőmozgás burkolófelülete ellipszoid. Ilyen esetben a hőmozgástényező 6 parameterrel van képviselve. Ezeknek bevezetése szemléletesen a $\sin^2\vartheta/\lambda^2$ kifejezésnek a reciprok rácsvektorokkal kifejezett alakjával történhet. Eszerint

$$\sin^2 \vartheta/\lambda^2 = \frac{1}{4}(h^2 a^{*2} + k^2 b^{*2} + l^2 c^{*2} + 2hka^* b^* \cos \gamma^* + 2hla^* c^* \cos \beta^* + \\ + 2klb^* c^* \cos \alpha^*), \quad (4)$$

ahol a *-gal jelölt mennyiségek a reciprokrács tengelyei, ill. szögei. Ha ezen kifejezés minden egyes tagjához külön hőmozgástényezőt rendelünk és a kifejezés állandó tagjait (reciprokrács parametereit) is ebbe belevonjuk a fenti exponenciális tag a következő alakba megy át

$$\exp(-(b_{11} h^2 + b_{22} k^2 + b_{33} l^2 + 2b_{12} hk + 2b_{13} hl + 2b_{23} kl)) \quad (5)$$

Amint tehát látható, a kristályszerkezet meghatározása tágabb értelemben azt jelenti, hogy minden atomhoz a helyzetkoordinátákon kívül még 6 hőmozgástényezőt is meg kell határozni.

A kristályrács, amint mondottuk, az elemi test atomjaiból alkotott azonos alakú és nagyságú pontrácsok egymásba tolt sorozata. Ezek mindegyikére az interferencia feltételek azonos irányokban érvényesülnek. Mint koherens sugarak, ezek egymás között újabb interferenciát eredményeznek, és végeredményben az atomok szórása a két egymást követő interferencia befolyásával eredményezi a röntgenreflexiók intenzitását.

Az eredő intenzitáshoz minden atom hozzájárul azzal a fázissal, amelyet az illető atomnak az elemi test kezdőpontjához viszonyított helyzete határoz meg. A kezdőpontot az egymásba tolt atomi rácsok bármelyikének sarokpontjában rögzíthetjük. Ezzel megtaláltuk a módját annak, hogy bármely interferencia irányban kiszámítsuk az eredő fényvektort, amely általános esetben

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^{N} f_j \cdot \exp 2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j) \quad (6a)$$

alakban adható meg. Olyan esetben, amikor a kristálynak szimmetriaközpontja van, és a kezdőpontot ebbe helyezzük, akkor a kifejezés az

$$F(hkl) = \Sigma f_i \cdot \cos 2\pi (hx_i + ky_i + lz_i) \quad (6b)$$

alakba megy át. A (6) egyenletben f_i az i-ik atom röntgenszórástényezője hőmozgás nélkül a reflexió $\sin \vartheta/\lambda$ értékénél, x_i, y_i, z_i az i-ik atom helyzetkoordinátái az elemi testben, N pedig az elemi testben levő összes atomok száma. Az $F(hkl)$ eredő fényvektort a (hkl) reflexió struktúrfaktorának nevezzük.

A struktúrfaktor ismeretével, felhasználva a tényt, hogy a rezgések erőssége az amplitúdó négyzetével arányos, meg tudjuk adni a röntgenreflexiók erősségét, amely

$$I(hkl) = A \cdot \Theta(hkl) \cdot F^2(hkl) \tag{7}$$

alakban írható fel. Az A arányossági tényező univerzális állandókat tartalmaz, a kristályra jellemző és ugyanazon kristály minden reflexiójára ugyanaz. $\Theta(hkl)$ geometriai tényező, amely korrekcióba veszi azokat a változásokat, amelyek részben a röntgensugárzás polarizációjától, részben onnan származnak, hogy a különböző reflexiók időtartama nem azonos.

A (7) egyenlet szerint, ha ismerjük a kristály szerkezetét, akkor ki tudjuk számítani bármely (hkl) síkhoz tartozó reflexiójának $F(hkl)$ strukturfaktorát, ill. $I(hkl)$ intenzitását. Ezzel kezünkben is van már a módszer, amely a kristály szerkezet meghatározásának alapját képezi, és amely a következőképpen fogalmazható meg:

Röntgenfelvételek alapján meghatározzuk az ismert kémiai összetételű és sűrűségű kristálynak az elemi testét és a röntgenreflexiók erősségét. Próbaképpen felállítunk egy valószínű szerkezeti modellt, ennek megfelelően elhelyezzük az atomokat az elemi testben, és az így kapott atomkoordináták segítségével kiszámítjuk a (6) és (7) egyenletnek megfelelően a röntgenreflexiók erősségét. Ha ezek csak sorrendben is megegyeznek azokkal, amelyeket mértünk, akkor a próbamodellünk a keresett kristályszerkezetet jelenti. Ellenkező esetben a modellen, ill. az atomkoordinátákon addig változtatunk, amíg a mért és számított intenzitások meg nem egyeznek. Ez az ún. próbálkozás (trial and error) módszer. Megjegyezzük, hogy a szerkezeti modell készítésénél, ill. később az atomkoordináták változtatásánál nem szabad figyelmen kívül hagyni az atomátmérőket, ill. az ezekből következő minimális interatomáris távolságokat.

A próbálkozás módszerét sokáig igen jó eredménnyel alkalmazták. Főleg csak nem túl bonyolult és anorganikus szerkezeteknél használható eredményesen, amelyekben nehéz atomok vannak jelen. Nehezebb atomok kis elmozdítása már érezhető változást okoz a reflexiók számított strukturfaktorában. Nagyon nehézkes vagy egyáltalán nem használható ez a módszer organikus szerkezeteknél, amelyek igen nagyszámú könnyű atomból állnak.

Ilyen esetekben is sikerül a szerkezet meghatározása, amióta a nagysebességű elektronikus számítógépek felhasználásával gyakorlatilag is lehetségessé vált a Fourier-szintézis alkalmazása. Ennek lényegére a következőkben kívánok röviden rámutatni.

A kristályrácsban az atomok térbeli elrendezését azok elektronsűrűség eloszlásával helyettesíthetjük. Ez esetben az atomok helyét az elektronsűrűség eloszlásának maximumai adják. Az elektronsűrűség eloszlás a térben háromszorosan periodikus függvény, amely Fourier-sorfejtéssel a következő alakba írható

$$\varrho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h} \sum_{k}^{+\infty} \sum_{l} F(hkl) \cdot \exp\left(-2\pi i(hx + ky + lz)\right). \tag{8a}$$

Az $F(hkl)$ Fourier-együtthatók nem mások, mint a (hkl) reflexiókhoz tartozó strukturfaktorok, amelyek abszolút értékét a reflexiók erősségének mérésével határozzuk meg, x, y, z az elemi test azon pontjának koordinátái, amelyben az elektronsűrűséget számítani akarjuk, V pedig az elemi test térfogata.

Az elektronsűrűség kifejezése egyszerűsödik abban az esetben, amikor a kristálynak szimmetriaközpontja van. Ekkor a fenti kifejezésnek csak a valós része marad meg, azaz

$$\varrho(xyz) = \frac{2}{V} \sum_{h} \sum_{k}^{\infty} \sum_{l} F(hkl) \cdot \cos 2\pi(hx + ky + lz) \qquad (8b)$$

Ebből a kifejezésből kitűnik, hogyha sikerül a röntgendiffrakciós felvételek alapján meghatározni a reflexiók $F(hkl)$ strukturfaktorait, éspedig kellő számban, akkor minden előzetes próbamodell mellőzésével, csupán számolási eljárással, meg lehet határozni az elemi testben az atomok elektronsűrűség eloszlását, ill. ezek maximumainak helyén az atomok koordinátáit. Ugyanebből a kifejezésből az is kitűnik, hogy az elektronsűrűség eloszlást annál nagyobb pontossággal kapjuk meg, ill. annál jobb feloldást kapunk, minél magasabb rendekig mehetünk el, azaz minél több strukturfaktort ismerünk. Ezért hangsúlyoztuk már elöljáróban, hogy a lehetséges reflexióknak legalább 75—80%-át meg kell határoznunk.

Azáltal, hogy a Fourier-sorfejtésben a magasabb rendű reflexiókat is figyelembe vesszük, csökkentjük az alapszórást, amely az elektronsűrűségeloszlás maximumait mossa el.

A Fourier-szintézis kivitelezésénél két nagy nehézséggel állunk szemben. Egyik a nagy mennyiségű számítás kivitelezése, a másik a strukturfaktorok fázisának meghatározása, amely centroszimmetrikus esetben előjelmeghatározásra egyszerűsödik.

A számítás kivitelezése háromdimenziós esetben azt jelenti, hogy a fenti összegzést szerencsés esetben, amikor szimmetria okok miatt a számítást csak a negyed cellára kell elvégezni, minimálisan 27 000 pontban kell elvégezni. Organikus szerkezeteknél közepes molekulák esetén is már a strukturfaktorok száma 2—3000 között mozog. A teljes számításnál tehát több mint 50 000 000 szorzattagot kell elkészíteni és összegezni. Ezt egyszerű kézi erővel egy emberöltő alatt sem lehetne elvégezni, de a közben kidolgozott segédeszközök, mint Beevers Lipson-szalagok felhasználásával is igen sok időbe telne ez a számítás.

A számítással kapcsolatos nehézséget ma már könnyen le lehet győzni a nagy memóriájú és sebességű elektronikus számítógépek felhasználásával. Olyan számítógéppel, amely mp-ként 100 000 szorzási műveletre képes, az imént említett nagy számolási feladat kb. 25—30 perc alatt végezhető el. Ez már minden tekintetben kielégítő sebesség még akkor is, ha figyelembe

vesszük, hogy egy szerkezet teljes meghatározásához a Fourier-szintézist néha 8—10 alkalommal is el kell végezni, hogy az atomparametereket kellő pontossággal kapjuk meg.

Magyarországon a megfelelő elektronikus számítógép pillanatnyilag még problémát jelent. Az MTA tervében már szerepel egy olyan számítógépnek a beszerzése, amely a szerkezetvizsgálattal kapcsolatos igényes számítások elvégzését is lehetővé teszi. Reméljük, hogy ez a terv hamarosan meg is fog valósulni.

A Fourier-szintézis alkalmazásának másik nagy nehézsége, hogy a reflexiók mért intenzitásaiból a (7) egyenlet szerint az $F(hkl)$ struktúrfaktoroknak csak az abszolút értékét tudjuk meghatározni, de semmit nem tudunk még akkor azok fázisáról, ill. centroszimmetrikus kristályoknál azok előjeléről.

Ugyancsak a számítógépek felhasználásával ma már több olyan módszer áll rendelkezésre, amely ezen a nehézségen is átsegít. Első ilyen a Patterson-függvény számítása, amelyet Patterson már 1935-ben vezetett be, de számítási nehézségek miatt csak jóval később került gyakorlatilag felhasználásra.

A Patterson-függvény számításánál azt tesszük, hogy sorra vesszük az összes vektorokat, amelyek az elemi test kezdőpontjától a cella előre megfelelően sűrűn kijelölt hálózati pontjaihoz vezetnek. Minden egyes ilyen vektor kezdőpontját végigfuttatjuk az előbb mondott hálózati pontokon, és minden egyes helyzetben elkészítjük a vektor kezdő és végpontjában található elektronsűrűség szorzatát. Ezeket a szorzatokat minden vektorra külön az összes hálózati pontokra összegezzük.

Ha a Patterson-függvény számításánál használt vektor (u, v, w) koordinátákkal van megadva és kezdőpontját a cella (x, y, z) koordinátájú pontjába visszük, akkor a kezdő és végponthoz tartozó elektron sűrűségek szorzata

$$\varrho(x, y, z) \cdot \varrho(x + u, y + v, z + w)$$

alakban írható fel. Ha ezt a szorzatot a cella minden egyes (x, y, z) pontjához elkészítjük és összegezzük, akkor a Patterson-függvény (u, v, w) vektorához tartozó értéket kapjuk, amely integrál alakban felírva

$$P(uvw) = \int_0^1\int\int \varrho(xyz) \cdot \varrho(x + u, y + v, z + w)\, dx dy dz \qquad (9)$$

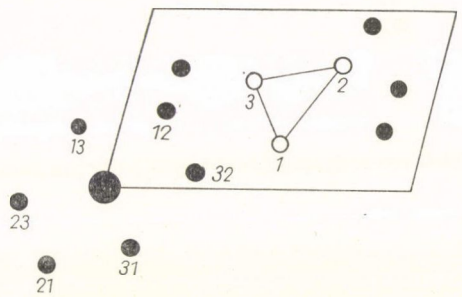
Az így definiált Patterson-függvényt, mint azt a Fourier-függvény segítségével matematikailag levezethetjük, a

$$P(uvw) = \frac{2}{V^2} \sum_h \sum_k^{\infty} \sum_l |F(hkl)|^2 \cdot \cos 2\pi (hu + kv + lw) \qquad (10)$$

alakban fejezhetjük ki.

Ez számítástechnikailag ugyanazt a munkát jelenti, mint amit Fourier-szintézisnél előbb láttunk. A különbség csak az, hogy benne a strukturfaktorok négyzetei szerepelnek, tehát nincsen szükség azok fázisaira. A függvény képe ugyancsak az elemi test belsejére korlátozott maximumok sorozata, azonban a Fourier-függvénnyel szemben más jelentéssel.

Ha a Patterson-függvénynek az (*uvw*) pontban maximuma van, az azt jelenti, hogy a szerkezetben van legalább egy olyan atompár (nem szükségszerűen azonos atomok), amelyeknek egymáshoz viszonyított iránya és távolsága az (*uvw*) vektorral adható meg. A Patterson-függvény tehát a szerkezet minden egyes interatomáris vektorához egy maximumot rendel, melynek nagysága a kérdéses két atom elektronszámainak szorzatával arányos.



6. ábra. Sematikus ábrázolásban centrikus elemi test olyan három atomjának Patterson-függvénye, amelyekkel a kezdőpont egy síkban van. A Patterson-csúcsok a megfelelő két atom sorszámával vannak jelölve

Tegyük fel, hogy az elemi testben N számú atom van. Az összes lehetséges párosítás folytán az elemi testbe eső összes Patterson-csúcsok száma N^2, amelyekből N a kezdőpontba esik. Ez utóbbiak eredője az egymástól zéró távolságra levő atomok elektronsűrűségének szorzatösszegét jelenti. A kezdőpontba eső maximum súlya tehát ΣZ_i^2, ahol Z_i az i-ik atom elektronjainak számát jelenti. A Patterson-függvénynél tehát az elemi testben $N(N-1)$ csúcs foglalja el azt a helyet, amit a direkt rácsban N atom tölt ki. Ez azt jelenti, hogy a Patterson-függvényben a csúcsok erősen szuperponálódnak.

A 6. ábrán sematizálva látható egy elemi test három atomjának Patterson-függvénye arra az esetre egyszerűsítve, amikor a kezdőpont a három atommal egy síkban van. Megállapítható, hogy az összes Patterson-csúcsok száma 6, és ezek megfelelő csoportosítással a három atom által alkotott szerkezetet annyiszor adják, ahány atom van, tehát háromszor. Ez igaz általános esetben is, vagyis a Patterson-függvényben a maximumok összessége tartalmazza a kristályszerkezetet N-szer egymásra szuperponálva, ha N az összes atomok száma. Ha tehát találunk egy olyan módszert, amelynek segítségével a szerkezet szerint összetartozó csúcsokat legalább egy példányban ki tudjuk válogatni, akkor a szerkezetet a Patterson-függvény alapján megoldottuk.

Egy ilyen válogatási módszert dolgozott ki BUERGER az általa bevezetett ún. minimum függvénnyel. A minimum függvényt Buerger eredetileg grafikus szerkesztéssel készítette el. Újabban azonban már elektronikus számítógép segítségével a feladat számítással is elvégezhető.

Olyan esetben, amikor a szerkezetben egy olyan nehéz atom is van jelen, amelynek szórása az összes többi atom együttes szórásához képest jelentős, és a kristálynak vagy annak valamelyik két vetületének szimmetriaközpontja van, a Patterson-függvényből a nehéz atom koordinátái meghatározhatók.

Amennyiben a nehéz atom centroszimmetrikus szerkezetben csupa könnyű atomok mellett van jelen, mindazon struktúrfaktorok előjele, amelyekben a nehéz atom nagy súllyal vesz részt, igen nagy valószínűséggel a nehéz atom strukturfaktorának előjelével azonos. Ez a tény lehetőséget ad ahhoz, hogy egyetlen nehézatom koordinátáinak ismeretével, elég nagy számú strukturfaktor előjelét meghatározzuk. Ha ezekkel a struktúrfaktorokkal Fourier-függvényt számítunk, abban mindig megtaláljuk azt az atomot vagy atomokat, amelyek alapján a struktúrfaktorok előjelét meghatároztuk, ezenfelül azonban még újabb atomok is jelentkeznek. Ezek identifikálása a csúcsok relatív magasságából, a molekula konformációjára vonatkozó elképzelésekből stb. közelítőleg megtörténhet. Ezeknek az új atomoknak a figyelembevételével a struktúrfaktor számítást megismételjük, miáltal újabb struktúrfaktorok előjelét kapjuk meg. Ezekkel megismételve a Fourier-függvény számítását, újabb atomokat kapunk. Ezt az eljárást addig ismételjük, míg végül az összes atomokat a hidrogének kivételével megkaptuk. Hidrogének nehéz atomok mellett röntgendiffrakcióval nem határozhatók meg.

Olyan esetben is, amikor a szerkezet csak könnyű atomokat tartalmaz és a szerkezet meghatározása nehézségekbe ütközik, de sikerül izomorf helyettesítéssel (erre még visszatérünk) a molekulába egy nehéz atomot bevinni, az imént leírt módon a szerkezetmeghatározás elvégezhető.

A nehéz atom jelenléte a szerkezetben igen előnyös a szerkezetmeghatározás elindításánál. Előnytelen azonban akkor, amikor a könnyű atomok atomkoordinátáinak pontosabb meghatározására kerül a sor. A Fourier-sor csak véges számú tagból áll, ennek következtében minden egyes atom az elektronsűrűség eloszláshoz egy egyenletes alapot hoz be. Ez annál nagyobb, minél nagyobb az atom rendszáma. Megesik, hogy a nehezebb atom alapszórása nagyobb, mint a nálánál könnyebb atomhoz tartozó csúcs. Ekkor a könnyebb atom csúcsa az alapszórásban elvész. Ilyenkor szerencsés, ha a nehéz atomot a szerkezetből eliminálni tudjuk. Sok esetben segít az is, hogy csak számítás alapján eliminálják, ún. differencia Fourier-szintézis alkalmazásával.

Ez az eljárás, amiről most legutóbb beszéltünk, az ún. nehéz atom módszer. Ezzel a módszerrel eddig meghatározott legösszetettebb szerkezet a B_{12} vitaminé, amelyet 1957-ben HODGKIN határozott meg. Ez hidrogénen kívül 93 atomot tartalmaz, amelyek között Co (27) nehéz atomnak számít.

Az organikus molekulák, de különösen a proteinok szerkezetvizsgálatánál igen fontos szerepet tölt be az ún. izomorf helyettesítés módszere.

Izomorfnak mondunk két kristályt akkor, ha azok kristályszerkezetének atomelrendezése azonos, de egy vagy két atom más atommal van helyettesítve. Így pl. izomorf a $CaCO_3$ és $MgCO_3$, amelyekben a Ca és Mg helyettesíthetik egymást. Izomorf a két földpát, albit $NaAlSi_3O_8$ és $CaAl_2Si_2O_8$, mely esetben a NaSi és CaAl párok helyettesíthetik egymást. A helyettesítő atomok átmérőinek arányában az elemi test nagysága kissé változhat, esetleg az atomok koordinátáiban is történhet 10—15%-os eltolódás, amikor még mindig izomorfiáról beszélünk. Izomorf helyettesítésről beszélünk akkor is, amikor egy atom az eredeti szerkezet egy üres helyére ül be. Ilyenkor az üres hely és a kérdéses atom helyettesítik egymást.

Ilyen izomorf helyettesítés után a nehéz atom módszere követhető. Ezt a módszert már 1936 ROBERTSON használta phtalocyanine szerkezetvizsgálatánál. Ez izomorf a saját Ni deriváltjával.

Az izomorf helyettesítés nehézségei akkor jelentkeznek, amikor a kristály acentrikus. Az organikus kristályok között igen sok az acentrikus és különösen áll ez a proteinok esetében. Ilyenkor nehézkesebb maguknak a nehéz atomok helyének a meghatározása is. S amikor a nehéz atom helyét már ismerjük, további nehézséget okoz a struktúrfaktorok fázisainak a meghatározása.

A proteinok szerkezetvizsgálatánál az izomorf helyettesítés módszere a legcélravezetőbb, azért erre valamivel részletesebben térek ki.

Ahhoz, hogy acentrikus kristálynál a strukturfaktorok fázisait az izomorf helyettesítés módszerével meghatározhassuk, legalább két nehéz atom deriváltra van szükség. Tegyük fel, hogy az eredeti szerkezet mellett két deriváltunk van, és ezekben már ismerjük a nehéz atomok helyét. Ez esetben a két deriváltban a nehéz atomokhoz tartozó strukturfaktorokat fázisaikkal együtt ki tudjuk számítani. Legyenek ezek f_1 és f_2. Az eredeti szerkezet és a két derivált struktúrfaktorainak abszolút értékeit röntgendiffrakciós felvételekből kísérletileg határozzuk meg. Jelöljük ezeket F, F_1 és F_2-vel. Ez utóbbiak fázisait az abszolút értékeikből és az f_1 és f_2 ismeretével HARKER szerint grafikus úton határozhatjuk meg. Nézzük meg röviden, hogy ez mint történik.

Vegyünk fel egy komplex koordináta rendszert, és a kezdőpontból kiindulólag helyezzük el benne az f_1 és f_2 komplex strukturfaktor vektorokat. Mivel ezeket a nehéz atom koordinátákból számítottuk, ismerjük ezek valós és imaginárius komponenseit ($f_1 = A_1 + i \cdot B_1$ és $f_2 = A_2 + i \cdot B_2$), és ezekkel a vektorok szerkesztése könnyen elvégezhető. Ezen vektorok végpontjai körül rajzoljunk egy-egy kört F_1 ill. F_2 sugárral. Ugyancsak rajzoljunk kört a kezdőpont körül F sugárral, amint ez a 7. ábrán látható. A három kör egy pontban metszi egymást. Ennek a pontnak a felhasználásával két vektor-

hármast tudunk felállítani, amelyekből a három szerkezet kérdéses struktúrfaktorait fázisaikkal kapjuk.

Amennyiben csak egy nehéz atom deriváltunk van, az előbbi szerkesztésben csak két kör áll rendelkezésre, és ezek két metszéspontja két megoldási lehetőséget ad. Ezek közül azonban csak az egyik a tényleges. A második nehéz atom derivált tehát arra szolgál, hogy a megoldás kétértelműségét megoldja.

A 7. ábra szerint a fázismeghatározás pontossága erősen függ attól, hogy milyen az f_1 és f_2 értéke az F-hez képest. Ezért gyakran úgy járnak el, ha arra lehetőség van, hogy kettőnél is több nehéz atom deriváltat állítanak elő, hogy ezek alapján a legjobb fázismeghatározást kapják.

Erre a grafikus szerkesztésre azért tértem ki, mert ezzel kapcsolatban fel lehet ismerni azokat a szempontokat, amelyek kell hogy vezessék azokat, akiket egy bonyolultabb molekula szerkezetmeghatározása közelebbről érdekel. Tudni kell, hogy milyen szempontok figyelembevételével lehet a kristályos anyagot úgy előkészíteni, hogy a szerkezetvizsgálat sikerrel járjon.

Egyetlen nehéz atom helyettesítéssel is érhetünk el eredményt nem centroszimmetrikus kristálynál, ha a nehéz atomot és a röntgensugárzás hullámhosszúságát úgy tudjuk megválasztani, hogy anomális diszperzió lépjen fel. Ez akkor következik be, ha a röntgensugárzás hullámhossza a nehéz atom gerjesztési hullámhosszának közelébe esik. Ilyen esetben az acentrikus kristályoknál a Friedel-szabály, mely szerint $F(hkl) = F(\bar{h}\bar{k}\bar{l})$, nem teljesül.

Az anomális diszperzió jelenségét először 1930-ban KOSTER, KNOL és PRINS észlelték ZnS kristályon Au sugárzásnál. Sokkal később, 1951 körül BIJVOET és munkatársai kezdték felhasználni acentrikus szerkezeteknél fázismeghatározásra. 1961-ben BLOW és ROSSMANN használták ezt a módszert a haemoglobin és haemoglobin + 4 $HgCl_2$ esetében.

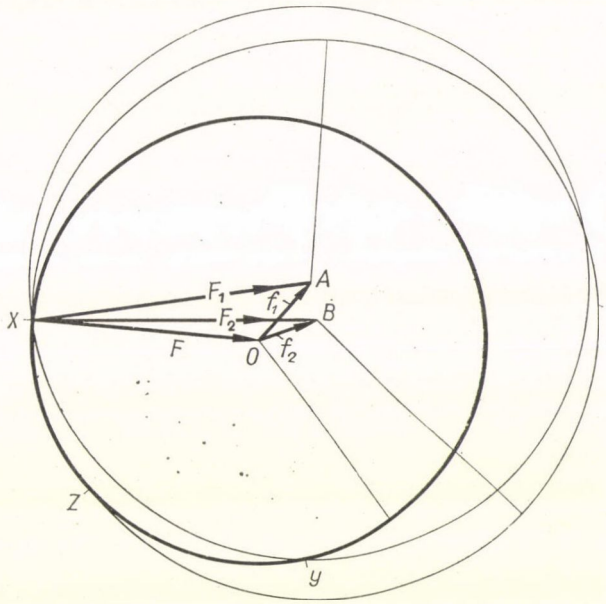
A centroszimmetrikus kristályoknál az előjel meghatározásra ma már igen fontos és elterjedt a statisztikus módszer. Felhasználva azt a tényt, hogy az elektronsűrűség a kristályban sehol sem lehet negatív és az atomok közelítőleg gömbszimmetrikusok, matematikai úton a struktúrfaktorok abszolút értékéből a közepes és ennél nagyobb abszolút értékű struktúrfaktorok előjelét igen sok esetben meg lehet határozni mind centrikus, mind acentrikus kristályoknál.

*

A biológiai molekulák között igen fontos szerepet játszanak a proteinok, amelyek aminosavak polimerizációjával összeállt polipeptid láncok. A proteinokat két csoportba oszthatjuk. Egyik fajta rostszerkezetű, a másik gömb alakú. A rostszerkezetű proteinok párhuzamosan elhelyezkedő polipeptid láncokból állnak. A gömb alakú proteinokban a polipeptid láncok hajtogatva vannak, miáltal a molekula végül is tömör alakot vesz fel.

A gömb alakú molekulák extrahálhatók és tisztítva kikristályosíthatók.

Ily módon röntgendiffrakcióhoz alkalmas egykristályok állíthatók elő. Az első gömb alakú proteinmolekula a pepszin volt, amelyről BERNAL és CROWFOOT 1934-ben röntgendiffrakciós felvételt készített. Ugyanezen iskolában 1935-ben az inzulinról és 1938-ban a haemoglobinról készítettek egykristály röntgenfelvételt. Ezeken a felvételeken megjelent nagyszámú reflexió alapján bizonyossá vált, ha egyszer sikerül megoldani a fázisproblémát, akkor a molekulák szerkezetének meghatározása lehetővé válik.



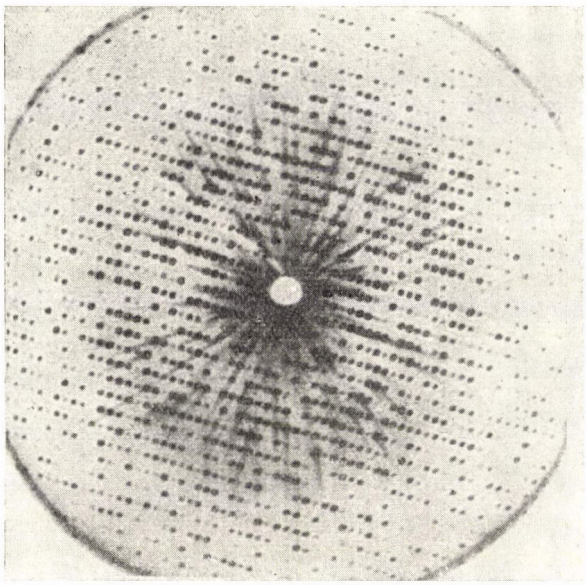
7. ábra. Acentrikus kristály strukturfaktorainak fázismeghatározása Harker-féle grafikus módszerrel, két izomorf derivált segítségével (Magyarázat a szövegben)

GREEN, INGRAM és PERUTZ a haemoglobin vizsgálatával kapcsolatban csak 1954-ben jöttek rá arra, hogy az izomorf helyettesítés módszere felhasználható a fázisok meghatározására. Ily módon sikerült KENDREW és munkatársainak 1958-ban a myoglobin szerkezetét meghatározni. A myoglobinról készült egyik precessziós röntgenfelvétel a 8. ábrán látható. A felvétel igen nagyszámú éles interferencia foltot mutat, ami a sok atomot tartalmazó molekula szerkezetmeghatározásának egyik alapfeltétele. A pontos parameter meghatározáshoz parameterenként általában 10—15 reflexió szükséges. Ezzel a nagy molekuláknál a szükséges reflexiók száma igen magasra emelkedik.

Érdekes megemlíteni, hogy a gömb alakú proteinok kristályrácsában a térfogatnak kb. 50%-át az anyalúg foglalja el, amelyből a proteint kikristályosították. Az oldatban levő molekulák, amelyek a rács molekulái közti teret töltik ki, kevés kivételtől eltekintve rendezetlen állapotban vannak,

és így a röntgendiffrakciós képet lényegében nem zavarják. Ebből a tényből nagyon valószínűnek látszik, hogy a protein molekulák a kristályrácsban majdnem olyan környezetben vannak, mint az oldatban, ill. az élő szervezetben. Tehát konformációja a kristályrácsban biztosan ugyanaz lesz, mint az élő szervezetben.

Ha a proteinkristályokat száradni hagyjuk, akkor a kristályrács összezsugorodik és a molekulák kristályos rendezettsége megszűnik. Ilyen okok miatt feltétlenül szükséges, hogy a röntgenfelvételek készítése közben a protein



8. ábra. A myoglobin precessziós röntgenfelvétele (J. C. KENDREW)

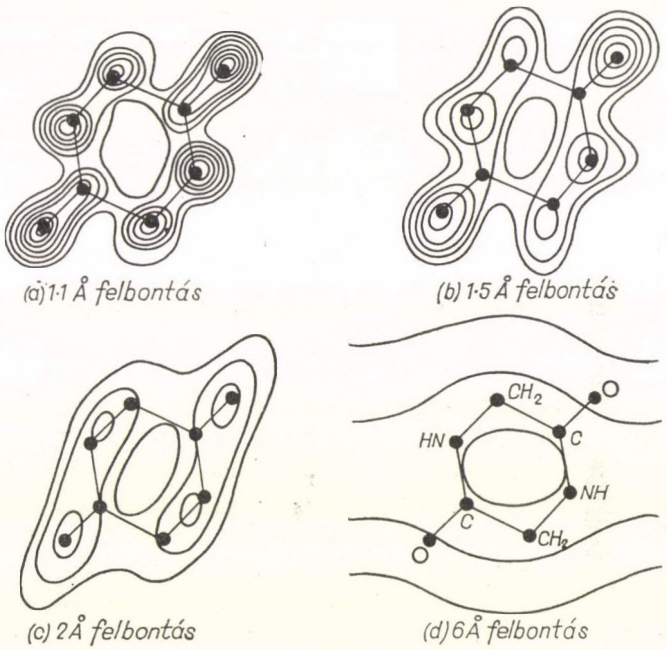
kristályt nedvesen tartsuk. Ezt gyakorlatilag úgy érjük el, hogy a kristályt kevés anyalúg jelenlétében, ami telített gőznyomást biztosít, vékony, kb. 0,01 mm falvastagságú litiumborát kapillárisba zárjuk, ügyelve arra, hogy az anyalúg a kristályt ne érje.

*

A myoglobin molekulasúlya kb. 17 000 és 153 aminosavból álló polipeptid lánc, amelyhez 4 db ötrészes gyűrűből álló csoport csatlakozik. A gyűrűk síkban kapcsolódnak és egy Fe atomot zárnak körül. A myoglobin szerepe, hogy oxigént tároljon az izomszövetekben, és azért különösen nagy mennyiségben a vízbemerülő állatok izomzatában található, pl. bálna, fóka stb. Amikor a myoglobin molekula oxigént vesz fel, az a ferro ionhoz kapcsolódik. Oxigén leadásakor ugyanide valószínűleg víz kapcsolódik. Levegőn a myoglobin Fe atomja igen könnyen ferri ionná oxidálódik. Ebben az állapotban

a proteint metmyoglobinnak hívják. KENDREW az ámbrás cetből vett myoglobin ilyen változatának a kristályszerkezetét határozta meg.

A szerkezetvizsgálathoz több nehéz atom deriváltat állítottak elő. Első alkalommal a proteint ammoniumszulfát oldatból kristályosították ki HgJ^{--} jelenlétében. Máskor a kísérő nehéz atomok $AuCl_4^-$, Ag, higanyammin, p-chloromercuribenzol formájában voltak jelen. A szerkezetvizsgálatot három lépcsőben végezték el. Első alkalommal 400 reflexióval 6 Å-ös felbontást



9. ábra. A diketopiperozin számított háromdimenziós Fourier-metszetei különböző felbontás mellett (HODGKIN, 1960)

értek el. Utána 10 000 flexióval a felbontást már 2 Å-re javították. 1963-ban 25 000 reflexióval 1,4 Å-ig fokozták a felbontást, aminek alapján az 1265 atomból 925-nek a helyét sikerült rögzíteni.

Amint láthatjuk tehát, a Fourier-függvényben a maximumok felbontása attól függ, hogy a számításához hány reflexió strukturfaktorát használtuk fel. Igen szemléletesen mutatja ezt a 9. ábra, amelyen a diketopiperazin háromdimenziós Fourier-metszete látható különböző felbontás mellett.

A nagy molekulák esetében, mint az a proteinoknál is ismeretes, a molekulák gyakran kisebb önálló egységekből épülnek fel. Megkönnyíthető az összetett molekula szerkezetvizsgálata, ha az egyes kisebb egységeket valamilyen formában egyszerűbb kristályrácsban keressük meg és határozzuk meg szerkezetüket. Az összetett molekulák szerkezetvizsgálatánál azután már felhasználjuk a kisebb egységek ismert konformációját.

A jelen előadásban azokkal az esetekkel foglalkoztunk, amikor a vizsgálandó molekula háromdimenziós kristályrácsba vihető. Igen sok esetben, mint az a proteinoknál is gyakran előfordul, a molekula rostszerkezettel jelentkezik. Ez főként csak egydimenziós rendezettséget mutat, amely röntgenreflexiókban szegény diffrakciós képet ad (10. ábra). Ennek következtében nem is várhatjuk, hogy abból a molekula szerkezetét direkt úton meghatározzuk. A rostdiagramból biztosan meghatározható a rosttengely irányú periódus hossza. Amennyiben a rostszerkezetű molekula kisebb egységeihez találunk olyan egyszerűbb kristály módosulatokat, amelyekben a nevezett kisebb egységek egyenként előfordulnak, és ezek szerkezetét röntgendiffrakciós úton meghatározzuk, a rost diagram alapján spekulatív úton az ismert egységekből felépített rostszerkezetű molekula konformációjára is igen jó következtetésekre juthatunk.

Jól felhasználható erre a célra a LIPSON és TAYLOR által kidolgozott optikai diffrakciós módszer. Ennek lényege röviden a következő. Az ismert szerkezetű egységekből a komplex rostszerkezetű molekulának egy valószínű modelljét állítjuk elő. A modellben az ismert szerkezetű egységeknek a rosttengelyhez és egymáshoz való helyzetét kell csak rögzíteni, ill. próbálkozással addig változtatni, amíg a valódi elrendezést a legjobban meg nem közelítjük. Minden alkalommal megrajzoljuk a modell megfelelő vetületét. A modell vetületében az atomok helyén a rendszámmal arányos nyílást vágunk, és ily módon egy maszkot készítünk. Ezt a maszkot az optikai diffraktometer segítségével párhuzamos fénynyalábbal világítjuk meg, és előállítjuk a maszk optikai diffrakciós képét. Ezt összehasonlítjuk a röntgendiffrakciós képpel. A próbamodell a helyes szerkezet utánzata, amikor a röntgen és optikai diffrakciós kép megegyezik. Ez is természetesen egy körülményes út, különösen nagy molekuláknál, de sok esetben megoldáshoz vezethet.

*

Egészen röviden több olyan eljárást ismertettem, amelyek segítségével a röntgendiffrakciós adatokból a kristály, ill. molekula szerkezetét lehet meghatározni. Meg kell azonban jegyezni, hogy nagy gyakorlatra van szükség ahhoz, hogy egyrészt ezeket az eljárásokat eredményesen tudjuk alkalmazni, másrészt felismerjük, hogy egy adott kristály vagy molekula szerkezetének meghatározásához melyik a legjárhatóbb út.

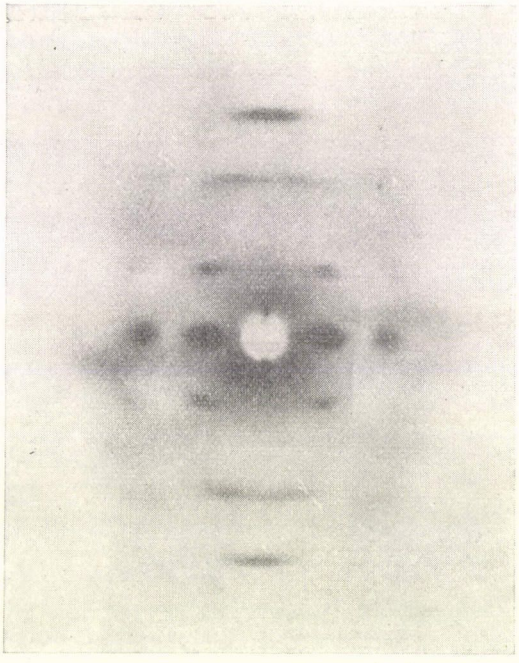
A bicyclohexylidene $C_{12}H_{20}$ kristályszerkezete

Tájékozódás végett nézzünk végig egy, csak könnyű elemekből álló organikus molekula kristályszerkezet meghatározásán.

A $C_{12}H_{20}$ molekula két cyclohexan gyűrűből áll, amelyek kettőskötéssel kapcsolódnak. Hazánkban a molekula konformációját illetőleg többen is foglalkoztak ezzel az anyaggal. A molekula két gyűrűje között a hidrogének

igen közel kerülnek egymáshoz. Tömösközi modellkísérletek alapján megállapította, hogy ezek a hidrogének távolabb kerülnek egymástól, ha a molekulában a két cyclohexan gyűrű az eredeti szék konformáció helyett a kád formát veszi fel. Ennek eldöntése egy kristályszerkezeti probléma.

A kristályok színtelen tűk, amelyek tűtengelye a kristálytani *a*-tengellyel párhuzamos. Ebben az irányban több mm-t is elérhetnek. Néha azonban zömök kristályok is keletkeznek.



10. ábra. A rostszerkezetű Li-DNA röntgendiagramja (Langridge, 1960)

A bicyclohexylidene kristályok olvadáspontja 55°C és szobahőmérsékleten könnyen szublimálnak. Zárt térben korlátlan ideig eltarthatók. A kristályokat zsilettel először a kívánt nagyságú formára vágtuk és vékony üvegbotra ragasztottuk. A szublimáció ellen az üvegbotra erősített kristályt polivinilacetát metilalkoholos oldatával, amelynek viszkozitását előzőleg megfelelőre beállítottuk, bevontuk. Az alkohol a kristályokat igen lassan oldja. Ezt a tényt felhasználtuk arra, hogy a kristályt rövid ideig az oldatban tartva, éleit leoldottuk. Így a kristály nagysága és alakja is formálható volt, végül is hengeres alakú lett, ami a röntgenfelvételek készítésénél abszorpció szempontjából nagyon előnyös.

A kristályok mérete a tűre merőleges tengely irányában nem haladta meg a 0,1 mm-t. Ilyen körülmények között a röntgenreflexiók mért intenzitásában az abszorpció elhanyagolható volt.

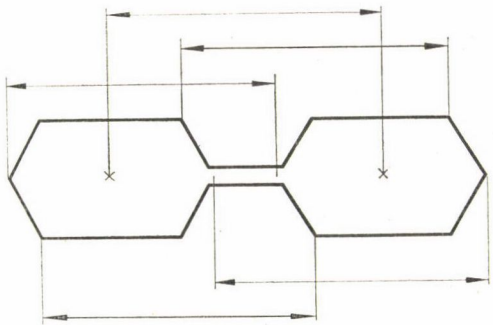
A röntgenfelvételek alapján megállapítottuk, hogy a kristálynak triklin cellája van, melynek adatai

$$a = 5{,}32\ \text{Å}, \quad b = 6{,}25\ \text{Å}, \quad c = 8{,}36\ \text{Å}$$
$$\alpha = 107{,}2^\circ \quad \beta = 79{,}1^\circ \quad \gamma = 105{,}6^\circ$$

szimmetriája $P\bar{1}$, azaz szimmetriaközpontja van. A mért és számított sűrűségek

$$D_m = 1{,}066\ \text{g/ccm} \quad \text{és} \quad D_x = 1{,}073\ \text{g/ccm}$$

Az elemi test térfogatának és a sűrűségnek ismeretével számítva az elemi testben levő molekulák száma $Z = 1$.



11. ábra. A $C_{12}H_{20}$ molekula sematikus rajza vetületben, kijelölve rajta két cyclohexan gyűrű közti 6 azonos interatomáris vektor (A vastagon kihúzott két nyíl dupla vektort jelent)

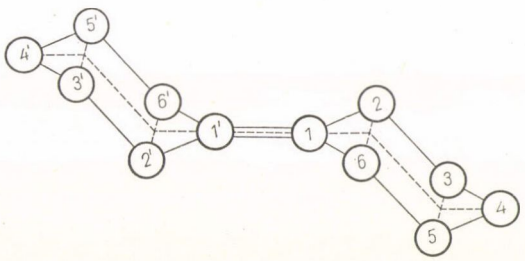
Weissenberg felvételek alapján a lehetséges 1282 reflexióból 858-nak az intenzitását határoztuk meg (129 ebből zéró).

A molekula igen egyszerű, konformációját illetőleg pedig vannak előzetes elképzelések, azért nagyon valószínűnek látszott, hogy a Patterson-függvény számításával a szerkezet megoldható.

A háromdimenziós Patterson-függvény egy igen erős és több azonos erősségű, de az előbbihez képest kb. $^2/_3$ erősségű csúcsokat tartalmaz. A Patterson-csúcsok hovatartozását könnyen eldönthetjük a molekula sematikus rajza alapján, amelyet a 11. ábrán láthatunk. A rajz szerint a gyűrűkön belüli interatomáris vektorok súlya 4, és a gyűrűk között is van egy interatomáris vektor 6-os súllyal. Ez utóbbi összetevői az ábrán külön fel vannak tüntetve. A súlyokat a Patterson-csúcsok súlyaival összehasonlítva, nyilvánvalónak látszik, hogy a legerősebb Patterson-csúcs a gyűrűk közti interatomáris vektornak felel meg. Emellett szól a vektor hossza is. Ez azonban azonos a molekula két gyűrűjének középpontjaihoz tartozó vektorral. Ebből következik, hogy a legnagyobb súllyal megjelenő Patterson-vektorral rögzíthetjük a molekula irányát a rácsban.

A molekulának a kettőskötés középpontjában szimmetriaközpontja van. Ennek a kristályrács szimmetriaközpontjával össze kell esni. Ha most már ismerjük a molekula szimmetriaközpontjának helyét és a molekula irányát, akkor a legnagyobb súlyú Patterson-vektor hosszának segítségével meghatározhatjuk a két gyűrű középpontjainak koordinátáit. A gyűrűk alakját ezekután a kisebb súlyú Patterson-vektorok adják meg. Ily módon egy menetben sikerült a molekula szénatomjait elhelyezni, ill. jó közelítéssel azok koordinátáit meghatározni.

A szén atomok közelítő koordinátáival számított strukturfaktorok előjeleit felhasználva Fourier-függvényt számítottunk. Ebből az atomok helyét az előbbinél pontosabban kaptuk meg. A szokásos finomítási eljárással lehetséges volt a szén atomok koordinátáit olyan pontossággal meghatározni, amilyet az intenzitásadatok száma és pontossága megenged.



12. ábra. A $C_{12}H_{20}$ molekula konformációs rajza

A szénatomok koordinátáinak ismeretével megadhatjuk a molekula konformációját, amelyet a 12. ábrán láthatunk.

Ezek után felmerül a kérdés, hogy mint helyezkednek el a hidrogén atomok. Ezek helyét először geometriai meggondolások alapján a tetraéderes konfigurációnak megfelelően számítottuk. Érdekesebb volt azonban azt megtudni, hogy vajon a hidrogének helyét közvetlenül elektronsűrűség számítás alapján megkaphatjuk-e. Evégből ún. differencia Fourier-függvényt számítottunk. Ezt azáltal kapjuk, hogy a reflexiók mért strukturfaktoraiból levonjuk a szén atomok számított strukturfaktorait. Az $F_0 - F_c$ maradék értékek olyan strukturfaktorokat jelentenek, amelyeket akkor kapnánk, ha a kristályrácsban csak hidrogénatomok lennének jelen. Ily módon a Fourier-függvényből nemcsak a szénatomok csúcsai maradnak el, hanem gyengül az az alap is, amely a szénatomoktól azért származik, mert a Fourier sorfejtésben csak véges számú tagot használunk.

A számított háromdimenziós differencia Fourier-függvénynek a (100) síkra eső vetülete a 13. ábrán látható. Ebből megállapítható, hogy a hidrogének kivétel nélkül mind azonos magasságú határozott csúcsokkal jelennek meg. Koordinátáik tehát a mi esetünkben röntgendiffrakciós módszerrel köz-

vetlenül meghatározhatók. A vetületben látható keresztek az előzőleg már meghatározott szénatomok helyeinek vetületét adják. Világosan látható az ábrából, hogy a kettőskötésben szereplő két szénatomhoz hidrogén nem tartozik, amint azt várjuk is, a többi szén atomok mindegyikéhez pedig egymástól jól elkülöníthető két-két hidrogénatom tartozik.

A geometriailag generált és a Fourier-szintézis alapján meghatározott hidrogénatomok koordinátái oly jó egyezést mutattak, hogy a kétféle módon meghatározott hidrogénpozíciók 0,1 Å-nél kisebb mértékben tértek el.

A szerkezet így elért stádiumában még nyersnek tekintendő. Az atomok végleges, ún. finomított pozícióit szerkezet-finomítással közelíthetjük meg. A szerkezet finomítása már nem változtat a molekula konformációján, csak lehetőséget ad ahhoz, hogy a molekulában a kötéstávolságokat és szögeket minél nagyobb pontossággal határozzuk meg. Ugyanakkor jobb közelítést kapunk az intermolekuláris távolságokra is.

A szerkezet finomítása abból áll, hogy az atomok összes parametereit a legkisebb négyzetek módszerével szimultán úgy változtatjuk, hogy a mért és számított strukturfaktorok egyezése a legjobb legyen.

A jelen szerkezet aszimmetrikus egységében 6 szénatom 3—3 helyzet koordinátája és 6—6 anizotróp hőmozgásparametere összesen 54 parametert jelent. A 10 hidrogén 3—3 helyzet koordinátáját is figyelembe véve összesen 84 parameterünk van, amelyek a finomításnál változtatásra kerülnek. A hidrogének hőmozgásparametereinek változtatásától el kell tekintenünk, mert azok változása már a hibahatáron belül esik. 84 parameternek szimultán finomítása a Fourier-szintézisnél is még nagyobb számítási munkát jelent.

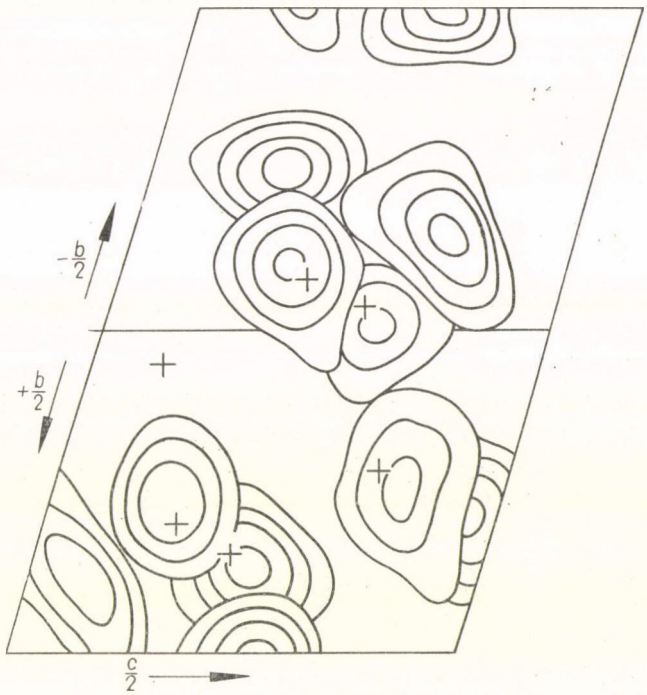
A molekula atomkoordinátáinak végső finomítása után a molekula konformációjáról a következőket mondhatjuk (12. ábra).

A molekulában a cyclohexan gyűrűk megtartották eredeti székalakjukat. A molekula közepén levő 6 atom (6211'2'6') egy síkban van. A legjobb síktól való eltérésük 0,002 Å-nél nem nagyobb. A molekulának van egy nem krisztallográfiai szimmetriasíkja, amely a (411'4') atomokon fektethető át. A szimmetrikus atomoknak ettől a síktól való távolságai 0,02, ill. 0,05 Å-nél nagyobb eltérést nem mutatnak, a szén, ill. H atomok esetén. Figyelembe véve a molekula szimmetriaközpontját a kettőskötés közepén, a molekula szimmetriája $2/m$.

A konformáció mellett a szerkezet legfontosabb adatai az interatomáris távolságok és kötési szögek, amelyeket sorra kiszámoltunk az atomkoordináták alapján. Ezeket az irodalomból ismert adatokkal összehasonlítva azt találtuk, hogy a molekulában a cyclohexan gyűrűk a molekula tükörsíkjára merőlegesen kisfokú kontrakciót mutatnak. Ennek okát keresve ésszerűnek látszott, hogy megvizsgáljuk mind az egyes atomok, mind pedig a molekula mint merev rendszer hőmozgását. Ez az anizotróp hőmozgásparameterek segítségével lehetséges.

Az atomok hat anizotróp hőmozgásegyütthatójából a szimmetrikus mátrix sajátérték és sajátvektor számítása alapján meg lehet határozni az individuális atomok termikus mozgás tenzorellipszoidjainak főtengelyeit irány és nagyság szerint.

A molekula mint merev rendszer hőmozgását két szimmetrikus tenzorból állíthatjuk össze, melyek mindegyikének hat komponense van. Az egyik tenzor a molekula tömegközéppontjának transzlációs vibrációját, a másik



13. ábra. A $C_{12}H_{20}$ kristály differencia Fourier-függvényének vetülete az (100) síkon, amelyen a hidrogén atomok sűrűségeloszlása látható. A + jelek a C atomok helyét jelölik meg

pedig annak librációját adja. Mind az individuális atomok, mind a molekula termikus mozgásának matematikai tárgyalását 1956-ben CRUICKSHANK adta meg.

A hőmozgásanalízist elvégezve azt találtuk, hogy mind az atomok, mind a molekula transzlációs hőmozgásellipszoidjai aránylag jól illeszkednek tengelyeikkel a molekula szimmetria síkjához. Sokkal többet mondanak azonban a molekula librációjára kapott adatok. Kiadódott, hogy a librációs ellipszoid legnagyobb szögelfordulású tengelye a molekula tengelyével csaknem párhuzamos (eltérés 1,4°).

Amennyiben egy molekula tengely körül librációt végez, akkor a molekulának a tengelyen kívül eső atomjai libráció közben körpályán mozognak,

elektronsűrűségük középértéke ennek következtében a tengely irányában ahhoz közelebb tolódik. A röntgendiffrakciós vizsgálatok alapján az atomok helyét az így eltolódott súlypontban kapjuk. Ez természetesen a molekula konformációjában torzulást okoz. Ezzel magyarázható a jelen esetben is, hogy cyclohexán gyűrűk a molekula szimmetriasíkjára merőlegesen zsugorodnak.

A librációs szög ismeretével CRUICKSHANK levezetése alapján kiszámíthatjuk a libráció okozta atom-eltolást. Ezt a számítást elvégezve, az atomkoordinátákat korrigáltuk. Ezután a molekulában a gyűrűk zsugorodása csökkent, teljesen azonban nem tűnt el. Ez nyilván attól származhat, hogy nem használtunk fel elég sok reflexiót.

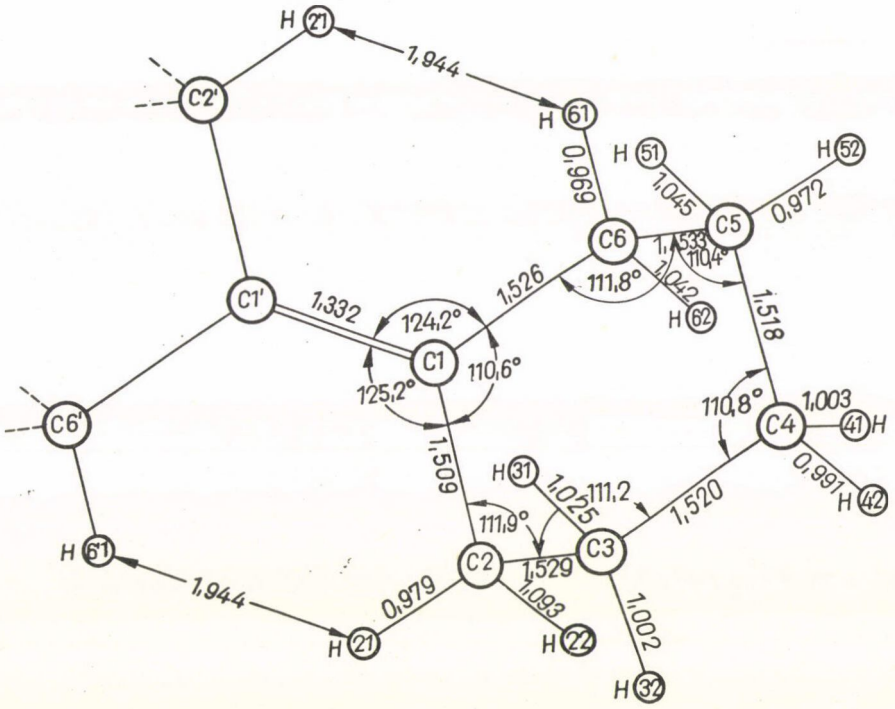
A csak könnyű atomokat tartalmazó kristályoknál a nagyobb reflexiós szögek felé az atomok összszórása hirtelen lecsökken. Ennek következtében bizonyos reflexiós szög felett a fizikailag lehetséges reflexiók is elmaradnak. Ezen némileg segíthetünk azáltal, hogy a szórási centrumok számának növelése érdekében nagyobb kristályt választunk. Különösen biológiai kristályoknál ez gyakran igen nehéz feladat. Sokszor nehézséget okoz az is, hogy a növesztett kristályok többsége iker, amely röntgendiffrakciós felvételhez nem használható fel. Már legtöbbször polarizációs mikroszkóp alatt ellenőrizhető, hogy egy anyag szeret-e ikerkristályos formában megjelenni. Ugyanilyen módon válogathatunk ikermentes kristályt is.

Az anizotróp hőmozgástényezőket a hidrogénen kívül majdnem minden atomra meg lehet határozni. A hidrogének esetében meg kell elégednünk az izotróp hőmozgástényezővel. A bicyclohexylidene molekulában a hidrogének tetraéderes konfigurációban annyira erősen vannak a C atomhoz kötve, hogy nem követünk el nagy hibát, ha hőmozgásparameterüket azonosnak vesszük azon szénatoméval, amelyhez kapcsolódnak. Ennek helyességéről meggyőződhetünk pl. abból, hogy amikor a nagyszámú hidrogénatom anizotróp hőmozgását a mondott formában figyelembe vettük, érezhetően jobb lett a mért és számított strukturfaktorok egyezése.

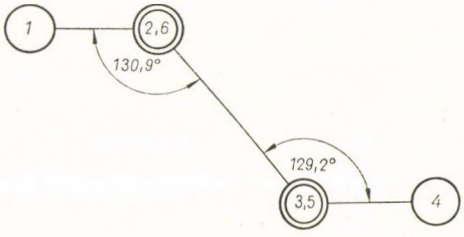
Az atomkoordinátáknak a végső finomítás utáni értékeivel a molekula interatomáris távolságai és kötésszögei a 14. ábra szerint adódtak. A cyclohexan gyűrűk megtartották szék-konformációjukat, ellenben némi laposodást mutatnak a feszültségmentes szabad gyűrűkhöz képest. A dihedrális szögek a 15. ábra szerint az ideális 60° helyett 49,1°, ill. 50,8°-ra álltak be. Ennek megfelelően a kötési szögek a gyűrűben 111,1°-os középértéket mutatnak.

A molekulában a nem kötési H—H távolságok a methylen csoporton belül 1,63 Å, a két gyűrű methylen csoportjai között pedig 1,94 Å. Ez utóbbi lényegesen kisebb, mint a H van der Waals átmérője, 2,34 Å, és kisebb annál a távolságnál is, amelyet kád konformáció mellett kapnánk. Ennek ellenére a szék konformáció maradt meg.

A cyclohexan gyűrűben a C—C közepes kötéstávolság 1,523 Å. Ez a hibahatáron belül egyezik DAVIS és HASSEL értékeivel, amit elektrondiffrakciós vizsgálat alapján a cyclohexanra magára kaptak. A C1—C2 és C1—C6



14. ábra. A $C_{12}H_{20}$ molekulában a legfontosabb kötéstávolságok és szögek



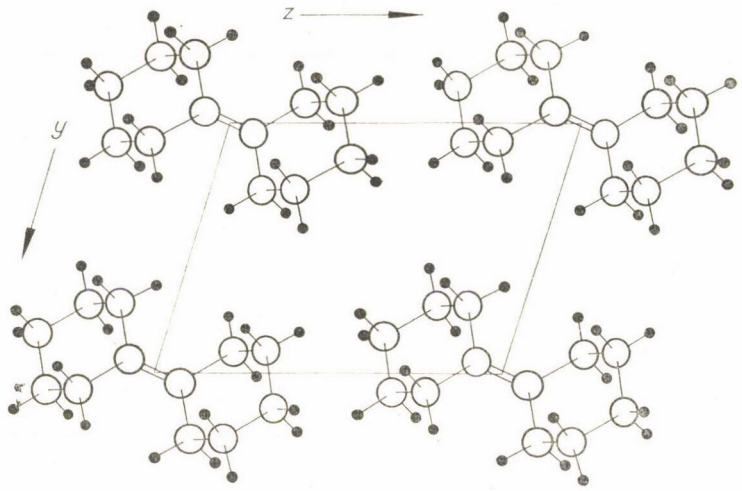
15. ábra. A $C_{12}H_{20}$ molekulában a cyclohexan gyűrű dihedrális szögei

kötéstávolságok nem szignifikánsan rövidebbek, mint a gyűrű többi négy kötéstávolságának középértéke. Ez némileg ellentmond a kvantummechanikailag elfogadott felfogásnak, hogy az sp^2—sp^3 C—C kötéstávolságok rövidebbek, mint az sp^3—sp^3 C—C kötéstávolságok. Ellenben érdekes megjegyezni, hogy a C2—C3 és C5—C6 kötéstávolságok és a többi négy kötéstávolság

között 0,013 Å különbség mutatkozik. Erre vonatkozólag elméleti meggondolások nem ismeretesek.

A jelen szerkezetben a hidrogének helyét közvetlenül az elektronsűrűség számítás alapján határoztuk meg. Ezért érdekesnek látszik foglalkozni a C—H távolsággal, amely a jelen esetben 1,01 Å-nek adódott.

HAMILTON 1962-ben (Ann. Rev. Phys. Chem.) többek között összeállította a röntgen és neutron diffrakcióval meghatározott C—H kötéstávolságokat, amelyek addig az irodalomban ismeretesek voltak. Ugyan még kevés adat állt rendelkezésre, mégis megállapítható volt, hogy a röntgendiffrakcióval kapott érték (középértékben 1,01 Å) határozottan kisebb, mint a neutron diffrakcióval kapott (középértékben 1,08 Å). Az eltérést HAMILTON azzal



16. ábra. A $C_{12}H_{20}$ kristály szerkezetének normális vetülete az (100) síkon

magyarázza, hogy a hidrogén polarizációja következtében az elektronsűrűség súlypontja eltolódik a protontól. Röntgendiffrakcióval az előbbit, neutron diffrakcióval pedig az utóbbit lehet meghatározni.

Az irodalomban található régebbi C—H távolságok még elég nagy szórást mutatnak, középértékük azonban megegyezik a nálunk kapott értékkel.

A $C_{12}H_{20}$ kristályrácsában a molekulák illeszkedését a 16. ábrán láthatjuk. Ez megfelel a KITAJGORODSZKIJ-féle molekula szoros illeszkedésnek. A molekulák csaknem teljesen H atomokkal vannak körülvéve, azért a szoros illeszkedést is figyelembe véve, az intermolekuláris távolságok a H van der Waals rádiuszának jó középértékét adhatják.

A bicyclohexyliden kristályrácsának legrövidebb intermolekuláris H—H és C—C távolságai az 1. táblázatban vannak megadva. Ebből megállapítható, hogy a legkisebb távolság fele 1,27 Å, a közepes H—H távolság fele pedig

1. táblázat

A molekula összes atomjaira vonatkozó legrövidebb intermolekuláris H—H és C—C távolságok

Hidrogén atomok a		Távolság, Å	Szén atomok a		Távolság, Å
molekulában	szomszédos molekulában		molekulában	szomszédos molekulában	
H(21)	H(61)	2,810	C(1)	C(4)	4,063
H(22)	H(31)	2,689	C(2)	C(5)	3,849
H(31)	H(51)	2,576	C(3)	C(2)	3,957
H(32)	H(41)	2,735	C(4)	C(4)	3,734
H(41)	H(22)	2,531	C(5)	C(2)	3,849
H(42)	H(52)	2,713	C(6)	C(5)	3,948
H(51)	H(62)	2,710			
H(52)	H(62)	2,560			
H(61)	H(32)	2,684			
H(62)	H(41)	2,548			
Közepes távolság:		2,656 Å	Közepes távolság:		3,900 Å
Minimális távolság:		2,531 Å	Minimális távolság:		3,734 Å

[A H atomok jelölésénél pl. H(21) a C(2) szén atom 1. számú hidrogén atomját jelenti, stb.]

1,33 Å. Mindkettő nagyobb érték, mint amit KITAJGORODSZKIJ határozott meg 1961-ben. Ő organikus szerkezetekből olyanokat választott, amelyekben irányított C—H kötések vannak. A C—H távolságot 1,08 Å-nek véve, a C atom helyétől a kötés irányában elhelyezte a H atomot. Az ily módon megadott H pozíciók alapján a H van der Waals rádiuszára 1,17 Å adódik. Ez az általunk direkt meghatározott legkisebb értéktől annyiban különbözik, amennyi a C—H távolságban talált különbségnek felel meg.

A jelen előadással célom az volt, hogy rövid áttekintést adjak a röntgendiffrakciós módszer lényegéről és a szerkezetmeghatározás menetéről, hogy azon kémikusok és biológusok, akik a szerkezetmeghatározás után érdeklődnek, meg tudják ítélni, legalábbis hozzávetőlegesen, hogy egyes konkrét esetekben, mit várhatnak a röntgendiffrakciós vizsgálattól, a vizsgálat sikeres kivitelezéséhez hogyan kell a kristályos anyagot előkészíteni, lehet-e egy teljes szerkezetmeghatározást várni, mikor szükséges nehéz atom izomorf helyettesítését elvégezni. Összetett molekulában vannak-e olyan részletszerkezetek, amelyek még nem ismeretesek, és ha igen, szükségesnek mutatkozik-e azokat valamely egyszerűbb szerkezetben megkeresni és külön meghatározni stb.

Befejezésül még külön rá akarok mutatni arra a három fontos tényezőre, amely szükséges ahhoz, hogy a kristály és molekula szerkezet vizsgálatot eredményesen tudjuk alkalmazni. Ezek a jól képzett szakember, röntgendiffrakciós berendezés és megfelelő nagy memóriájú és sebességű elektronikus számítógép. Ezen három közül egyik sem hiányozhat.

A szakemberképzés tekintetében Magyarországon még nagyon rosszul állunk. Ez főként onnan ered, hogy egyetemeinken ilyen irányú kiképzés nincsen. A meglevő néhány szakember főként autodidakta. Új szakemberek képzése úgy képzelhető el, hogy egyetemi tanulmányok idejére is már fiatalokat küldünk külföldre, vagy pedig itthon alkalmazzuk őket egyetemi tanulmányok után azon egy-két intézetben, ahol kristályszerkezeti vizsgálatokkal foglalkoznak.

Röntgendiffrakciós berendezés már több is van az országban. Ezek többsége azonban nem kristályszerkezetvizsgálati célt szolgál. Főként ipari vonatkozású rutinmunkára vannak beállítva. A kristályszerkezetvizsgálatra nálunk használt röntgenberendezések mind fotografikus eljárással működnek. A kereskedelemben ma már megbízható automatikus direkt intenzitásmérő röntgendiffraktometerek is kaphatók, amelyek igen gyors adatgyűjtést és pontosabb intenzitásmérést tesznek lehetővé. Külföldi intézetekben ezek már eléggé elterjedtek. Ezeknek alkalmazása különösen ott fizetődik ki, ahol igen sok reflexió intenzitásának a meghatározása szükséges. A fél-automatikus röntgendiffraktometerrel naponta kb. 300 reflexió intenzitását lehet meghatározni. Ugyanez a munka fotografikus eljárással kb. két hét alatt végezhető el.

A kristályszerkezet vizsgálatánál szükséges nagy számítási munkát csak elektronikus számítógép segítségével lehet elvégezni, ha bonyolultabb organikus molekulák szerkezetét egyáltalán meg akarjuk oldani, és arra is törekszünk, hogy a konformáción belül a kötéstávolságokat és kötési szögeket is olyan pontossággal határozzuk meg, amint azt a kísérletileg nyert intenzitások pontossága megengedi.

Hazánkban már vannak elektronikus számítógépek, amelyekkel a szerkezetvizsgálathoz szükséges egyszerűbb számítások elvégezhetők. Nem alkalmasak azonban ahhoz, hogy a legfontosabb számításokat, mint a háromdimenziós Fourier-függvény számítását és a legkisebb négyzetek módszerével való szerkezetfinomítást elvégezzük. Legalábbis nem azon a szinten, mint az feltétlenül szükséges.

Az MTA tervében már szerepel olyan elektronikus számítógép beszerzése, amely a szerkezetvizsgálattal kapcsolatos igényeket kielégíti. Reméljük, hogy ez a terv a közeljövőben megvalósul, és a szerkezetkutatást hazánkban is ki tudjuk terjeszteni az organikus molekulák területére. Ez már ma is, de különösen az elkövetkező legközelebbi jövőben igen fontos kutatásnak fog számítani mind az elméleti és gyógyszerkémiai, mind pedig a biológiai kutatás területén.

IRODALOM*

BIJVOET, J. M., KOLKMEYER, N. H., MACGILLAVRY, C. M.: X-ray Analysis of Crystals, Butterworths Sci. Publ., London (1951).
BUERGER, M. J.: X-ray Crystallography, J. Wiley, New York (1942).
BUERGER, M. J.: Vector Space, J. Wiley, New York (1959).
BUERGER, M. J.: Crystal Structure Analysis, J. Wiley, New York (1960).
HENRY, N. F. M., LIPSON, H., WOOSTER, W. A.: The Interpretation of X-ray Diffraction Photographs, MacMillan, London (1961).
KITAJGORODSKII, A. J.: Organic Chemical Crystallography, Consultants Bureau, New York (1961).
LIPSON, H., COCHRAN, W.: The Determination of Crystal Structures, G. Bell, London (1953).
LIPSON, H., TAYLOR, C. A.: Fourier Transforms and X-ray Diffraction, G. Bell, London (1958).
ROBERTSON, J. M.: Organic Crystals and Molecules, Cornell Univ. Press, New York (1953).
WILSON, H. R.: Diffraction of X-rays by Proteins, Nucleic Acids and Viruses, Edward Arnold Ltd., London (1966).
WOOLFSON, M. M.: Direct Methods in Crystallography, At the Clarendon Press, Oxford (1961).

* A címszó alatt azon könyvek közül sorolunk fel néhányat, amelyek a röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat módszereit és azok alkalmazását ismertetik. Ezekben a részletesebb irodalmi hivatkozások is megtalálhatók.

A MAGREZONANCIA SPEKTROSZKÓPIA ALAPJAI

NESZMÉLYI ANDRÁS és RADICS LAJOS

MTA Központi Kémiai Kutató Intézete, Budapest

Bevezetés

A magrezonancia spektroszkópia a mag-mágneses rezonancia (Nuclear Magnetic Resonance) néven ismert fizikai jelenségből kiinduló spektroszkópiai módszer. Ugyanúgy, mint a spektroszkópia egyéb ágai, diszkrét energianívók közötti átmenetek tanulmányozásával foglalkozik. Az energia-nívók ebben az esetben külső mágneses tér hatására jönnek létre és — mint az elnevezés is mutatja — az anyagmintában levő atommagok mágneses tulajdonságaival állnak összefüggésben. Az átmenetek létrehozására a rádióhullámok frekvencia-tartományába eső elektromágneses sugárzás szolgál.

Ez a spektroszkópiai ág viszonylag rövid múltra tekint vissza. Az alapjelenség: a magrezonancia, első kísérleti észlelése 1945-ben történt (BLOCH, HANSEN és PACKARD, valamint velük egyidejűleg PURCELL, TORREY és POUND), és mint a magok mágneses momentumának pontos meghatározására alkalmas fizikai módszer vált ismeretessé. Kevéssel e felfedezés után megállapították (PROCTOR és YU, 1951), hogy az egyes magfajtákra kapott állandók értékei nem függetlenek attól, hogy a kérdéses atommag milyen kémiai „környezetben" van; milyen az adott atommagot magába foglaló molekula elektron-szerkezete, geometriája. Ez a felismerés vezetett tulajdonképpen ahhoz, hogy a magrezonancia jelenségből kiindulva egy új spektroszkópiai módszer alakuljon ki, amely rövid néhány év leforgása alatt jelentős szerephez jutott az anyagszerkezeti kutatásokban. Rendkívül gyors és nagyfokú elterjedését egyrészt annak köszönhette, hogy segítségével számos anyag- és molekulaszerkezeti kérdés megoldása egyszerűbbé vált, másrészt pedig annak, hogy olyan jelenségekbe és anyagi tulajdonságokba is betekintést adott, amelyek más vizsgálati módszerekkel addig megközelíthetetlenek voltak. Jelenleg mintegy két-háromezerre tehető azoknak a laboratóriumoknak a száma, ahol rendszeres magrezonancia spektroszkópiai vizsgálatok folynak (a működő spektrométerek száma ennek kb. két-háromszorosa lehet), alkalmazási területe pedig a szilárdtest fizikától a biológiáig szinte valamennyi kutatási ágat magában foglalja.

A magrezonancia spektroszkópiát fel szokás osztani a vizsgált magok (proton, deuteron, fluor, foszfor stb.), a spektromvonalak szélessége (nagy

felbontású, ill. szélesvonalú), valamint a magrezonancia jelenség észlelése (stacionárius, ill. szakaszos) szerint. Legnagyobb elterjedtségű ezek közül a szerveskémiai szerkezetkutatásban és biológiában alkalmazott nagyfelbontású protonrezonancia spektroszkópia.

Az alábbiakban rövid áttekintést adunk a magrezonancia spektroszkópia alapjairól. Nem törekedtünk teljességre, a magrezonancia spektroszkópia néhány speciális irányzatát (így az impulzus-üzemű méréseket, a mag-elektron kettősrezonanciát) nem mutatjuk be. Célunk az volt, hogy a mágneses rezonancia módszereket közvetlenül nem használó kutató számára az elmélet és a módszertan összefoglalásával megkönnyítsük az irodalomban egyre növekvő számban található alkalmazások megértését.

A mag mágneses rezonancia elmélete

A nagyfelbontású magrezonancia vizsgálatok alkalmazásához szükséges elméleti alapok rövid összefoglalásaként először egyetlen atommag, majd szabad atommagok rendszerének viselkedését írjuk le külső mágneses térben. Ezután vizsgáljuk egymással és a környezettel való kölcsönhatásukat: így jutunk el a makroszkopikusan is mérhető mágnesezettség időbeli változásait leíró Bloch-egyenletekig, amelyek minden magrezonanciás vizsgálat immár klasszikussá vált alapegyenleteit képezik. A tárgyalás során (valamint a későbbi elméleti részeknél is) erősen támaszkodunk az atomfizika és kvantummechanika eredményeire, ezek alapfokú ismeretét feltételezzük.

1. *Az atommagok sajátságai és viselkedésük külső mágneses térben (szabad magok rendszere)*

Az atommagok mágneses tulajdonságainak leírására a mag impulzusmomentumát és mágneses momentumát használjuk. A magrezonancia effektust lényegesen befolyásolhatja a mag elektromos kvadrupolmomentuma (amennyiben a mag rendelkezik számottevő kvadrupolmomentummal).

a) *Az atommag impulzusmomentuma*

Pauli tételezte fel az atomok hiperfinomstruktúrával rendelkező spektrumainak magyarázatára 1924-ben, hogy bizonyos atomok mágneses dipolusmomentummal kell rendelkezzenek, amely mágneses momentumot a mag mechanikus impulzusnyomatékának segítségével lehet értelmezni. Miután e hipotézist számos indirekt és a rezonanciamódszerek kifejlődése óta, direkt kísérlet is igazolta, a mag impulzusmomentumának és mágneses tulajdonságainak tárgyalása nem választható szét.

A Z magtöltésű és A tömegszámú ${}_ZX_N^A$ atommag Z pozitív töltésű ***proton*** és $N = A - Z$ semleges *neutron* szoros egybekapcsolódásából áll,

melyeket a gravitációs és elektromágneses erőknél sokkal erősebb, igen rövidhatótávolságú *magerők* tartanak össze. Mivel pedig, a szabad protonokon és neutronokon végzett alapvető fizikai kísérletek tanúsága szerint mindkét részecske azonos, saját-impulzusmomentummal (spinnel) rendelkezik — ennek nagysága $^1/_2\,\hbar$ —, ezért a protonokból és neutronokból összetett atommag impulzusmomentuma ezek impulzusnyomatékának összetevésével kapható meg. Figyelembe kell itt azonban még azt is vennünk, hogy az atommagon belül a protonok és neutronok mozgásban vannak és e mozgásból eredő pályamomentumuk is van. Ez utóbbi viszont — a kvantummechanika tanítása szerint — a $\hbar$ egész számú többszöröse lehet csak (a zérust is beleértve). Az impulzusmomentumok vektorként adódnak össze — ennek törvényeit az impulzusmomentum kvantumelmélete tárgyalja —, végeredményben azt kapjuk, hogy a magon belül egy nukleon (proton v. neutron) eredő impulzusmomentuma az $^1/_2$-es spinjének és egész értékű pályamomentumának összegeként mindig csak feles érték lehet (azaz $^1/_2\,\hbar$ egész számú többszöröse). Ezért:

1. A *páros számú nukleont* tartalmazó — az A tömegszám páros értékével jellemezhető — magok teljes I impulzusmomentuma (mint páros számú feles momentum összege) mindig *egész szám. Ha ugyanekkor Z, a protonok száma is páros, úgy I zérus,* mert a protonok és neutronok a magon belül kompenzálni tudják impulzusmomentumaikat, így az eredő zérus lesz (ilyenkor ez adja a mag legkisebb energiájú állapotát).

2. *A páratlan tömegszámú magokban I mindig feles*

A magok teljes impulzusmomentumát röviden magspinnek szokás nevezni. Ez azonban a mag struktúrája miatt összetett mennyiség: a magot alkotó részecskék belső (spin-)impulzusmomentumának és pályamomentumának eredője, ezért az elnevezés nem szerencsés ma már, mert azt a régebbi elképzelést tükrözi, amikor még a magspint az elemi részecskék spinjéhez hasonlóan az oszhatatlan mag sajátságaként gondolták el.

Fenti megállapításaink a kvantummechanika általános törvényét tükrözik: bármely atomi méretű részecske impulzusmomentuma a 2π-vel osztott Planck-állandó egész — vagy fél-egész számú többszöröse lehet. Impulzusmomentum alatt mindig a spin-kvantumszámot értjük: mert evvel fejezhető ki a $\hbar\sqrt{I(I+1)}$ abszolút értékű **I** impulzusmomentum vektor egy tetszőleges z irány mentén mérhető *maximális komponense:* $(I_z)_{\max} = I \cdot \hbar$. Az impulzusmomentum mérésénél azonban egy I impulzusmomentumú szabad (külső erőknek nem alávetett) részecske esetén egyforma valószínűséggel kaphatjuk az

$$I_z = mI$$

$$m = I,\ I-1,\ I-2, \ldots,\ -I+1,\ -I$$

értékek bármelyikét is. Szabad részecske a mérések szerint tehát $2I+1$ különböző állapotban fordulhat elő. Ezen állapotok energiája azonos, csupán

az impulzusmomentum vektor és a mérési irány kölcsönös helyzetében különböznek. Az $m = I$ esetben azt mondjuk, hogy a részecske impulzusmomentum vektora (kicsit pongyolán mondva: spinje) a mérési iránnyal párhuzamosan fekszik, az $m = -I$ esetben pedig ellentétesen. Az I impulzusmomentumú részecske mérhető impulzusmomentum komponense kvantált mennyiség: csupán a fent meghatározott $2I + 1$ diszkrét értéket veheti fel.

b) *Az atommag mágneses momentuma*

A proton és neutron saját, belső impulzusmomentumukon kívül mágneses sajátsággal, saját mágneses dipólusmomentummal is rendelkeznek. A mérések szerint az **M** dipólusmomentum vektor az **S** spin-impulzus momentum vektorral egyirányú:

$$\mathbf{M} = g \cdot \mu^\circ \cdot \mathbf{S}$$

ahol az arányosságot a

$$\mu^\circ = \frac{e\hbar}{2M_p c} = 5{,}050 \cdot 10^{-24}\ \text{erg/gauss}$$

mag-magneton és a dimenziótlan g tényező fejezi ki. g értéke

$$\text{protonra:} \quad g_p = -1{,}913$$

$$\text{neutronra:} \quad g_n = 2{,}793$$

μ° kifejezésében az e elektrontöltés és az M_p protontömeg, valamint a c fénysebesség szerepel.

A töltéssel rendelkező proton magon belüli pályamozgásához is társul — további — mágneses momentum. Ezek összegezése, az impulzusmomentumnál mondottakhoz teljesen hasonlóan, a mag eredő, teljes mágneses momentum vektorát adja meg. A mag μ mágneses momentumának értékét is hasonlóan értelmezzük: egy szabad atommagról akkor mondjuk, hogy μ mágneses momentummal rendelkezik, ha a mágneses momentum vektorának tetszőleges z irányban mérhető vetületei az

$$\frac{m\mu}{I}$$

mennyiségek, ahol az m mágneses kvantumszám értékei

$$m = I, I - 1, \ldots, -I + 1, -I,$$

μ tehát a mérhető *maximális* komponens értéke.

Eddig minden mérési eredmény összhangban áll avval a feltételezéssel, hogy *a mag mágneses momentuma zérus*, ha $I = 0$; elterjedt jelölés így μ-t I-re vonatkoztatni:

$$\mu = \gamma (I \hbar)$$

itt γ a giromágneses-tényező, dimenziója radián/gauss · sec. Ha e vonatkoztatás során μ-t mag-magnetonokban akarjuk kifejezni, akkor dimenzionélküli tényezőt használhatunk:

$$\mu = g \frac{e\hbar}{2M_p c} I$$

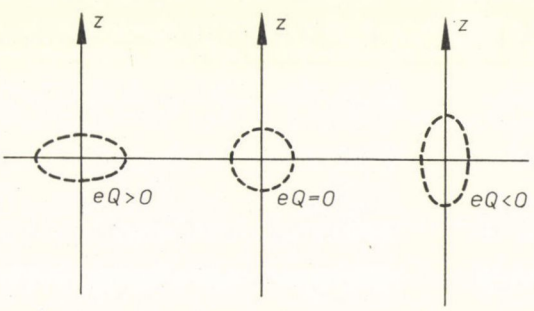
ahol g a mag g-faktora.

A Függelékben táblázatot találhatunk az atommagok magrezonanciás szempontból fontos tulajdonságairól, g-értékekről, előfordulásról stb.

A zérus magspinű atommagoknak nincs mágneses momentuma, ekkor tehát magrezonanciás effektusra sem számíthatunk. Ilyen mag pl. a ^{12}C és ^{16}O. Ez a tulajdonság sokszor előnyös, így pl. H, C és O-t tartalmazó vegyületek proton-spektruma mentes mindazon komplikációktól, melyeket a fenti magok spinjei okozhattak volna (csupán a kis koncentrációban természetesen is előforduló ^{13}C és ^{17}O izotópok hatása mutatható ki).

c) *Az atommag elektromos kvadrupolmomentuma*

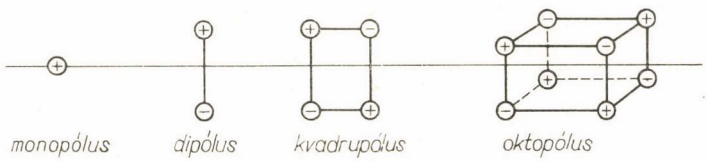
A mag elektromos töltését a Z proton együttesen hozza létre. A mag 10^{-13} cm nagyságrendű méreteihez képest nagy távolságban ez a töltés pontszerűnek hat. Közelről „nézve" azonban minden mag sajátos struktúrájának



1. ábra

megfelelően a töltések atommagon belüli eloszlása különbözhet a gömbi szimmetriától. A mag pontos alakjáról mai tudásunk szerint még nem alkothatunk elképzelést, azt azonban pontos mérések eredményeképpen tudjuk, hogy a gömbi alaktól való eltérés legegyszerűbb esetére, a forgási ellipszoid alakra vonatkozóan, a mag milyen mértékben tekinthető csúcsos (szivar alakú) vagy lapult (lencse alakú) képződménynek (1. ábra). A mérések ered-

ményeit — rendszerint az anyagon belül létrejött erős elektromos terek okozta effektusokat — ui. a tér gradiensével és a magtöltés eloszlásának integráljaival fejezhetjük ki. A számítás a Legendre-polinomokban való sorfejtéssel végezhető el. Ugyanilyen sorfejtés szolgál az elektrosztatikában ponttöltések rendszerének leírására is. A sorfejtés k-adik tagja, a k-ad rendű Legendre-polinom 2^k töltés (pólus) leírására alkalmas (2. ábra). Ha a mag töltések nem gömbszimmetrikusan oszlanak el, a sorfejtésben elvben minden tag felléphet, a gyakorlatban azonban gyors a konvergencia és a mérések korlátozott pontossága miatt az elektromos kvadrupol jellegnél magasabb rendű elektromos kölcsönhatást még nem észleltek. Érdekes természeti törvény, hogy az atommag nem rendelkezik elektromos dipólus karakterrel, ami a proton-eloszlás



2. ábra

tükrözési (nem gömb-!) szimmetriájából következik. Így az elektromos magjellemzők: a töltés és a kvadrupol momentum, Q . eQ-t a legtöbb magra kimérték, értéke 10^{-24} cm^2 egységekben a Függelék magadat táblázatában szerepel. Hasonlóan az elektromos multipólusnyomatékokhoz, az elméleti fizika tanúsága szerint a fent említett tükrözési szimmetria következménye, hogy a mag mágneses kölcsönhatásainak leírásánál nem fordulhat elő páros k, azaz nem létezik mágneses pólus, hanem csak dipólus (ez teszi lehetővé az NMR mérést), továbbá nem beszélhetünk mágneses kvadrupolmomentumról, hanem csak oktupolról stb. Ez utóbbit azonban a magspektroszkópiai mérések mutatták ki, az NMR-ben nem észlelték.

A kvadrupol-momentum és kölcsönhatás kifejezhető az impulzusmomentum segítségével a forgás-szimmetrikusnak feltételezett atommagokra vonatkozóan. A kísérletek szerint (és ez elméletileg is alátámasztható) *azon magok, melyek spinje* 0 *vagy* $^1/_2$, *nem rendelkeznek kvadrupolmomentummal.*

d) *A klasszikus dipólus mozgása külső térben*

A mágneses rezonancia jelenségének igen szemléletes leírását kapjuk, ha a klasszikus elektrodinamika törvényei között tanulmányozzuk egy mechanikai impulzus nyomatékkal (**p**) és ehhez kapcsolt μ mágneses nyomatékkal bíró rendszer mozgását. A valóságban ugyan kvantumrendszerek viselkedését kellene tanulmányoznunk, azonban a kvantummechanika törvényei nem

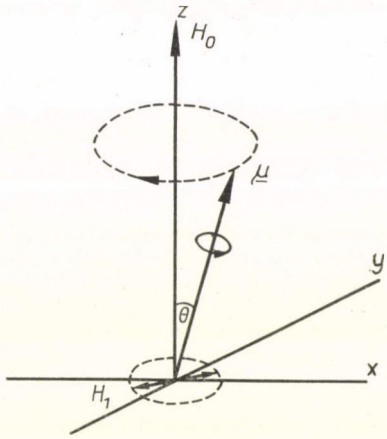
módosítják e problémánál a bemutatott és klasszikus módszerrel nyert eredményeket.

A μ mágneses momentumú részecskére H_0 mágneses térben

$$\mathbf{L} = \mu \times \mathbf{H}_0$$

nagyságú forgatónyomaték hat. Másrészt tudjuk Newton mozgástörvényéből, hogy külső nyomaték az impulzusmomentum megváltozásához kell vezessen:

$$\frac{\mathrm{d}\mathbf{p}}{\mathrm{d}t} = \mathbf{L}$$



3. ábra

Az impulzusnyomaték változása azonban a hozzákapcsolt mágneses nyomatékot is megváltoztatja:

$$\frac{\mathrm{d}\mathbf{p}}{\mathrm{d}t} = \frac{e}{2Mc}\,\mathbf{p} \times \mathbf{H}_0 = \gamma \mathbf{p} \times \mathbf{H}_0$$

E differenciálegyenletrendszer megoldása a $\mathbf{p}$ vektor precessziója a $\mathbf{H}_0$ tér körül (3. ábra)

$$\omega_0 = \gamma H_0$$

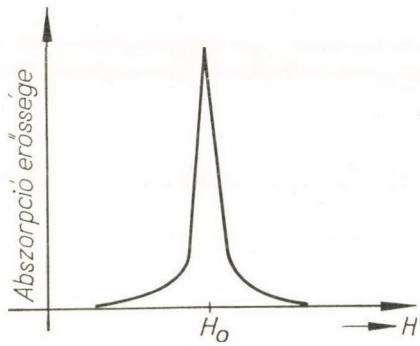
körfrekvenciával. Ez *Larmor egyenlete*, a mágneses rezonanciák alapvető összefüggése. Frekvenciával felírva:

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} H_0 \equiv \frac{\nu}{\gamma} H_0$$

Tekintsük néhány mag esetére a Larmor-frekvenciák értékeit 10 000 gauss külső tér esetén:

^1H	42,578 MHz
^2H	6,536 MHz
^{13}C	10,705 MHz
^{19}F	40,055 MHz

A H_0 tér körül precesszáló mag meg is marad ezen állapotában addig, míg külső hatás ennek elhagyására nem készteti. Oszcilláló H_1 külső mágneses tér — pl. egy rádiófrekvenciás tekercs tere — szintén forgatónyomatékot



4. ábra

gyakorol μ-re, azonban hatása — hacsak a frekvenciák nem egyeznek meg — kiátlagolódik, elhanyagolható. Ha azonban a külső rádiófrekvenciás tér is éppen a Larmor-frekvenciával rezeg, a szinkronizmus miatt időben tovább tartó nyomatékot is kifejthet a precesszáló dipólusokra, amiért is azok a térhez képest történő kvantált beállásukat, jelen esetben a H_0 irányú impulzusmomentumukat, megváltoztathatják. Feles spinű részecskék esetében, ahol csak két fajta, paralel v. a térrel antiparalel beállás lehetséges, külső rádiófrekvenciás tér alkalmas frekvencia esetén e két állapot között átmeneteket indukálhat. Mivel e jelenség csak egy meghatározott frekvenciánál következhet be, ha a mágneses tér értéke rögzített, a jelenség rezonanciaszerűen folyik le. Ha a frekvencia függvényében ábrázoljuk az átmenet valószínűségét, úgy a 4. ábrát kapjuk.

e) *A mag energianívói homogén mágneses térben*

Homogén mágneses térben a μ mágneses momentum vektorral jellemezhető atom (a klasszikus elektrodinamika és kvantummechanika megegyező tanítása szerint)

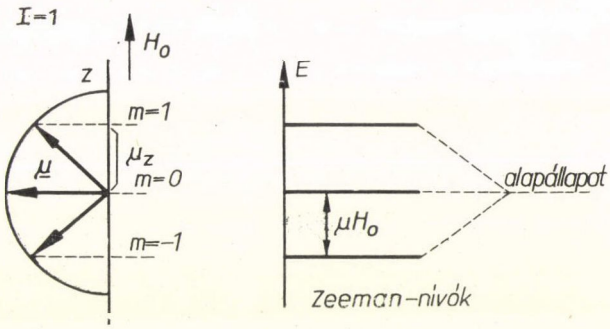
$$E = -\mu \cdot H_0 = |\mu| \cdot |H_0| \cdot \cos\vartheta = (\mu)_z \cdot H_0$$

energiával rendelkezik, és így $(\mu)_z$ $2I + 1$ lehetséges értékének megfelelően a mag alapállapoti energiája $2I + 1$ energianívóra bomlik (ez a Zeeman-effektus az atommagoknál):

$$-\mu H_0, -\frac{I-1}{I}\mu H_0, \ldots, \frac{I-1}{I}\mu H_0, \mu H_0$$

Ezen nívók mind azonos távolságra vannak egymástól, energiakülönbségük:

$$\Delta E = \frac{\mu H_0}{I}$$



5. ábra

Az NMR kísérletek alapját ezen nívók közti átmenetek keltése képezi elektromágneses tér kvantumainak emissziója és abszorbciója segítségével (5. ábra). Az ehhez szükséges frekvencia

$$f_0 = \gamma H_0 \qquad \left(\gamma = \frac{\gamma}{2\pi}\right)$$

arányos a H_0 tér értékével, és mint látjuk, éppen a Larmor-frekvenciával egyezik.

Mivel a mágneses momentum az impulzusmomentummal fejezhető ki, az impulzusmomentum vektor tulajdonságai szabják meg a nívók közötti átmenetek valószínűségét. Kimutatható, hogy csak a *szomszédos nívók közötti átmenetek* következnek be f_0 frekvenciájú szinuszosan változó elektromágneses tér hatására. Így az 5. ábra esetében csak az $m = -1$ és $m = 0$, vagy az $m = 0$ és $m = +1$ mágneses kvantumszámmal jellemzett nívók között jöhet létre átmenet. Ezeket az átmeneteket tehát a $\Delta m = \pm 1$ *kiválasztási szabály* jellemzi.

f) *A Zeeman-nívók betöltöttsége, spin hőmérséklet*

Gondoljuk el a μ mágneses momentummal és I spinnel rendelkező atommagok rendszerét, amely a T abszolút hőmérsékletű környezetükkel hőmérsékleti egyensúlyban áll. A Boltzmann-eloszlás hőmérsékleti egyensúly esetén a $2I + 1$ Zeeman-nívó különböző betöltöttségét írja elő, az alacsonyabban fekvő nívók jobban lesznek benépesítve, mint a magasabban fekvők. Így pl. az $^1/_2$ spinű proton esetén a két nívó energiakülönbsége $2\mu H_0$, a Boltzmann-faktor pedig $\exp(2\mu H_0/kT)$. Mivel az utóbbi értéke 10 kgauss mágneses tér és szobahőmérséklet esetén csupán 10^{-5} körül van, annak valószínűsége, hogy egy proton a felső, illetve az alsó energianívón van

$$n_- = \frac{1}{2}\left(1 - \frac{\mu H_0}{kT}\right) \text{ illetve } n_+ = \frac{1}{2}\left(1 + \frac{\mu H_0}{kT}\right)$$

ahol az exponenciális függvény sorfejtésében már az első két tag figyelembevétele is kellő pontosságot biztosít. Hasonlóan, I spinű mag esetén a $2I + 1$ Zeeman-nívó távolsága $\mu H_0/IkT$ (a nívók egyenletes távolságban feküsznek egymás felett), és így az m mágneses kvantumszámmal jellemzett nívó betöltöttségének valószínűsége:

$$\frac{1}{2I+1}\left(1 - m\frac{\mu H_0}{kT}\right), \text{ ahol } m = I, I-1, \ldots, -I+1, -I$$

Amíg a nívók betöltöttsége egyenletes (pl. nincs külső mágneses tér), a spin-rendszer mágneses momentumai kompenzálják egymást: minden m-hez található ugyanannyi m-mel rendelkező mag, tehát kifelé, makroszkopikusan, a rendszer eredő mágneses momentuma zérus. A magokat külső H_0 mágneses térbe helyezve ez az egyensúly felbomlik, és a $\mathbf{H}_0$-al kitüntetett irányban a spin-rendszer zérustól különböző eredő mágneses momentummal fog rendelkezni. Legyen a térfogategységben N azonos, I spinű, μ mágneses momentumú atommag, úgy a fenti valószínűség felhasználásával a térfogategység makroszkopikus mágneses momentuma, M, így írható:

$$M = \chi_0 H_0$$

ahol χ_0 a mágneses szuszceptibilitás, értéke:

$$\chi_0 = \frac{N}{H_0} \sum_{m=-I}^{I} \frac{1}{2I+1}\left(1 - m\frac{\mu H_0}{IkT}\right)\frac{m\mu}{I}\,\frac{(I+1)N\mu^2}{3IkT}$$

Látjuk tehát, hogy egy, az atommagoktól származó, hőmérsékletfüggő *paramágneses* jelenséggel állunk szemben. χ_0 értéke szobahőmérsékleten, a víz protonjaira $3 \cdot 10^{-10}$ erg/gauss^2.

Meg kell jegyeznünk, hogy a Zeeman-nívók betöltöttségét leíró fenti képletben T értéke eltérhet a környezet valódi hőmérsékletétől, ha a hőmérsékleti egyensúly kialakulását még nem érte el a rendszer. (Az egyensúly beállásának sebességéről a következő pontban beszélünk.) Ilyenkor a spin-hőmérséklet fogalmát használjuk. $I = {}^1/_2$ esetén ezt a két nívó betöltöttségének hányadosával definiálhatjuk:

$$\frac{n_+}{n_-} \approx 1 + \frac{2\mu H_0}{kT} \tag{1}$$

amit úgy kell értenünk, hogy a betöltöttségeket kísérleti adatként értelmezve a formula megadja azt a hőmérsékletet, ami ugyanezt a betöltöttséget eredményezné hőmérsékleti egyensúly esetén. Így a felső nívó nagyobb betöltöttsége esetén még negatív spin-hőmérsékletről is kell beszélnünk, ez alkalmas környezetbe helyezett spin-rendszer esetén megvalósítható (pl. a masereknél).

2. *Atommagok kölcsönhatása egymással és környezetükkel (kölcsönható magok rendszere)*

Impulzusmomentummal és mágneses momentummal rendelkező szabad rendszerek mágneses terekben való viselkedésének eddig megismert törvényszerűségei a valóság leírásában csak az első lépést jelentik: e részecskék ugyanis csak extrém körülmények között tekinthetők szabadnak, a rendszerek a külső mágneses téren kívül egymással is kölcsönhatnak. μ mágneses momentumú részecske r távolságban μ/r^3 nagyságú mágneses teret kelt. (Egy proton 1 Å távolságban 14 gaussnyi teret hoz létre.) Ez a lokális tér gyorsan csökken a távolsággal, mégis el nem hanyagolható kölcsönhatást eredményezhet folyadék és szilárd fázis esetén, ahol a sűrűség miatt a részecskék távolsága ebben a nagyságrendben van. Hozzá kell tennünk még, hogy a molekuláris mozgások következtében a részecskék helyzete állandóan változik egymáshoz képest. Az elektrodinamika tanítása szerint az időben rendszertelenül mozgó dipólus fluktuáló elektromos és mágneses teret kelt környezetében. E terek az $E = -\mu \cdot \mathbf{H}(t)$ kölcsönhatás miatt módosítják a külső térben létrejött Zeeman-nívókat, időbeli változásuk miatt lényegében annak kiszélesedéséhez vezethetnek. Másrészt azoknál a magoknál, ahol kvadrupól momentummal is kell számolnunk, újabb kölcsönhatás lép fel: az elektromos terek gradiense és a kvadrupól momentum között, ami a részecskék mágneses momentumának viselkedését is befolyásolja.

a) *A spin-rács relaxációs idő*

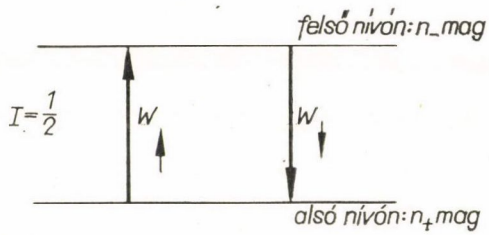
A magrezonancia effektust az 1.*f)* pontban tárgyalt makroszkopikus mágnesezettség időbeli változása eredményezi, amint azt nemsokára meg fogjuk ismerni. Időbeli jelenségről lévén szó, várható, hogy az NMR jelen-

ségeket lényegesen fogja befolyásolni a magok és a környezet hőmérsékleti egyensúlyának kialakulásához szükséges idő nagysága.

A problémát így fogalmazhatjuk meg: a mágneses tér bekapcsolása előtt a magok hosszú ideig hőmérsékleti egyensúlyban voltak környezetükkel, ami mint láttuk, egyenletes betöltöttséget jelentett minden nívóra vonatkozóan. Ha a teret bekapcsoljuk és elég hosszú ideig várunk, a rendszer újra hőmérsékleti egyensúlyba fog jutni, ezt azonban már a nem egyenletes nívó betöltöttség jellemzi. Kérdés, hogyan fog az átmeneti idő alatt a betöltöttségek értéke az idővel változni? Legegyszerűbb ezt az $^1/_2$ spinű magok rendszerére megmutatni. Vizsgálni fogjuk az

$$n = n_+ - n_-$$

mennyiségnek, a $+^1/_2$ és $-^1/_2$ m_z kvantumszámú nívók betöltöttségei közötti különbségének változását az időben.



6. ábra

Legyen $W_\uparrow$ és $W_\downarrow$ egy mag esetén az alsó nívóról a felsőre, ill. a felső nívóról az alsóra való átmenet időegységre vonatkoztatott valószínűsége (6. ábra), amelyet a környezet egyéb szabadsági fokaival való kölcsönhatás eredményeképpen származtatunk. Ez a két valószínűség egyensúly esetén kissé különbözni fog egymástól, hiszen a fel és le történő átmenetek száma, a betöltöttségek és a valószínűségek szorzata, meg kell hogy egyezzen egymással:

$$n_+ W_\uparrow = n_- W_\downarrow$$

Ebből (1) felhasználásával kapjuk:

$$\frac{W_\uparrow}{W_\downarrow} = 1 + \frac{2\mu H_0}{kT}$$

Mivel n értéke felfelé való átmenet esetén kettővel csökken, míg az ellenkező esetben kettővel nő, n időegységre vonatkoztatott változását így írhatjuk le:

$$\frac{dn}{dt} = 2\, n_- W_\downarrow - 2\, n_+ W_\uparrow$$

Jelöljük $W_{\uparrow}$ és $W_{\downarrow}$ számtani közepét W-vel, ekkor az egyenlet így alakul:

$$\frac{dn}{dt} = -2W(n - n_0) \tag{2}$$

ahol

$$n_0 = \frac{\mu H_0}{kT}(n_+ + n_-)$$

n-nek, a betöltöttségek különbségének az egyensúlyi értéke. A (2) egyenlet differenciál egyenlet n-re nézve, és fizikai tartalma, hogy n megváltozása arányos az egyensúlyi értéktől való eltérés nagyságával. De ez a törvényszerűség jellemez minden exponenciálisan végbemenő folyamatot is (pl. radioaktív bomlás!), ezért (2) megoldása a

$$T_1 = \frac{1}{2W}$$

jelölés bevezetésével így írható:

$$n - n_0 = [(n - n_0)]_{\text{kezdeti}} \cdot e^{-\frac{t}{T_1}}$$

A T_1 idő jelentése: n mindenkori értékének és az egyensúlyi n_0 értéknek különbsége T_1 idő elteltével csökken e-ed részére (e a természetes logaritmus alapja). Ezért T_1 a mértéke annak a sebességnek, amellyel a spin-rendszer környezetével hőmérsékleti egyensúlyba jutni képes. A környezet alatt most a rendszer energiatárolásban részt vevő egyéb szabadsági fokai értendők. Elsősorban itt annak a rácsnak a mozgása jön szóba (szilárd anyag esetén), amelybe a vizsgált spin-rendszer be van ágyazva. Történeti okokból T_1-et a *spin-rács relaxációs idő*nek nevezzük. Nagysága jelentősen változik a szóban forgó mag és környezetének sajátságaitól függően. Így pl. $^1/_2$ spinű magok a rendszer egyéb szabadsági fokaival csupán mágnesesen lehetnek csatolva, az ehhez szükséges mágneses tér a mag helyén a környezet rendszertelen mozgásának hatására, mint fluktuáló tér van jelen. Ha azonban a spin egy, vagy egynél nagyobb, a mag kvadrupólmomentuma is kölcsönhathat az ugyancsak jelen levő fluktuáló elektromos terekkel. Ilyenkor meggyorsul az energiacsere a spinrendszer és környezet között, kisebb lesz T_1 értéke. Folyadékoknál T_1 rendszerint a 10^{-2} és 10^2 sec között van (paramágneses ionok jelenlétében lecsökkenhet 10^{-4}-ig). Szilárd anyagban lényegesen nagyobb, előfordulhat több napos relaxációs idő is.

b) *Spin-spin kölcsönhatás*

A szomszédos mágneses momentumok által keltett lokális mágneses tereknek értéke időben gyorsan és rendszertelenül változik a hőmozgás hatására. Ha mozgás elég nagy sebességgel megy végbe, mint ahogy azt legtöbb

folyadéknál, gázoknál és néha szilárd testeknél is tapasztaljuk, a lokális terek átlaga zérus (itt most az egyenáramú komponensre gondolunk), azaz a rezonancia átmenetek élesek lesznek. Megmarad azonban most is a váltakozó komponens. Különböző magok egymás helyén saját precessziójuk következtében nem kelthetnek azonos Larmor-frekvenciával rezgő teret: átmeneteket ilyenkor csak az előbb említett rendszertelen mozgás okozta terek időfüggvényének Fourier bontásában szereplő Larmor-frekvenciás komponens kelt: ez felelős a relaxációért. Azonos magok azonban okozhatnak egymás helyén Larmor-frekvenciájú mágneses tereket a precessziós mozgás következtében, ilyenkor kölcsönösen megváltozik a térhez való beállásuk, de a két rendszer együttes energiája konstansul marad. A különböző kölcsönhatások eredményeképpen azt tapasztaljuk, hogy a makroszkopikus mágnesezettségnek a H_0 térre merőleges síkban mérhető M_x és M_y komponensei T_2 időállandóval csökkennek:

$$\frac{dM_x}{dt} = -\frac{M_x}{T_2}; \quad \frac{dM_y}{dt} = -\frac{M_y}{T_2}$$

amiért is T_2-t a tranzverzális relaxációs időnek nevezzük.

A relaxációs idők az anyagi tulajdonságok közé tartoznak, így a hőmérséklettel, nyomással, koncentrációval értékük változik.

3. *A mágneses rezonancia Bloch-féle leírása: Bloch-egyenletek, telítés, érzékenység*

A különböző energianívók betöltöttségének eredőjeképpen a mágneses térbe helyezett és egymással is kölcsönható részecske rendszer makroszkopikusan mérhető mágnesezettsége az idő függvényében változni fog, ha egy kezdeti állapot után magára hagyjuk, amint ezt eddig már láttuk. Ha azonban külső rádiófrekvenciás térrel sugározzuk be a rendszert, és e tér frekvenciája közel esik a Larmor-frekvenciához, úgy átmeneteket indukálhatunk, mágneses rezonancia-abszorpciót hozunk létre. Leírását Bloch végezte el elsőként, a makroszkopikus mágnesezettség időfüggését a következő egyenletekkel fejezte ki:

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma(M_y H_0 + M_z H_1 \sin \omega t) - \frac{M_z}{T_2}$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma(M_z H_1 \cos \omega t - M_z H_0) - \frac{M_y}{T_2}$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma(-M_x H_1 \sin \omega t - M_y H_1 \cos \omega t) - \frac{M_z - M_0}{T_1}$$

Látjuk, hogy ez a felírás megfelel a

$$\frac{d\mathbf{M}}{dt} = \gamma \mathbf{M} \times \mathbf{H}_0$$

vektoregyenlet alkalmazásának, ha **H** komponensei:

$$H_x = H_1 \cos \omega t, \quad H_y = H_1 \sin \omega t, \quad H_z = H_0$$

valamint figyelembe vesszük a relaxációs egyenleteket a megbeszélt módon.

A Bloch-egyenletek megoldása időben konstans amplitúdójú külső rádiófrekvenciás tér és a rezonancián való lassú áthaladás esetén viszonylag egyszerű. A megoldás számunkra fontos egyik eredménye az a tény, hogy a makroszkopikus mágnesezettségnek a rezonancia közelében a külső $\mathbf{H}_1$ térrel azonos irányú és fázisú komponense is létrejön

$$\mathbf{M} = (\chi' \sin \omega t + \chi'' \cos \omega t)\, 2\mathbf{H}_1$$

aminek következménye energia abszorbció a rádiófrekvenciás térből a spinrendszerbe. A Bloch-egyenletek az alábbi frekvenciától függő megoldást adják χ'' értékére:

$$\chi'' = \frac{1}{2} \chi_0 \omega_0 T_2 \frac{1}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} \tag{3}$$

(A $''$ jelentése, hogy a térrel azonos fázisú komponensről van szó.) A frekvencia függvényében ábrázolva éppen a már korábban bemutatott 4. ábrán látható görbét kapjuk (Lorentz-görbe).

Figyeljük meg a nevezőben a $\gamma^2 H_1^2 T_1 T_2$ tagot. Ez a tér nagyságával nő, és bizonyos terek esetén az abszorpció rezonancián vett értékének jelentős csökkenését eredményezi. Neve *telítési* faktor. Rezonancia abszorpció mérésénél értékét mindig kontrollálnunk kell.

A (3) egyenletből a benne szereplő χ_0 egyenáramú szuszceptibilitás miatt következtetéseket tehetünk a magrezonancia abszorpciós mérés érzékenységére, sőt ezen túlmenően, összehasonlíthatjuk adott paraméterek esetén a különböző atommagok által szolgáltatott jelet. χ_0 korábban megadott értékét fellapozva láthatjuk, hogy az abszorpció H_0^2-el arányos, azaz minél nagyobb térben kell végeznünk a mérést. Másrészt, mivel a mágneses terek előállításakor objektív korlátokkal rendelkezünk, azonos, lehető legmagasabb térben, de a szükséges különböző frekvenciákkal megvalósítva az egyes magok rezonanciáit, azt találjuk, hogy a mérés érzékenysége, a mechanikai és mágneses momentum értékével a következő módon változik:

$$S \sim \frac{I+1}{I^2} \mu^3 H_0^2 N$$

ahol N a magok száma. Ezt az összefüggést mindig szemmel kell tartanunk a mérések tervezésénél. Ennek következménye, hogy például egy deuterált anyag rezonancia jele az azonos proton tartalmúéhoz képest mintegy két nagyságrenddel kisebb lesz.

A mágneses rezonancia abszorpció mérésének elvi vázlatát és egy modern spektrométer jellemzőit az apparatív részben beszéljük meg.

Protonrezonancia spektroszkópia

Az előzőekben megismertük, hogyan viselkednek a környezetüktől izolált, „szabad" atommagok erős külső mágneses térben, és hogyan valósul meg a rádiófrekvenciás H_1 tér hatására a magrezonancia jelensége. A magok környezetét eddig kizárólag mint rácsot, ill. spin-rendszert vettük figyelembe, amely a relaxációs folyamat útján biztosítja az energiaabszorpció folyamatosságát és ezáltal a magrezonancia kísérleti észlelhetőségét. A reális rendszerekben az atommagokat elektronok és egyéb atommagok veszik körül, amelyek egyrészt maguk is a külső mágneses tér hatása alatt állnak, másrészt mint töltéssel és mágneses momentummal rendelkező részecskék kölcsönhatásba kerülhetnek a rezonanciába lépő atommagokkal, megváltoztatva azok szabad állapotára jellemző mágneses energiaszintjeit. A változás — a kölcsönhatás természetétől függően — jelentheti a Zeeman-nívók közötti távolság megváltozását, újabb energia-szintek megjelenését, vagy pedig egy adott állapot élettartamának csökkenése folytán a Zeeman-nívók „elmosódását", ill. az előbbiek kombinációit. A környezet által létesített kölcsönhatások energiája általában igen kicsiny; az eredeti Zeeman-energiának gyakran csak 10^{-6}—10^{-8}-ad része, azonban messzemenően specifikusak a vizsgált mag környezetére. Ha valamely mag-fajtát a vizsgált anyagminta több, egymástól eltérő környezetben tartalmazza és a magrezonancia észlelése céljából a spektrométer mágneses terét vagy a rádiófrekvenciás tér frekvenciáját változtatva végighaladunk az adott magra jellemző (l. I. táblázat) rezonancia-feltétel környezetén, azt tapasztaljuk, hogy a különböző környezetben levő magok abszorpciója eltérő mágneses tér, ill. frekvencia-értéknél jelentkezik. A következőkben röviden áttekintjük az így létrejött magrezonancia spektrumok jellemző paramétereit, valamint azok összefüggését az anyagminta különböző tulajdonságaival.

Elvileg bármely mágneses momentummal rendelkező atommag alkalmas arra, hogy magrezonancia spektrumán keresztül „felvilágosítást adjon" környezetéről vagy e környezetben végbemenő változásokról. A gyakorlatban

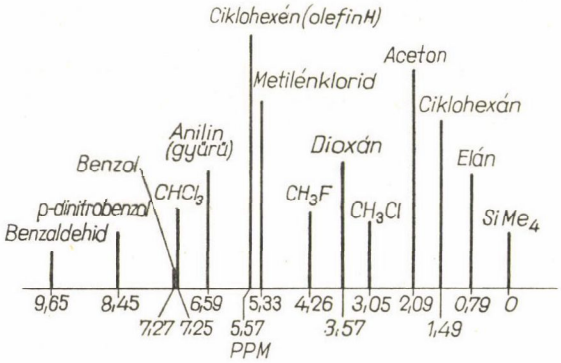
1. táblázat

Néhány atommag magrezonanciás adatai

Izotóp	NMR frekvencia 10 kGauss térben, MHZ	Természetes előfordulás, %	Relatív érzékenység állandó mágneses térben	Mágneses momentum	Spin kvantum-szám	Kvadrupól momentum, $e \times 10^{-24}$ cm^2
^{1}H	42,576	99,9844	1,000	2,79268	1/2	...
^{2}H	6,5357	0,0156	0,00964	0,85738	1	$2{,}77 \cdot 10^{-3}$
^{10}B	4,575	18,83	0,0199	1,8005	3	$7{,}4 \cdot 10^{-2}$
^{11}B	13,660	81,17	0,165	2,6880	3/2	$3{,}55 \cdot 10^{-2}$
^{12}C	...	98,9	...	...	0	...
^{13}C	10,705	1,108	0,0159	0,70220	1/2	...
^{14}N	3,076	99,635	0,00101	0,40358	1	$7{,}1 \cdot 10^{-2}$
^{15}N	4,315	0,365	0,00104	−0,28304	1/2	...
^{16}O	...	99,76	...	...	0	...
^{17}O	5,772	0,037	0,0291	−1,8930	5/2	$-4{,}0 \cdot 10^{-3}$
^{19}F	40,055	100	0,834	2,6273	1/2	...
^{28}Si	...	92,28	...	...	0	...
^{29}Si	8,458	4,70	0,0785	−0,55548	1/2	...
^{30}Si	...	3,02	...	...	0	...
^{31}P	17,236	100	0,0664	1,1305	1/2	...
^{32}S	...	95,06	...	...	0	...
^{33}S	3,266	0,74	0,00226	0,64274	3/2	−0,053
^{34}S	...	4,2	...	...	0	...
^{35}Cl	4,172	75,4	0,00471	0,82091	3/2	$-7{,}9 \cdot 10^{-2}$
^{37}Cl	3,472	24,6	0,00272	0,68330	3/2	$-6{,}21 \cdot 10^{-2}$
^{79}Br	10,667	50,57	0,0786	2,0991	3/2	0,34
^{81}Br	11,499	49,43	0,0984	2,2626	3/2	0,28
^{127}I	8,519	100	0,0935	2,7937	5/2	−0,75

azonban részben experimentális, részben interpretálási okok miatt meg szokás különböztetni magrezonancia céljaira jól, közepesen vagy csak nehezen alkalmazható magokat. A jól alkalmazható magokra jellemző: *a)* százalékosan nagy természetes előfordulás, *b)* nagy mágneses momentum és *c)* $^1/_2$-es magspin, azaz zérus kvadrupól momentum. Mindezek a jellemzők elsősorban az adott magra végrehajtott rezonancia kísérlet relatív érzékenységét befolyásolják, és így jelentőségük az apparatív technika fejlődésével bizonyos mértékig csökken. A közepesen vagy nehezen alkalmazható magok esetében ezek a feltételek részben, ill. egyáltalán nem teljesülnek. Az atommagok között kitüntetett helyet foglalnak el a protonok: $^1/_2$ spinjük, valamennyi mag közül legnagyobb rezonancia effektusuk, valamint gyakoriságuk a szerves vegyületekben érthető módon arra vezetett, hogy a magrezonancia spektroszkópiának protonokkal foglalkozó ága — a *protonrezonancia spektroszkópia* — terjedt el a legnagyobb mértékben. Tekintettel arra, hogy a protonrezonancia spektroszkópia az organikus vegyületek szerkezetkutatása terén szinte korlátlan lehetőségeket nyitott meg, a magrezonancia spektrumok értelmezése ugyancsak ezen a téren fejlődött ki a legjobban. Ilyen meggondolásból kiindulva a magrezonancia spektrumok sajátságait mi is a protonrezonancia keretei között mutatjuk be.

A magrezonancia spektrumok további két fő típusra oszthatók, aszerint, hogy a vizsgálati minta folyadék- (ill. gáz-) vagy szilárd-fázisú formában kerül mérésre. Folyadék-fázisú minták esetében a magok között fellépő anizotróp mágneses dipólus kölcsönhatás a molekulák gyors termikus mozgása folytán kiátlagolódik, ezért a rezonancia vonalak szélességét, ha egyéb tényező nem játszik szerepet, többnyire csak a spektrométer felbontóképessége szabja meg ($5 \cdot 10^{-9}$). Szilárd-fázisú mintáknál e kiátlagolódás a részecskék rögzítettsége miatt nem történik meg, és így a vonalszélesség az előbbinek mintegy 100—1000-szerese, emiatt a spektrum molekulaszerkezet felderítésére felhasználható részletei nem különböztethetők meg. Az alábbiakban a pro-



7. *ábra.* Néhány egyszerű szerves vegyület protonjainak kémiai eltolódása széntetrakloridos oldatban mérve

tonrezonancia spektroszkópiának folyadék- (és gáz-) fázisú minták esetében használatos *nagyfelbontású* változatát ismertetjük. Az ún. *szélessávú protonrezonancia spektroszkópiát*, valamint az egyéb magok rezonancia spektroszkópiájának jellegzetességeit csak egészen röviden érintjük.

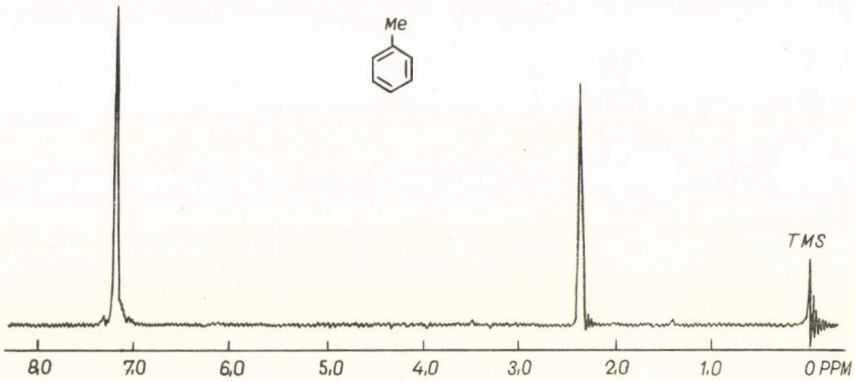
A kémiai eltolódás

Ha az abszorpciós cellaként szolgáló mintatartó csőbe különböző hidrogéntartalmú folyadékmintákat helyezünk, azt tapasztaljuk, hogy a $\nu_0 = \gamma H_0$ egyenlet csak közelítő érvényű, amennyiben a protonrezonancia létrehozásához szükséges külső mágneses tér értéke egy kicsit különbözni fog aszerint, hogy milyen a kérdéses protontartalmú vegyület kémiai szerkezete (l. 7. ábra). Hasonló helyzet áll elő akkor is, ha a hidrogénatomok egyazon molekulához tartoznak, de kémiai viselkedésük eltérő, mint pl. az aromás és alifás protonoké a toluolban (l. 8. ábra). A rezonancia feltételben mutatkozó ilyen különbségek — a jelenség kémiai eredetére való tekintettel — *kémiai eltolódás* néven ismertek.

A kémiai eltolódás oka abban keresendő, hogy a magokat (protonokat) körülvevő elektronok a külső mágneses tér hatására kis, helyi áramokat hoznak létre, amelyek Lenz törvénye értelmében olyan irányban folynak, hogy az általuk létesített mágneses dipólusok csökkentsék a külső mágneses tér hatását. (Ez az oka egyébként az anyagok diamágneses tulajdonságának is.) Az elektronok indukált pályamozgása következtében tehát a mag által „érzett" mágneses tér, H_i, kisebb lesz, mint a mintára ható külső H_0 tér. Ugyanakkor a kétfajta tér-érték közötti eltérés a H_0 térerősséggel lesz arányos:

$$H_0 - H_i = \sigma_i H_0$$

$$H_i = H_0 (1 - \sigma_i)$$



8. ábra. A toluol nagyfelbontású protonrezonancia spektruma, tetrametil-szilán belső referenssel

ahol σ_i a vizsgált mag aktuális (i-edik) kémiai környezetére jellemző, a mágneses tértől független, dimenzionélküli konstans, az ún. *árnyékolási együttható.*

Az elektronok árnyékoló hatását is figyelembe vevő rezonancia-feltétel alakja az előbbiek szerint:

$$\nu_i = \gamma H_0 (1 - \sigma_i)$$

$$\nu_i = \nu_0 - \gamma H_0 \sigma_i$$

ahol ν_0 az „árnyékolatlan" mag rezonancia-frekvenciája a H_0 térben.

Az eltolódási effektus mennyiségi jellemzésére a *kémiai eltolódási paraméter,* vagy röviden a kémiai eltolódás szolgál. Számértéke igen jó közelítéssel megegyezik az árnyékolási együtthatóéval. Az eltérést, amely elsősorban a definíciót érinti, az indokolja, hogy a gyakorlatban a mágneses terek abszolút értékének meghatározása nem végezhető el kellő (10^{-8}-at meghaladó) pontossággal, emiatt sem a H_0, sem pedig a hozzá tartozó ν_0 értéke pontosan nem

ismeretes. Ennek megfelelően a kémiai eltolódást az árnyékolatlan mag rezonancia-paraméterei helyett valamely, a vizsgálati mintához hozzáadott referens anyag megfelelő H_i, ill. ν_i értékeire szokás vonatkoztatni. Így az eltolódási érték meghatározása a mérendő és a referencia jel közötti rezonancia frekvencia különbség mérésére vezethető vissza, ami sokkal nagyobb pontossággal elvégezhető. A protonrezonancia spektroszkópiában referens anyagként legáltalánosabban a tetrametil-szilánt (TMS) alkalmazzák, mivel igen intenzív és keskeny rezonancia vonalat ad, árnyékolási együtthatója csaknem valamennyi protontartalmú anyagé közül a legnagyobb, továbbá rendkívül iners és az oldatból könnyen eltávolítható. (Vizes oldatok esetén a TMS vízoldható analogonját, az 1,1,2-triszilil-propánszulfonsavas-nátriumot használják.) A TMS-re vonatkoztatott kémiai eltolódások egyik elfogadott kifejezésmódja, az ún. „delta"-skála, definíciószerűen a következő:

$$\delta(\text{p.p.m.}) = \frac{\nu_i - \nu_{TMS}}{\nu_0} \cdot 10^6; \quad \delta_{TMS} \equiv 0 \text{ p. p. m.}$$

ahol a számláló a mérendő és a TMS protonok rezonanciája közötti eltérés Hz-ben kifejezve, ν_0 a mérési frekvencia (Hz-ben). Az így adódó 10^{-6} egységekből (p.p.m. = parts per million) álló skála az eltolódási értékeket könnyen kezelhető számértékekben fejezi ki. A delta-skálához hasonló az ugyancsak elterjedt „tau"-skála:

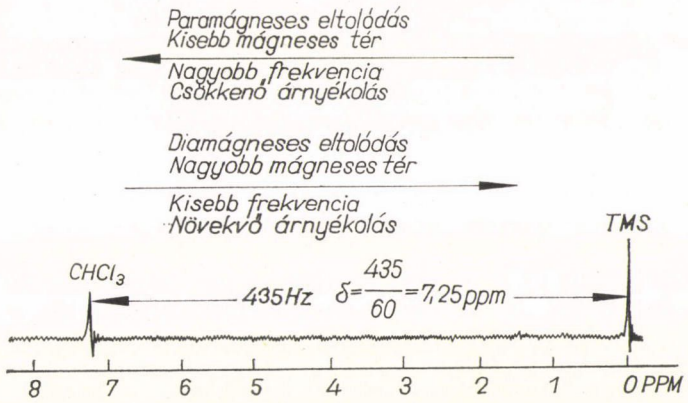
$$\tau\,(\text{p.p.m.}) = 10{,}00 - \delta\,(\text{p.p.m.})$$

Mi a következőkben az eltolódási értékeket δ egységekben adjuk meg. Ezeket az értékeket tüntettük fel a 7. és 8. ábrán is. Szemléletesség kedvéért a 9. ábrán feltüntettük az eltolódási skála értelmezését, valamint a vonalak spektrumbeli „mozgásának" jellemzésére használt kifejezések jelentését.

A kémiai eltolódást meghatározó tényezők

A protonok kémiai eltolódása igen kis tartományra, a külső mágneses tér értékének mintegy $1 \cdot 10^{-5}$ részére (10 ppm) korlátozódik. (Egyéb magoknál általában az eltolódás a külső tér 10^{-4}—10^{-3} része.) Az eltolódások kis értéke a hidrogén atomok egyedül álló elektronszerkezetével magyarázható. A protonrezonancia spektrumok kémiai eltolódásainak elméleti interpretálása többnyire csak kvalitatíve végezhető el az elméleti számítások nagyobb hibakorlátja miatt. Az összegyűjtött megfigyelések szisztematikus rendezése azonban lehetővé tette, hogy a protonok kémiai eltolódásait néhány racionális molekulaszerkezeti tényező hatásának tükrében tárgyalják. A legfontosabbak ezek közül a következők.

1. A proton közvetlen környezetében tartózkodó elektronoknak a külső mágneses tér által indukált pályamozgása — mint láttuk — diamágneses árnyékolást eredményez. Az árnyékoló hatás arányos az aktuális proton körüli elektronsűrűséggel, ezért ha az elektronsűrűség valamely szomszédos elektronegatív csoport induktív befolyására kisebb lesz, úgy árnyékolási együttható értéke lecsökken, következésképpen az adott proton („delta"-skálában kifejezett) eltolódása megnövekszik. Így például a metil-protonok rezonanciája a kisebb mágneses terek felé tolódik el, ha a szomszédos metilén-csoportot rendre —NH-, —S-, —O-val cseréljük fel. Hasonló értelemben

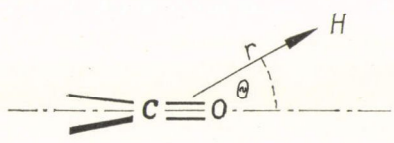


9. ábra. Az eltolódási skála értelmezése. Mérési frekvencia 60 MHz

interpretálható egyéb elektronegatív vagy elektropozitív szubsztituens hatása is.

2. A molekulák túlnyomó többségénél az elektroneloszlás nem szimmetrikus. A szimmetriától való eltérés különösen jelentős lehet egyes kromofórok, mint pl. a karbonil-csoport aszimmetrikus elektroneloszlású kémiai kötés környezetében. Ilyenkor az árnyékolási tényező, következésképpen a kémiai eltolódás is, irányfüggő, anizotróp és számértékét az szabja meg, hogy a kérdéses proton milyen távolságra és milyen irányban helyezkedik el a diamágneses anizotrópiát okozó csoport, kémiai kötés, centrumától. A viszonyokat közelítőleg az alábbi összefüggés írja le:

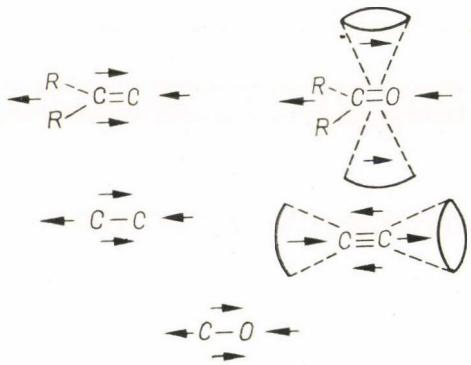
$$\sigma = \frac{(3\cos^2\Theta - 1)}{3r^3}\,\Delta\chi$$



10. ábra

ahol r és Θ a proton és az anizotrópia centrum relatív helyzetét meghatározó távolság, ill. szög (l. a képlet melletti ábrát), és $\Delta\chi$ a diamágneses szuszceptibilitás elektron-eloszlás aszimmetriájától eredő anizotrópiája. A karbonil-csoport

esetében $\Delta\chi$ előjele negatív, ennek megfelelően, ha a kérdéses proton a karbonil-csoport síkjában helyezkedik el, az árnyékolási együttható ugyanígy negatív értéket vesz fel, következésképpen a proton rezonanciája a kisebb térértékek felé tolódik el. Ha viszont a proton relatív térhelyzete megváltozik, a $(3\cos^2\Theta - 1)$ tag előjelet vált („a proton a karbonil-csoport árnyékolási kúpjába kerül") és a rezonancia vonal diamágneses eltolódást szenved. (Néhány diamágneses anizotrópiát okozó csoport, ill. kémiai kötés hatását a protonok eltolódására a 11. ábra szemlélteti.) Az amid-karbonil-csoport anizotróp hatására vezethető vissza például az a megfigyelés, hogy az N,N-dimetilformamid protonrezonancia spektrumában (l. 12. ábra) két N-metil

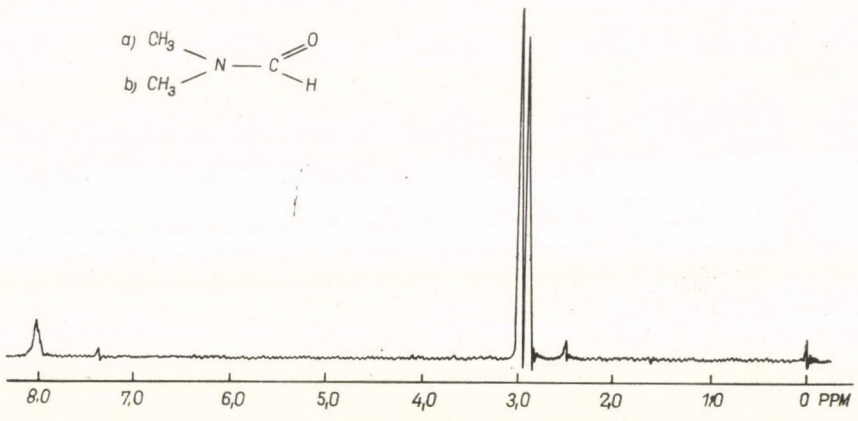


11. ábra. Proton jel eltolódásának változási iránya a proton és néhány funkcionális csoport kölcsönös térhelyzetének függvényében

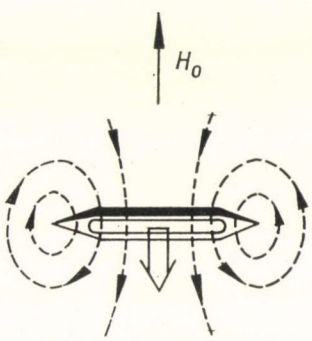
rezonancia vonal jelentkezik. Az amidokra jellemző parciális kettőskötés kialakulása miatt a molekula többé-kevésbé sík elrendezésű, és így az egyik metil-csoport protonjai közelebb kerülnek a karbonil-csoport síkjához, ami a másik metil-csoport protonjaihoz képest nagyobb eltolódásban nyilvánul meg. Hasonlóképpen a C—C kötés anizotrópiájával magyarázható, hogy a konformatíve stabilis ciklohexán jellegű vegyületekben (pl. alkaloidákban, szteroidokban stb.) az axiális és ekvatoriális protonok eltérő kémiai eltolódást mutatnak.

3. Aromás vagy jelentősen konjugált rendszerekben a delokalizált π-elektronok a külső mágneses tér hatására a gyűrű mentén keringő áramot, az áramok pedig indukált mágneses teret hoznak létre. A mágneses tér erővonalait benzol gyűrű esetében a 13. ábra szemlélteti. Ha a vizsgált proton az aromás gyűrű síkjában helyezkedik el, a gyűrűáram létesítette helyi mágneses tér megnöveli a külső tér hatását és a rezonancia vonal a kisebb terek felé tolódik. Ezzel értelmezhető részben az aromás protonok jellegzetesen kémiai eltolódása (l. 7. ábra). Ha viszont a proton molekulában elfoglalt helyzete folytán az aromás-gyűrű síkja fölé kerül, eltolódása — a gyűrű mágneses terének diamágneses hatása folytán — lecsökken. Különleges

esetet képviselnek ebből a szempontból az erősen konjugált porfin-váz belsejében elhelyezkedő NH protonok. Az indukált mágneses tér e protonok helyén jelentősen csökkenti a külső mágneses tér hatását, és így a rezonancia-vonal a nagyobb terek irányában tolódik el. A gyűrűáramok nagyságára adott esetben jellemző, hogy a porfin-váz —NH protonjai mutatják az eddig ismert legnagyobb diamágneses eltolódást, rezonancia vonaluk a TMS-tól 4—5 ppm-re a nagyobb terek irányában jelentkezik.



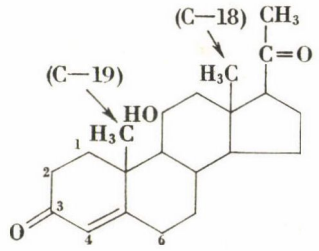
12. ábra



13. ábra

4. Ha valamely proton vagy protontartalmú csoport sztérikus okok miatt más csoport közelébe kerül, a csoportok között van der Waals kölcsönhatás léphet fel, amely az elektron-eloszlás aszimmetriáját, és ezen keresztül az árnyékolási tényező csökkenését vonhatja maga után. Ezzel a hatással értelmezhető egyes oldószerek specifikus hatása a kémiai eltolódásra, sztérikusan gátolt helyzetben levő protonok eltolódásának növekedése stb. Ha a

kölcsönható csoport erősen poláris, úgy sztérikus közelsége a proton környékén jelentős elektron polarizációt okozhat, ami ugyancsak az árnyékolás csökkenését, azaz a rezonanciavonalnak a kisebb terek felé történő eltolódását vonja maga után. Ilyen effektus nyilvánul meg például hidrogén-hidak kialakulásakor. A hidrogén-hídban résztvevő protonok rezonanciája általában 10—15 ppm körüli tartományban jelentkezik.



14. ábra. Példa a kémiai eltolódásnak számítás útján történő meghatározására. A felhasznált additivitási táblázat a szterán-váz különböző helyzetű szubsztituenseinek számszerű hatását tartalmazza a C-18 és C-19 metil protonok eltolódásaira az alap-szteroidokban mért értékekhez képest

	C-19	C-18
5α, 14α-androsztán (vonatkozási alapvegyület)	0,792 ppm	0,692 ppm
3-oxo-Δ^4-csoport	0,416	0,075
11α-hidroxil	0,116	0,025
17β-$COCH_3$	−0,008	−0,083
Számított eltolódás	1,316 ppm	0,709 ppm
Mért eltolódás	1,328 ppm	0,710 ppm

A felsorolt tényezők közül az 1-es és 4-es pontban ismertetettek hatása a kémiai kötések számával erőteljesen csökken (kivételt képez a konjugáció esete), így például egy szubsztituens induktív hatása a tőle β helyzetben levő proton eltolódásán alig jelentkezik. Ezzel szemben a 2. és 3. pontban összefoglalt tényezők „távolra hatók", amennyiben befolyásuk független a kérdéses protont elválasztó kötések számától.

A protonok kémiai eltolódását meghatározó tényezők elég jó közelítéssel additívek, ami lehetővé teszi hatásuk különválasztását, valamint azt is, hogy elég nagyszámú megfigyelés eredményeként a várható eltolódási értékeket számítás útján (ún. additivitási táblázatok segítségével) is meg lehessen határozni. Egy ilyen példát mutat a 14. ábra. A protoneltolódások előre történő becslése, valamint ennek fordítottja, azaz protonok, ill. protoncsoportok azonosítása eltolódásaik alapján, általában empirikus táblázatok, spektrumatlaszok, vagy analóg-vegyületek tanulmányozásával végezhető el. Egy egyszerűsített eltolódási táblázatot mellékelünk (l. II. táblázat).

II. táblázat

Szénatomhoz kapcsolódó protonok kémiai eltolódásai
(Tetrametil-szilánra vonatkoztatva)

	Metil protonok	δ ppm
$CH_3—C$	(telítetlen szénhidrogén lánc)	0,6—1,0
$CH_3—C—C—X$	(X = NR_2, COR, OR, SR, Cl, NO_2, Br, I)	0,8—1,1
$CH_3—C—X$	(X = NR_2, COR, OR, SR, Cl, NO_2, Br, I)	0,9—1,9
$CH_3—C=C$		1,6—2,4
$CH_3—CO—X$	(X = OR, R, H, SH, Ar)	2,0—2,6
$CH_3—S—X$	(X = Ar, R)	2,1—2,6
$CH_3—\overset{+}{N}$	(NR_2, N—CO—R, $\overset{+}{N}R_3$)	2,1—3,3
$CH_3—X$	(X = I, Br, Cl, F)	2,1—4,3
$CH_3—Ar$		2,3—2,8
$CH_3—O—X$	(X = R, H, Ar, CO—Ar, CO—CF_3)	3,3—4,0
	Metilén protonok	
ciklopropán		0,22
$—CH_2—$	(gyűrűs, merev vázú)	1,0—2,5
$—CH_2—$	(nyíltláncú)	1,2—1,4
$—CH_2—$	(gyűrűs, tagszám >4)	1,3—1,5
$—CH_2—C—X$	(X = NR_2, COR, OR, SR, Cl, NO_2, Br, I)	1,3—1,9
$—CH_2—CO—X$	(X = OR, R, H, SH, Ar)	2,1—2,4
epoxid		2,3—2,6
$—CH_2—\overset{+}{N}$	(NR_2, N—CO—R, $\overset{+}{N}R_3$)	2,3—3,4
$—CH_2—S—X$	(X = Ar, R)	2,5—2,6
$—CH_2—Ar$		2,6—3,0
$—CH_2—X$	(X = I, Br, Cl, F)	3,1—4,4
$—CH_2—O—X$	(X = R, H, Ar, CO—Ar, CO—CF_3)	3,4—4,3
$CH_2=C$	(nem konjugált)	4,6—5,0
$CH_2=C$	(konjugált)	5,3—5,7
	Metin protonok	δ ppm
$—\overset{\vert}{C}H—$	(nyíltláncú)	1,4—1,7
$—\overset{\vert}{C}H—C—X$	(X = NR_2, COR, OR, SR, Cl, NO_2, Br, I)	1,5—1,9
$CH\equiv C—X$	(X = CH_3, COH, Ar)	1,8—3,1
$—\overset{\vert}{C}H—CO—X$	(X = OR, R, H, SH, Ar)	2,4—2,6
epoxid		2,6—3,1
$CH\equiv C—$	(konjugált)	2,8—3,1
$—\overset{\vert}{C}H—\overset{+}{N}$	(NR_2, N—CO—R, $\overset{+}{N}R_3$)	2,8—2,9
$—\overset{\vert}{C}H—Ar$		2,8—2,9
$—\overset{\vert}{C}H—S—X$	(X = R, Ar)	3,1—3,2
$—\overset{\vert}{C}H—O—X$	(X = R, H, Ar, CO—Ar, CO—CF_3)	3,8—5,1
$—\overset{\vert}{C}H—$	(gyűrűs, hattagú)	3,9—4,3
$—\overset{\vert}{C}H—X$	(X = I, Br, Cl, F)	4,0—4,2
$—\overset{\vert}{C}H—$	(gyűrűs, öttagú)	4,3—4,5

—CH=	(nyíltláncú, nem konjugált)	5,1—5,9
—CH=	(gyűrűs, nem konjugált)	5,3—5,9
—CH=	(nyíltláncú, konjugált)	5,8—6,4
—CH=	(gyűrűs, konjugált)	5,8—6,7
—CH=	(hetero-aromás)	6,2—8,6
—CH=	(aromás, X = NR_2, H, NO_2)	6,4—8,3
—CH=O		10,0—10,5

Megjegyzés. Az oxigénhez, nitrogénhez és kénhez kapcsolódó protonok kémiai eltolódásai — a cserereakciók, asszociációs egyensúlyok és hidrogén híd képződés iránti hajlam miatt — erősen oldószer, koncentráció és hőfokfüggőek. Fentihez hasonló egyszerű táblázatos összefoglalásuk emiatt nem lehetséges.

A spektrumvonalak intenzitása

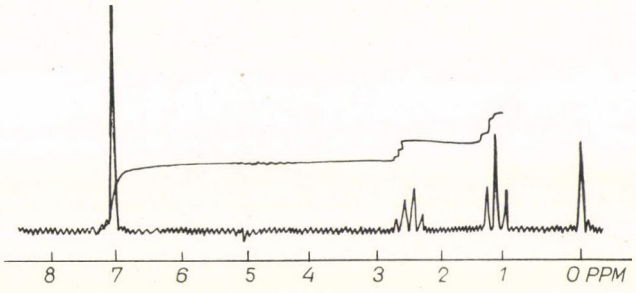
A toluol protonrezonancia spektruma (l. 8. ábra), a metil- és az aromás protonok eltérő eltolódásának megfelelően, két vonalat tartalmaz. A két vonal magassága jelentős eltérést mutat, arányuk közelítőleg 5 : 3, azaz megfelel a rezonancia vonalat adó protonok számának. A közelítő helyett pontos értéket akkor kapjuk meg, ha a vonalmagasság helyett a megfelelő rezonancia görbék alatti területeket (integrált vonalintenzitásokat) viszonyítjuk egymáshoz. Ez a proton (és egyéb mag) rezonancia spektroszkópiának másik fontos sajátsága, amit teljes általánosságban úgy fogalmazhatunk meg, hogy egy spektrumon belül (megfelelő kísérleti feltételek teljesülése esetén) a vonalak (integrált) intenzitásai úgy aránylanak egymáshoz, mint az egyes vonalakhoz tartozó protonok (ill. egyéb magok) relatív mennyiségei az adott vizsgálati mintában. Értelemszerűen, ha egy protonhoz a spektrumban egynél több vonal tartozik, úgy ezek összegét kell figyelembe venni. A spektrumvonalak integrálását a korszerű spektrométereken beépített elektronikus integrátor végzi el, és az integrált görbét az íróműszer segítségével az abszorpciós spektrum fölé rajzolja.

Spin-spin kölcsönhatás

A protonrezonancia spektrumokban egyes protonok rezonanciája gyakran nem egyetlen vonal, hanem több-kevesebb vonalból álló vonalcsoport — multiplet — formájában jelentkezik. Tipikus példa erre az etilbenzol 15. ábrán bemutatott spektruma. A vonalak spektrumbeli helyzetéből (összehasonlítva a toluol spektrumával), valamint az integrál görbe segítségével könnyen megállapítható, hogy a három vonalból álló vonalcsoport a metil protonoktól, a négy vonalból álló pedig a metilén protonoktól származik. A szóban forgó jelenség *spin-spin felhasadás* néven ismeretes, eredete a protonok közötti *spin-spin kölcsönhatás*. Az etilbenzol és a toluol spektrumából az is következik, hogy ez a kölcsönhatás nem minden esetben jelentkezik. Mint látni fogjuk, a spin-spin kölcsönhatás bekövetkezése a protonok közötti

kémiai kötések számától és típusától függ, a multiplet vonalainak számát pedig a kölcsönható protonok száma szabja meg. Mennyiségi jellemzője a *spin-spin kapcsolási állandó.*

A jelenség kvalitatív megértéséhez abból indulhatunk ki, hogy a protonok, ha egy molekulán belül elég közel kerülnek egymáshoz, mint mágneses momentummal rendelkező részecskék, mágneses kölcsönhatásba lépnek egymással, és ezáltal kölcsönösen megváltoztatják energiájukat. E kölcsönhatás egyik módja a magok közötti dipól-dipól kölcsönhatás, amit két szomszédos rögzített helyzetű $I = {}^1/_2$ spinű mag esetén úgy képzelhetünk el, hogy mindkét mag a másik helyén egy H_d lokális mágneses teret hoz létre,



15. ábra

amely a létrehozó mag orientációinak megfelelően hozzáadódik, ill. levonódik a H_i tér értékéből. A magokra ható tér így a

$$H = H_i \pm H_d$$

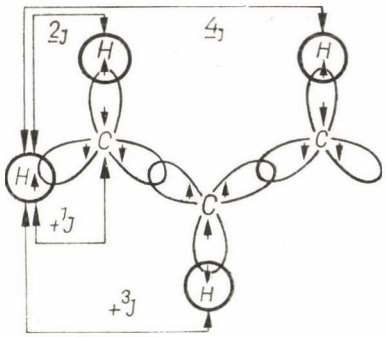
alakban írható fel, ahol

$$H_d = \frac{\mu}{r^3}(3\cos^2\Theta - 1)$$

itt r a két mag közötti távolság, Θ pedig az r és a H_0 között bezárt szög. A dipól-dipól kölcsönhatás eredményeként tehát mindkét mag rezonanciavonala egy-egy dubletre hasad fel, a felhasadás nagysága $2H_d = 2\mu/r^3\,(3\cos^2\Theta - 1)$. Folyadékfázisú rendszerek esetén a részecskék gyors termikus mozgása következtében a Θ szög nagysága a precessziós idő alatt valamennyi értékét felveheti, emiatt a dipól-dipól kölcsönhatás kiátlagolódik, azaz nem eredményezheti közvetlenül a vonalak felhasadását. (A dipól-dipól kölcsönhatás szerepe erősen viszkózus, ill. szilárd minták esetén nagymértékben megnövekszik.)

Elméleti vizsgálatok azonban arra vezettek, hogy a spin-spin kapcsolás a magokat körülvevő elektronok közvetítésével jöhet létre. Ezt két mag esetén a következő módon szemléltethetjük. A mag és az elektron között

mágneses kölcsönhatás lép fel, amely arra vezet, hogy az elektron spinje a mag spinhez képest antiparalel „beállást" igyekszik felvenni. Egy kémiai kötésen belül az elektron spinek orientációja szükségszerűen antiparalel, emiatt a másik atom elektronja az első mag spinjéhez képest paralel orientációra törekszik. Ez utóbbi elektron viszont mágneses kölcsönhatásba lép a második maggal, és annak orientációját úgy igyekszik megváltoztatni, hogy az első maggal antiparalel állású legyen. Kémiai kötésben levő két atom magja tehát az elektronszerkezet közvetítésével befolyásolni tudja egymás magspinjének orientációját. Mivel a külső mágneses térben mindkét mag kétfajta mágneses kvantumszám értékkel lehet jelen, mind a $+^1/_2$, mind a $-^1/_2$ beállású magnak meg van a párhuzamos orientált partnere, amellyel kölcsön-



16. ábra. A spin-spin kapcsolási állandó előjel-változásának szkematikus illusztrációja

hatásba léphet. A kölcsönhatás eredményeként a magok energiája megváltozik. A változás nagysága

$$J_{ij} \cdot \mathbf{I}_i \cdot \mathbf{I}_j$$

alakban írható fel, ahol J_{ij} a Hz-ben kifejezhető spin-spin kölcsönhatási energia, szokásos nevén spin-spin kapcsolási állandó. Előjele pozitív, ha a magok egymást a stabilisabb antiparalel orientációra kényszerítik. Két kötés közbeiktatása esetén (geminális protonok) az előjel negatív, három kötés esetén ismét pozitív stb. (l. 16. ábra). *A kapcsolási állandó nagysága*, mivel a spin-spin kölcsönhatás a külső mágneses tér részvétele nélkül valósul meg, *független a* H_0 *mindenkori értékétől* (eltérően a rezonancia vonalak kémiai eltolódásbeli különbségtől származó távolságától, mely — mint láttuk — a H_0 értékével egyenesen arányos).

A magok mágneses energia-nívóinak spin-spin kölcsönhatással összefüggő megváltozását a legegyszerűbb, de a gyakorlatban igen sokszor előforduló eset, a két kölcsönható (A és X) mag példáján ismertetjük.

Egymással kölcsönhatásban nem levő két proton együttes energiája a mágneses térben, az egyedi energiák összegeként írható fel, azaz:

$$E = h\,[\gamma H_0 (1 - \sigma_A)\, m_A + \gamma H_0 (1 - \sigma_X)\, m_X] \qquad (4)$$

ahol σ_A és σ_X a két proton kémiai eltolódása, m_A és m_X a megfelelő mágneses kvantumszámok. Ha ν_0-val jelöljük a két rezonancia-frekvencia középértékét és δ-val a protonok közötti eltolódás-különbséget, a fenti egyenletet egyszerűbb alakra hozhatjuk:

$$E = h\,[(\nu_0 - {}^1/_2\,\delta)\, m_A + (\nu_0 + {}^1/_2\,\delta)\, m_X] \qquad (5)$$

Az (5) egyenletnek megfelelő energia-diagramot a 17. ábra tünteti fel. A $\Delta m_A = 1$ és $\Delta m_X = 1$ kiválasztási szabálynak megfelelően a spektrumban δ nagyságú eltolódás különbséggel két abszorpciós vonal jelentkezik. Ezek frekvenciája ν_A, ill. ν_X:

$$\nu_A = \nu_0 - {}^1/_2\,\delta$$

$$\nu_X = \nu_0 + {}^1/_2\,\delta$$

Látható, hogy mindkét átmenet kétféleképpen valósulhat meg, azaz a rezonancia vonalak kétszeresen degeneráltak. A spin-spin kölcsönhatás fellépése esetén, ha a J_{AX} a protonok közötti eltolódás különbséghez képest kicsiny ($J_{AX}/\delta \ll 1$), az energia kifejezést $hJ_{AX}\, m_A\, m_X$ taggal kell kiegészíteni:

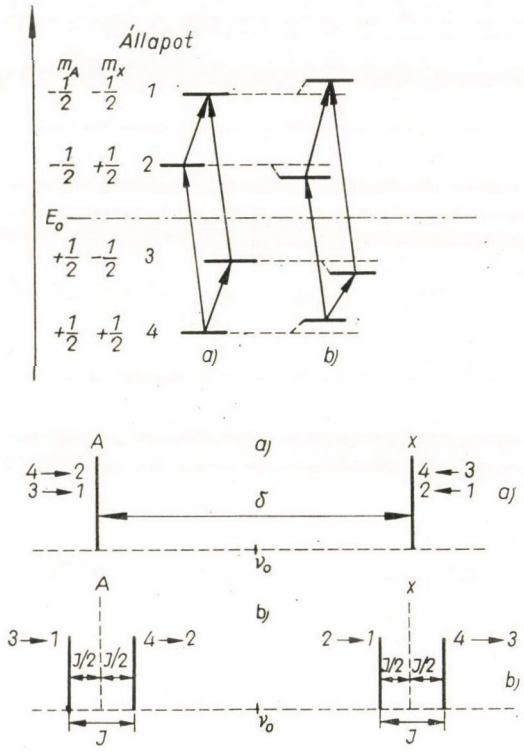
$$E = -h\,[(\nu_0 - {}^1/_2\,\delta)\, m_A + (\nu_0 + {}^1/_2\,\delta)\, m_X + J_{AX}\, m_A\, m_X]$$

ahonnan az energia különbségekre, ill. frekvenciákra a következő kifejezéseket kapjuk:

$$\Delta E_A = h\,(\nu_0 - {}^1/_2\,\delta) + J_{AX}\, m_X \quad \begin{cases} \nu_{A_1} = \nu_0 - {}^1/_2\,\delta + {}^1/_2\,J_{AX} \\ \nu_{A_2} = \nu_0 - {}^1/_2\,\delta - {}^1/_2\,J_{AX} \end{cases}$$

$$\Delta E_X = h\,(\nu_0 + {}^1/_2\,\delta) + J_{AX}\, m_A \quad \begin{cases} \nu_{X_1} = \nu_0 + {}^1/_2\,\delta + {}^1/_2\,J_{AX} \\ \nu_{X_2} = \nu_0 + {}^1/_2\,\delta - {}^1/_2\,J_{AX} \end{cases}$$

A spin-spin kölcsönhatás eredményeként megszűnt a nívók degenerációja, a vonalak J_{AX} nagyságú felhasadást mutatnak. Figyeljük meg (17. ábra), hogy az A proton rezonancia vonala az X proton m_X értéke szerint hasad fel és vice versa. Olyan esetben, amikor a kapcsolási állandó értéke a protonok közötti eltolódás különbségéhez képest nem elhanyagolhatóan kicsiny, a fenti egyenlet csak közelítőleg érvényes. A spektrum analízis módszereivel megmutathatjuk, hogy ilyenkor a multiplet vonalak számát, helyzetét és relatív intenzitásait a J/δ viszony szabja meg. Két proton esetén a keletkező vonalrendszer változását a 18. ábra szemlélteti.

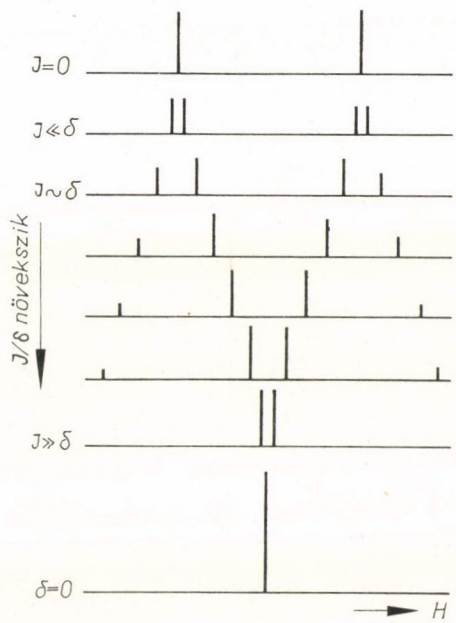


17. ábra

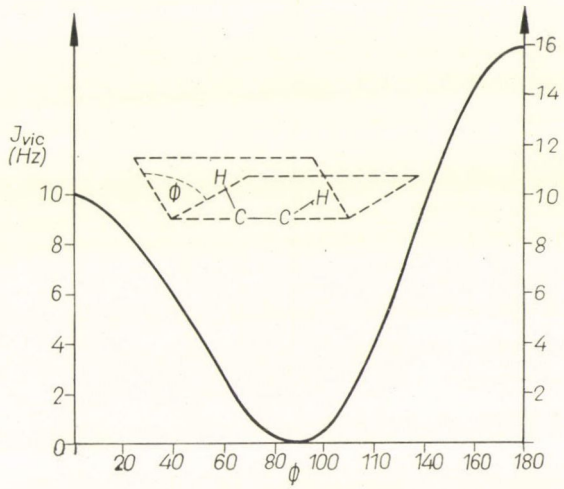
Összefüggés a kapcsolási állandó és a kémiai szerkezet között

A spin-spin kapcsolás mechanizmusának elméleti értelmezéséből következik, hogy a protonok közötti kapcsolási állandók nagysága a kötések számán túlmenően függvénye a kötést jellemző paramétereknek (kötés-rend, vegyérték-szög, hibridizáció, konjugációs effektus) is. Néhány tipikus proton-proton kapcsolási állandó értékét a III. táblázatban foglaltuk össze.

A kapcsolási állandó nagyságát befolyásoló szerkezeti tényezők közül fontossága miatt első helyen említendő meg a vegyértékszög hatása. Szomszédos szénatomokhoz kapcsolódó (vicinális) protonok esetén a kapcsolási állandónak (J_{vic}) a protonok közötti diéderes szögtől (Φ) való elméleti függését a 19. ábra szemlélteti. Látható, hogy a kapcsolási állandó maximális értékét (16 Hz) akkor veszi fel, amikor a protonok egymással 180°-os szöget zárnak be. A diéderes szög csökkenésével a kapcsolási állandó is csökken, 90° környékén minimumon halad át, és Φ további csökkenésével ismét növekedni kezd. Bár ez az összefüggés közelítő jellegű, és nem alkalmas a diéderes szög foknyi pontossággal való meghatározására, viszont kiváló szolgálatot tesz, ha pl. telített gyűrűs rendszerek esetén a protonok (vagy a proto-



18. ábra. Két kölcsönható proton spin multipletjének változása a J/δ függvényében



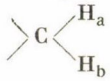
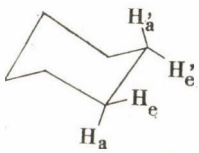
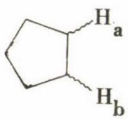
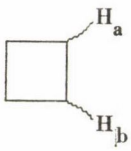
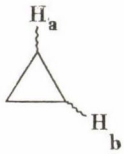
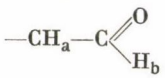
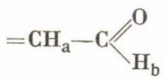
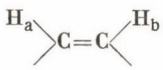
19. ábra. Vicinális helyzetű protonok kapcsolási állandójának függése a diéderes szögtől

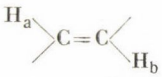
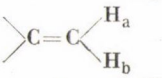
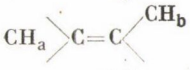
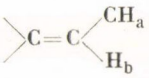
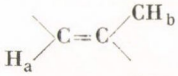
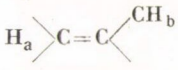
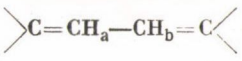
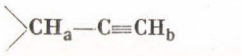
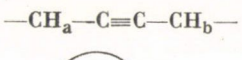
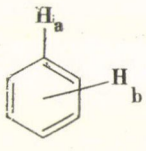
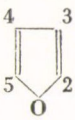
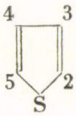
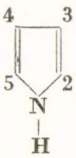
nok melletti szubsztituensek) relatív térhelyzetét akarjuk meghatározni (l. a III. táblázat idevonatkozó adatait). Hasonlóan a diéderes szögtől való függésre vezethető vissza a cisz- és transz-helyzetű olefin protonok kapcsolási állandójában mutatkozó eltérés is. A diéderes szög értékeinek megfelelően (0°, ill. 180°) a várható kapcsolási állandók ebben az esetben 10, ill. 16 Hz, ami jó egyezést mutat a mért értékek többségével.

A J_{vic} értékét a diéderes szögön kívül jelentősen befolyásolja a C—C—H vegyértékszögek (Θ, Θ') nagysága is, amit az alábbi példák világítanak meg.

III. táblázat

Protonok közötti spin-spin kapcsolási állandók

Tipus		J_{ab} (Hz)	J_{ab} (tipikus)
		+5— -30	-12— -15
$CH_a—CH_b$	(szabad rotáció)	6—8	7
$CH_a—C—CH_b$		0—1	0
	a—a'	6—14	8—10
	a—e'	0—5	2—3
	e—e'	0—5	2—3
	(cis vagy trans)	0—7	4—5
	(cis vagy trans)	6—10	8
	(cis > trans)	2—8	3—5
$—CH_a—OH_b$	(kicserélődés nélkül)	4—10	5
		1—3	2—3
		5—8	6
		6—12	10

		12—18	17
		0—3	0—2
		0—3	1—2
		4—10	7
		-0,5— -3,0	-1,5
		-0,5— -3,0	-2
		9—13	10
		-2— -3	
		2—3	
	3 tagú 4 tagú 5 tagú 6 tagú 7 tagú	0—2 2—4 5—7 8—11 10—13	
	orto meta para	7—10 1—3 0—1	7—9 2 0,5
	J(2—3) J(3—4) J(2—4) J(3—5) J(2—5) J(2—6)	5—6 7—9 1—2 1—2 0—1 0—1	5 8 1,5 1,5 1 0
	J(2—3) J(3—4) J(2—4) J(2—5)	1,3—2,0 3,1—3,8 0—1 1—2	1,8 3,6 0 1,5
	J(2—3) J(3—4) J(2—4) J(2—5)	4,9—6,2 3,4—5,0 1,2—1,7 3,2—3,7	5,4 4,0 1,5 3,4
	J(1—2) J(1—3) J(2—3) J(3—4) J(2—4) J(2—5)	2—3 2—3 2—3 3—4 1—2 1,5—2,5	

A vicinális protonok esetéhez hasonló szögfüggés figyelhető meg az azonos szénatomhoz kapcsolódó (geminális) protonok kapcsolási állandójánál (J_{gem}). A H—C—H vegyértékszög növekedése a számítások értelmében J_{gem} abszolút értékének csökkenését vonja maga után. (A geminális protonok közötti kapcsolási állandó előjele mint láttuk negatív.) Így például metán esetében ($\Theta = 109°$) $J_{gem} = -12{,}4$, míg terminális olefin = CHH protonok között ($\Theta = 120°$) mindössze 0 — —3 Hz.

Tekintettel arra, hogy a spin-spin kapcsolás az elektronok közvetítésével jön létre, várható, hogy az elektronok eloszlásában bekövetkező változások módosítják a kapcsolási állandók értékeit. Ilyen változások általában szubsztituensek induktív hatására állhatnak elő. Az elméleti vizsgálatok arra vezettek (és a kísérleti eredmények ezt messzemenően igazolták), hogy az induktív hatás elsősorban akkor eredményez jelentős változást a protonok közötti kapcsolási állandóban, ha a szubsztituens bevitele a szénatomok hibridizációjának megváltozását eredményezi. Ilyen meggondolásokból következik az is, hogy a J_{vic} értéke általában igen jó közelítéssel független a szubsztituens elektronegativitásától, ezzel szemben a J_{gem} értéke erre meglehetősen érzékenyen reagál. Érdemes kihangsúlyozni, hogy a szubsztituensek elektronegativitása eltérő irányban befolyásolja a vicinális és geminális kapcsolási állandókat (előbbi az elektronegativitásssl csökken, az utóbbi viszont növekszik). Ez az eltérés a kétféle kapcsolási állandó előjelbeli különbségében nyeri magyarázatát.

Telített vegyületek esetében a spin-spin kapcsolás három kémiai kötésen túl ritkán, vagy csak igen kis értékkel jelentkezik. Ennek az az oka, hogy a kölcsönhatást közvetítő elektronok lokalizáltak. Lényegesen megváltozik a helyzet, ha a protonok konjugált, vagy aromás rendszert alkotó szén-atomokhoz kapcsolódnak. Ilyenkor a spin-spin kölcsönhatás „hatósugara" a közvetítő elektronok delokalizációja következtében jelentősen megnövekszik. Aromás szénhidrogénekben és származékaiban nem ritka a 4, sőt 5 kötésnyi távolságban megjelenő spin-spin kölcsönhatás (l. III. táblázat). Az aromás protonok közötti kapcsolási állandókra jellemző ezenkívül, hogy értékük gyakorlatilag független a szubsztituensek elektronegativitásától, csupán azok száma okoz kismértékű változást, nagyságukat elsősorban egymáshoz viszonyított (orto, meta vagy para) helyzete szabja meg. Ez a sajátság kiválóan alkalmas aromás rendszerek szubsztituenseinek gyűrűben elfoglalt helyzetének azonosítására.

A korszerű spektrométerek nagy felbontóképessége ($2—5 \cdot 10^{-9}$) és stabilitása lehetővé tette, hogy a háromnál nagyobb számú kémiai kötéssel elválasztott protonok kapcsolási viszonyait (a kapcsolási állandók nagyságát és előjelét) telített vegyületek esetében is tanulmányozni lehessen. Ezek az ún. távolra-ható (long-range) kapcsolások ($J \sim 0{,}2—0{,}6$ Hz) messzemenően specifikusnak bizonyultak és számos értékes térkémiai információt szolgáltatnak.

A magrezonancia spektrumok analízise

Láttuk az eddigiekből, hogy a nagyfelbontású magrezonancia spektrumok a folyadék és gázfázisú anyagok esetében a molekulák elektronszerkezetére, alakjára, a szomszédos vagy közeli magok helyzetére vonatkozó információkat a kémiai eltolódás és a spin-spin kölcsönhatás fellépése miatt vonalak és vonalcsoportok és ezek relatív elhelyezkedése formájában tartalmazzák. E vonalak száma a kölcsönható magok számával rohamosan növekszik (IV. táblázat), és hasonlóan bonyolódik a spektrum alakja is. Várható tehát, hogy egy bizonyos magszám felett a spektrumból minden további nélkül,

IV. táblázat

Mag-spin rendszerek analízisénél szereplő mennyiségek

Spin rendszer jele	A	AB	ABC	ABCD	—	—
Magok száma	1	2	3	4	8	n
A Hamilton-operátor mátrixelemeinek száma	2	6	20	70	12 870	$\sum_{i=0}^{n}\left[\binom{n}{i}\right]^2$
Sajátértékek (energianívók) száma	2	4	8	16	256	2^n
A spektrum vonalak számának felső	1	4	15	56	11 440	$\sum_{i=0}^{n}\binom{n}{i}\binom{i+1}{n}$
és alsó korlátja	1	2	5	10	186	$2^n-\binom{n}{g}$ $g=\frac{n}{2}$ vagy $\frac{n-1}{2}$

Megjegyzés: A mátrixelemek száma az I_z operátorral való felcserélhetőség figyelembevételével csökkent le a feltüntetett értékre. A zérus mátrixelemekkel együtt összesen 2^{2n} mátrixelem lenne. Az átmenetek alsó határa a maximális szimmetria esetére vonatkozik, pl. A_n rendszernél.

ránézéssel, nem tudjuk megmondani a spektrális paraméterek értékét. Mint a táblázatból kitűnik, ez a határ már három kölcsönható magnál előfordulhat, ezért fel kell vetnünk azt a kérdést, hogy mi az általános esetben is járható út a magrezonancia spektrumok értelmezésére, azaz hogyan kaphatjuk vissza a spektrumban elrejtett információ lehető nagy részét a bonyolult vonalseregből? Még általánosabb kérdés lehetne az is, hogy egyáltalán lehet-e egyértelműen értelmezni minden magrezonancia spektrumot a molekuláris paraméterek (pontosabban az azoktól függő kémiai eltolódások és spin-spin kölcsönhatási állandók) szempontjából? Az utóbbi kérdésre vonatkozóan már elöljáróban egy nehézségre kell rámutatnunk, arra, hogy a vonalak véges szélessége következtében, ha a spektrum adott tartományában a vonalszám

egy bizonyos határ fölé szaporodik, a vonalak szükségképpen el kell veszítsék különálló jellegüket, át fogják egymást lapolni és sávokká olvadnak össze. Ilyen eseteket — amelyek különösen nagyobb molekulák protonspektrumában fordulnak elő egy-egy kémiai eltolódás tartományban — már eleve ki szeretnénk rekeszteni az alábbi tárgyalásból, mivel itt a kifejtendő módszer alkalmazásának gazdaságossága külön meggondolásokat igényel.

A spektrum analízis legegyszerűbb feladata elméleti úton magrezonancia spektrumok számítása. Ekkor tehát feltételezzük a kémiai eltolódások és kapcsolási állandók ismeretét. Legtöbb esetben az analóg molekulák spektruma és spektrum atlaszok tanulmányozása megkönnyíti jó közelítő értékek felvételét. A számítást az alanti módszerrel elvégezve eredményül a spektrum vonalainak helyét és intenzitását kapjuk: ezeket összehasonlítva a mért spektrummal, ellenőrizhetjük feltevéseink helyességét, és sok esetben magunk is jó irányban módosíthatjuk a felvett paraméterek értékét. Ha a számított és mért spektrum eléggé hasonló, azaz egyes vonalak már megfeleltethetők, csak helyük vagy intenzitásuk nem egyezik, akkor a paraméterek finomítása automatizálható (számítógéppel, a legkisebb négyzetek elvén), azonban most erre nem kívánunk kitérni. Sok esetben ugyanis több különböző, szisztematikusan változtatott paraméter csoportból számítható spektrum összehasonlítása a mért spektrummal már eredményre vezet. Tipikus spin-rendszerek spektrumait a paraméterek széles skáláját felölelve WYBERG és NIST táblázatolta [8].

A számítás menete

A kvantummechanika illetékes a mag-spin-rendszerek viszonyainak leírására. A magmágneses rezonancia kísérlet energiaviszonyait Hamilton-operátorral kell jellemeznünk. A kísérletek eddig minden esetben igazolták a következő Hamilton-operátor alkalmazhatóságát:

$$-\frac{1}{\hbar}H = \sum_i \gamma_i(1-\sigma_i)\,\mathbf{H}_0\cdot\mathbf{I}_i + \sum_{i<j}\sum J_{ij}\mathbf{I}_i\cdot\mathbf{I}_j =$$

$$= \sum_i \nu_i m_i + \sum_{i<j}\sum J_{ij}\mathbf{I}_i\cdot\mathbf{I}_j$$

ahol az első összeg az összes mag kémiai eltolódásának figyelembevételével a Zeeman-nívók energiáját írja le az elméleti részben tárgyalt jelölések felhasználásával, míg a kettős összeg a spin-spin kölcsönhatást jellemzi a kapcsolási állandók és az egyes magok impulzusmomentum-vektoraival kifejezve, amint ennek lehetőségét a spin-spin kölcsönhatásnál már láttuk. Az egyenlőség második felében bevezettük a ν_i frekvenciákat

$$\nu_i = \gamma_i\,(1-\sigma_i)\,|\,\mathbf{H}_0\,|$$

és az $\mathbf{I}_i$ spinvektornak a z irányban ható stacionér mágneses térre való m_i vetületét, melyeket alkalmas egység választással Hz-ben mérünk (hasonlóan J_{ij}-t is).

A magspinrendszer energianívóit a Schrödinger-egyenlet

$$H\psi_k = E_k \psi_k$$

megoldásával kaphatjuk. A ψ_k hullámfüggvények is ismeretlenek, azonban a problémát alkalmas u_i ortonormált függvényrendszer bevezetésével mátrixreprezentációban tárgyalva, sajátértékprobléma megoldásával kiszámíthatjuk őket az E_i sajátértékekkel együtt. Fejtsük tehát sorba ψ-t

$$\psi_k = \sum_m u_m a_{mk}$$

ahol

$$\sum_m a^*_{mk} a_{mk} = 1$$

és helyettesítsük ezt be a fenti Schrödinger-egyenletbe, majd szorozzuk be u^*_n-gal és integráljuk. Eredményül kapjuk:

$$\sum_m (H_{nm} - E_k \delta_{nm}) a_{mk} = 0 \qquad (6)$$

ahol a H_{nm} mátrix elem definíciója és Dirac-féle jelölése

$$H_{nm} = S\, u^*_n H u_m \equiv < u_n \mid H \mid u_m >$$

valamint megállapodás szerint fennáll:

$$u^*_n u_m = < u_n \mid u_m > = \delta_{nm} = \begin{cases} 1 & \text{ha} \quad n = m \\ 0 & \text{ha} \quad n \neq m \end{cases}$$

Az alkalmazott integrál jelhez hasonló S szimbólum a spinváltozókra szummálást, egyébként integrálást jelent. Ez utóbbira azonban most nem lesz szükség.

A H_{nm} mátrixelemeket az u_i függvényrendszer és a Hamilton-operátorban szereplő paraméterek konkrét ismeretében könnyen kiszámíthatjuk, erre példát fogunk kidolgozni, mindenek előtt azonban a (6) egyenlet tartalmát beszéljük meg. Tulajdonképpen n minden értékére egy-egy ilyen egyenlet érvényes, azaz homogén lineáris egyenletrendszerrel állunk szemben az ismeretlen a_{mk} együtthatókra vonatkozóan. Megoldhatóságának szükséges és elégséges feltétele, ha a determinánsa zérus:

$$\begin{vmatrix} H_{11}-E & H_{12} & H_{13} & \dots & H_{1N} \\ H_{12} & H_{22}-E & H_{23} & \dots & H_{2N} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots \\ H_{N1} & H_{N2} & H_{N3} & \dots & H_{NN}-E \end{vmatrix} = 0$$

A determinánst kifejtve, az E_k paraméterekre vonatkozó algebrai egyenlethez jutunk (N-ed rendű), melynek N megoldása a spin-rendszer energianívóit szolgáltatja, ezek a probléma sajátértékei. (Mivel a H_{nm} mátrixelemek által alkotott mátrix — könnyen belátható módon — szimmetrikus, matematikai tételek garantálják, hogy csak valós sajátértékeket kaphatunk.)

A transzformációs együtthatók, a_{mk} értékei a (6) egyenletrendszerből határozhatók meg a sajátértékek behelyettesítése után, így tehát minden sajátértékhez egy a_{mk} együttható vektort kapunk, melyek a felhasznált sorfejtés által megadják a ψ_k sajátfüggvényeket.

A bázisfüggvények megválasztása

A számításhoz felhasznált u_i ortonormált függvények alkalmas megválasztásával sokban egyszerűsödhet a H_{nm} mátrix, így például ha már előre ismernénk az igazi ψ_k sajátfüggvényeket, akkor H_{nm} diagonális mátrix lenne, ahol a diagonálisban éppen a sajátértékek szerepelnének:

$$\begin{vmatrix} H_{11}-E & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & H_{22}-E & \cdots & \vdots \\ \vdots & \vdots & & \\ 0 & 0 & \cdots & H_{NN}-E \end{vmatrix}$$

A számítást azonban már az is nagyon leegyszerűsíti, ha H_{nm} blokkdiagonális alakú, azaz mindenütt zérust tartalmaz, kivéve a diagonális mentén elhelyezkedő kisebb-nagyobb nem zérus elemű mátrixokat. A probléma ilyenkor szétesik ezen kisebb mátrixok megoldására. Az egyes magok $\mathbf{I}_i$ spinvektorának z komponense, I_{zi} szintén operátor. A teljes spin rendszerre vett összegük

$$I_z = \sum_i I_{zi}$$

az egész rendszer eredő momentumának z komponensét jellemzi, és a mérési elrendezés axiális szimmetriája miatt felcserélhető Hamilton-operátorunkkal. Emiatt mindig lehet olyan u_i bázisfüggvényrendszert találni, amely blokkdiagonális alakú H_{nm} mátrixot eredményez. E függvényrendszerek közül legegyszerűbb az N tényezős ún. bázis-szorzat függvényrendszer

$$u_i = \varphi_1 \varphi_2 \dots \varphi_N$$

melyben az egyes tényezők az egyedi I_{zi} operátorok sajátfüggvényei m_i sajátértékkel

$$I_{zi}\,\varphi_i = m_i\,\varphi_i$$

u_i ezen választása mellett mindazon H_{nm} elemek, melyek I_z különböző sajátértékeihez tartozó függvényekkel vannak definiálva, biztosan zérusok lesznek.

A bázis-szorzat függvényrendszer további előnye, hogy a H_{nm} mátrixelemek kiszámítására zárt formulát lehet megadni, nevezetesen a diagonális elemek értéke, ha az összes mag $^1/_2$ impulzusmomentummal bír:

$$H_{kk} = \langle u_k \,|\, H \,|\, u_k \rangle = \sum_i m_i \nu_i + \sum_{i<j} \sum J_{ij}\, m_i m_j$$

A nem diagonális elemekre kapjuk:

$$H_{kt} = \langle u_k \,|\, H \,|\, u_t \rangle = \frac{1}{2} J_{ij}\, U_{kt}$$

ahol U_{kt} értéke általában zérus, kivéve, ha az u_k és u_t bázisszorzatfüggvények az i-edik és j-edik tényezőjüktől eltekintve azonosak, ezekben pedig φ_i és φ_j sajátértéke páronként ellentétes. Világítsa ezt meg egy négytényezős példa. $I_{zi} + {}^1/_2$ sajátértékéhez tartozó sajátfüggvényét jelöljük α-val, a $-{}^1/_2$-hez tartozót β-val. Az $u_k = \alpha\alpha\alpha\beta$ és $u_t = \alpha\alpha\beta\alpha$ bázisszorzatfüggvények mátrixelemei ekkor:

$$\langle \alpha\alpha\alpha\beta \,|\, H \,|\, \alpha\alpha\alpha\beta \rangle = \frac{1}{2}\left[(\nu_1 + \nu_2 + \nu_3 - \nu_4) + \frac{1}{2}(J_{12}+J_{13}-J_{14}+J_{23}-J_{24}-J_{34})\right]$$

$$\langle \alpha\alpha\beta\alpha \,|\, H \,|\, \alpha\alpha\beta\alpha \rangle = \frac{1}{2}\left[(\nu_1 + \nu_2 - \nu_3 + \nu_4) + \frac{1}{2}(J_{12}-J_{13}+J_{14}-J_{23}+J_{24}-J_{34})\right]$$

$$\langle \alpha\alpha\alpha\beta \,|\, H \,|\, \alpha\alpha\beta\alpha \rangle = \langle \alpha\alpha\beta\alpha \,|\, H \,|\, \alpha\alpha\alpha\beta \rangle = \frac{1}{2} J_{34}$$

Feles spinű részecskék esetén a H_{nm} mátrix $N + 1$ kisebb mátrixot tartalmaz blokkdiagonális alakjában.

Ha a molekula valamilyen szimmetriával is rendelkezik, úgy a bázisszorzat függvények lineáris kombinációit képezve mindig elérhető a probléma további egyszerűsödése. Az alkalmas lineáris kombinációkat szisztematikusan a *csoport elmélet* felhasználásával találhatjuk meg.

Feles spinű részecskéknél a H_{nm} mátrix sorainak száma 2^N, a sajátértékfeladat méretéről az IV. táblázat ad számot.

Az intenzitások számítása

A mag spin-rendszer energianívói között a perturbáló H_1 amplitúdójú és ω frekvenciájú rádiófrekvenciás tér átmeneteket indukálhat, ha a rezonancia feltétel teljesül:

$$\pm \omega = (E_i - E_j)/\hbar$$

A perturbáló operátor

$$H' = -\hbar H_1 \cos \omega t \sum_j \gamma (I_{xj} \pm i I_{yj})$$

mellyel eddigi Hamilton-operátorunkat ki kell egészítenünk a tér bekapcsolása miatt, az egyes magok impulzusmomentum vektorainak x és y irányú I_x ill. I_y komponenseiből és a giromágneses faktorból épül fel.

A p és q-adik sajátfüggvénnyel jellemezhető spin-rendszer-állapotok közötti $p \to q$ átmenet valószínűsége a perturbáló operátor mátrix-elemének négyzetével számítható:

$$T_{p \to q} = |\langle \psi_q | H' | \psi_p \rangle|^2 \sim H_1^2$$

Megmutatható, hogy átmenetek mérsékelt H_1 amplitúdó esetén csupán a szomszédos I_z operátor kvantumszámmal jellemezhető nívók között jöhetnek létre (ez a dipólus sugárzás kiválasztási szabálya), továbbá az átmenetek integrált intenzitása arányos az átmenetben résztvevő protonok számával.

A spin-rendszer esetleges szimmetriája további, a gyakorlatban előnyösen kiaknázható kiválasztási szabályokhoz vezet.

Redukálható problémák. Definíciók

A fent vázolt, általánosan járható számítás az alábbi esetekben lényegesen megrövidül.

Kémiai csoportok:

1. Azonos kémiai eltolódású magokat *kémiailag ekvivalens*eknek nevezünk. A kémiai eltolódások azonosságának nem kell feltétlenül molekuláris szimmetria következményeként előállni. A kémiai ekvivalencia esetében a magok spin-spin kapcsolási állandói az egyes kémiailag ekvivalens csoportok között különbözőek, így pl. az 1,1-difluoretilén esetében a protonok és fluor magok két kémiailag ekvivalens csoportot alkotnak, azonban a cis és trans kapcsolási állandók különbözőek.

2. Ha e kapcsolási állandók azonosak, akár szimmetria, akár belső molekuláris mozgás kiátlagoló hatása miatt, akkor további nevezetes esettel, a *mágneses ekvivalenciával* állunk szemben. Így például a propán molekulában két mágnesesen ekvivalens csoport van, hat és két protont tartalmaznak.

A mágneses ekvivalencia esetén az egy csoportba tartozó magok közötti spin-spin csatolási állandók nem befolyásolják az átmenetek intenzitását és a vonalak számát vagy helyét.

Ha minden mag egy csoportba esik, azaz minden mágneses mag eltolódása azonos (pl. benzol, tetrametilszilán, metán), úgy csupán egyetlenegy vonalból fog állni a spektrum.

Fizikai vagy bázis-csoportok:

Ha a spin-rendszer két csoportjára teljesül az a követelmény, hogy a bennük szereplő magok közötti spin-spin kapcsolások kicsinyek a kémiai eltolódások különbségeihez képest:

$$\frac{1}{2\pi}\left|\frac{J_{ij}}{\nu_i - \nu_j}\right| \ll 1$$

ahol i az egyik, j a másik bázis csoportba tartozó magot jelöl, akkor a spektrum megfelelő vonalai is jól elhatárolható két csoportba oszthatóak lesznek. Ha ezen túlmenően még a mágneses ekvivalencia is fennáll (pl. etilalkohol), úgy a vonalak számát a másik csoport magjainak száma plusz egy adja meg, míg intenzitásuk a binomiális eloszlást követi.

A spektrumok osztályozása

Szokás a magrezonancia spektrumokat a fenti fogalmak és a magspin rendszer tömör jelölése alapján osztályozni. Ez megkönnyíti munkánkat, ugyanis ha már eldöntöttük a spektrum típusát, a jellegzetes rész-spektrumok legtöbbjét kézikönyvekben megtalálhatjuk, és így a spektrum értelmezését esetleg a hosszadalmas számítás helyett a számos részletesen analizált eset valamelyikével való összehasonlítás alapján elvégezhetjük.

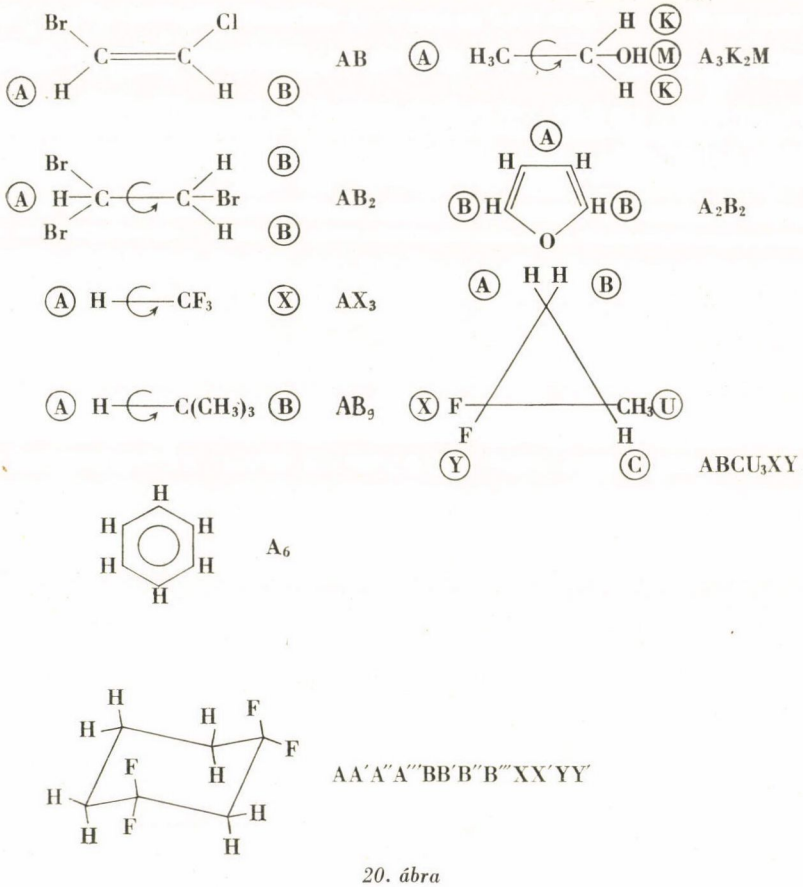
A jelölésben minden mágneses magot az ABC valamilyen betűjével jelöljük. A különböző bázis csoportokat az ABC távol álló betűivel, az egyes bázis csoporton belüli magokat a szomszédos betűk felhasználásával különböztetjük meg. Mágneses ekvivalenciát újabb betű felhasználása nélkül, az alsó indexben számmal fejezünk ki, míg kémiai ekvivalencia esetén ugyanazt a betűt használjuk a felső indexben vesszőkkel megkülönböztetve. Az alábbi példák szolgáljanak illusztrációul (20. ábra):

Az AB spin-rendszer egzakt számítása

Bázis függvényül a négy kéttényezős bázisszorzatfüggvényt választjuk:

$$u_1 = \alpha\alpha \qquad u_3 = \beta\alpha$$

$$u_2 = \alpha\beta \qquad u_4 = \beta\beta$$



20. ábra

H mátrixának nem zérus elemei ekkor:

$$H_{11} = \nu_A + \nu_B + \frac{1}{2}J, \qquad H_{33} = \nu_A - \nu_B + \frac{1}{2}J$$

$$H_{22} = \nu_A - \nu_B - \frac{1}{2}J, \qquad H_{44} = \nu_A + \nu_B + \frac{1}{2}J$$

$$H_{23} = H_{32} = -\frac{1}{2}J$$

Tehát a sajátértékprobléma két elsőrendű és egy másodrendű blokk előfordulása miatt nagyon leegyszerűsödik. A sajátértékek:

$$E_1 = \nu_A + \nu_B + \frac{1}{2}J \qquad E_3 = \sqrt{(\nu_A - \nu_B)^2 + J^2} + \frac{1}{2}J$$

$$E_2 = \sqrt{(\nu_A - \nu_B)^2 + J^2} - \frac{1}{2}J \qquad E_4 = \nu_A + \nu_B - \frac{1}{2}J$$

Az a_{jk} együtthatókat szolgáltató lineáris egyenletrendszer:

$$\left.\begin{aligned} (H_{11} - E_k)\, a_{1k} &= 0 \\ (H_{22} - E_k)\, a_{2k} - H_{23}\, a_{3k} &= 0 \\ (H_{33} - E_k)\, a_{3k} - H_{32}\, a_{2k} &= 0 \\ (H_{44} - E_k)\, a_{4k} &= 0 \end{aligned}\right\} \quad k = 1, 2, 3, 4$$

melynek megoldása

$$\begin{aligned} a_{11} &\neq 0 \\ a_{23} &= -Q \cdot a_{33} \qquad a_{33} \neq 0 \\ a_{32} &= Q \cdot a_{22} \qquad a_{22} \neq 0 \\ a_{44} &\neq 0 \end{aligned}$$

ahol a többi a_{jk} értéke zérus és $Q = J/(\nu_A - \nu_B + \sqrt{(\nu_A - \nu_B)^2 + J^2})$. A normalizált sajátfüggvények:

$$\begin{aligned} \psi_1 &= u_1 \\ \psi_2 &= (u_2 + Qu_3)/\sqrt{1 + Q^2} \\ \psi_3 &= (u_3 - Qu_2)/\sqrt{1 + Q^2} \\ \psi_4 &= u_4 \end{aligned}$$

A relatív intenzitásokat az I^- operátor mátrixelemeinek négyzetével számolva kapjuk:

$$\begin{aligned} T_{2\to 4} = T_{1\to 2} &= (1 + Q)^2/(1 + Q^2) \\ T_{3\to 4} = T_{1\to 3} &= (1 - Q)^2/(1 + Q^2) \end{aligned}$$

Eredményeinket a megelőző fejezetben szereplő 18. ábra tünteti fel. Megfigyelhetjük, hogy a spektrum alakja csupán a J/δ hányadostól függ. Ez az eredmény általánosítható minden AB_n típusú spektrumra is.

Az ABX rendszer analízise

A részletes számítások eredményeit felhasználva a spektrális paraméterek meghatározását mutatjuk be.

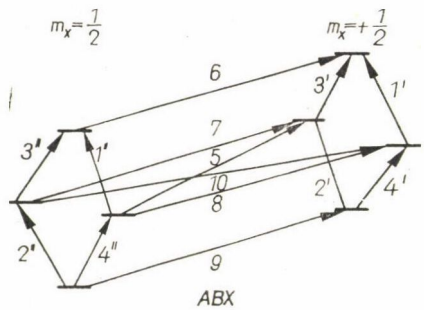
A számított formulák bonyolultabbak, mint az előző esetben, a Hamilton-mátrix azonban most sem tartalmaz másodrendűnél nagyobb részmátrixot (*ABC* esetben már két harmadrendű problémát tartalmazna, amely a sajátértékeket harmadfokú egyenlet megoldása után szolgáltatja).

Az ABX spektrumot jellemzi, hogy érzékeny a spin-spin csatolási állandók relatív előjelére, a számított és mért spektrumoknál már hozzárendelési problémák adódhatnak, továbbá, hogy az X mag két állapotának megfelelően két AB problémára vezethető vissza, amint azt a 21. ábrán az energia nívó diagram feltünteti (a nyilak a megengedett átmeneteket mutatják):

A két AB rendszer között éppen az X mag átmenetei teremtenek kapcsolatot. A spektrumvonalak frekvenciáit a két AB rendszer esetében effektív Larmor-frekvenciák helyettesítik (szemben a tiszta AB esettel):

$$\nu'_A = \nu_A + \frac{1}{2} J_{AX}; \qquad \nu'_B = \nu_B + \frac{1}{2} J_{BX}$$

$$\nu''_B = \nu_A - \frac{1}{2} J_{AX}; \qquad \nu''_B = \nu_B - \frac{1}{2} J_{BX}$$



21. ábra

Az ABX spektrum további jellemzője, hogy minden spektrális paraméter közvetlenül leolvasható a spektrum vonalak (ezek mért értékeit f_i-vel jelöljük) távolságából. Így például J_{AB} abszolút értéke több helyen is előfordul (ez jó kontroll a hozzárendelésre)

$$|J_{AB}| = f'_1 - f'_2 = f'_3 - f'_4 = f''_1 - f''_2 = f''_3 - f''_4$$

Az X átmenetekből az X-hez kapcsolt J-k határozhatók meg:

$$J_{AX} + J_{BX} = f_6 - f_9$$

$$J_{AX} - J_{BX} = (f_5 - f_{10})\ (f_7 - f_8)/2\ (\nu_A - \nu_B)$$

Ezek értéke azonban az AB átmeneteket is befolyásolja, az AB paraméterekkel együtt pusztán az AB átmenetekből is számítható lett volna:

$$\nu_A - \nu_B = \frac{1}{2}(D' + D'')$$

$$J_{AX} = f'_0 - f''_0 + \frac{1}{2}(D' - D'')$$

$$J_{BX} = f'_0 - f''_0 - \frac{1}{2}(D' - D'')$$

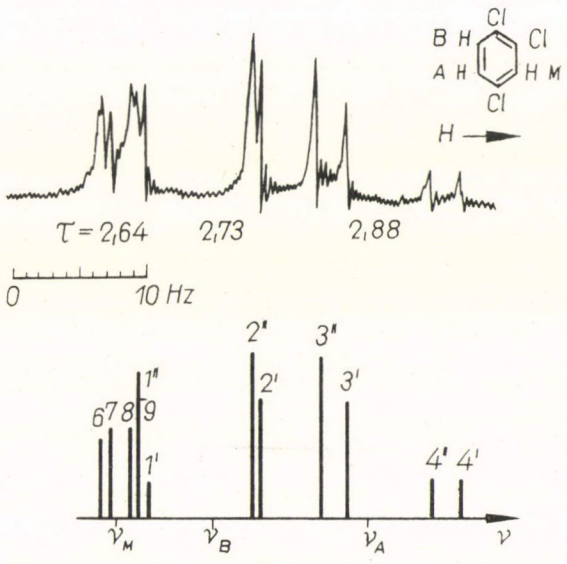
ahol:

$$D' = \nu'_A - \nu'_B = \sqrt{(f'_1 - f'_4)\ (f'_2 - f'_3)}$$

$$D'' = \nu''_A - \nu''_B = \sqrt{(f''_1 - f''_4)\ (f''_2 - f''_3)}$$

$$f'_0 = \frac{1}{2}(\nu'_A + \nu'_B) = \frac{1}{2}(f'_1 + f'_4) = \frac{1}{2}(f'_2 + f'_3)$$

$$f''_0 = \frac{1}{2}(\nu''_A + \nu''_B) = \frac{1}{2}(f''_1 + f''_4) = \frac{1}{2}(f''_2 + f''_3)$$



22. ábra

Egy tipikus *ABM* spektrumot mutat ideálisan vékony vonalakkal ábrázolva a következő ábra (1,2,4-triklórbenzol spektruma 60 MHz-en) (22. ábra).

A spektrumot jól közelíthetjük az *ABX* rendszer spektrumával. Az ábrán feltüntetett számok jelzik a megelőző oldal energianívódiagramjához történő asszignációt. A kapott paraméterek:

$J_{AM} = 2{,}2$ Hz $\quad J_{BM} = 0{,}5$ Hz $\quad J_{AB} = 8{,}2$ Hz

$\nu_A - \nu_M = 18{,}5$ Hz; $\quad \nu_B - \nu_M = 7{,}1$ Hz; $\quad \nu_B - \nu_A = -11{,}4$ Hz.

igen jól egyeznek az exakt *ABM* számítással nyerhető értékekkel.

A magrezonancia spektroszkópia spektrális paramétereinek bemutatása és az analízis módszereinek fenti illusztrációja után a következőkben az alkalmazásokat tárgyaljuk. Ezt megelőzően ismerkedjünk meg egy nagyfelbontású spektrométer felépítésével és jellemzőivel.

A nagyfelbontású magrezonancia spektrométer

Az 1950-es évek alapvető kísérleteitől napjainkig az NMR spektrométerek rohamos fejlődését tapasztaljuk: a 3—4 évenként piacra kerülő új típusok olyan követelményeket teljesítenek a stabilitás, felbontás és az egyre növekvő mágneses tér szempontjából, melyek pár éve még alig voltak remélhetőek, és amelyeket egy-egy NMR készülékek építésére specializált cég sokéves tapasztalata, a legjobb erőket foglalkoztató fejlesztő gárdája és a legújabb szabályozástechnikai, rádiótechnikai és digitalizált módszerek, valamint nagyhomogenitású mágneskonstrukciós elvek együttes alkalmazása tett lehetővé. A spektrumok kiértékelését nagysebességű számológépek végezhetik, a korrelációs analízis és sokcsatornás tároló használata pedig egyre kisebb koncentrációjú minták vizsgálatát teszik lehetővé, olyanokét is, melyek jelét már a készülék zajszintje fedné, ha közvetlenül rögzítenénk.

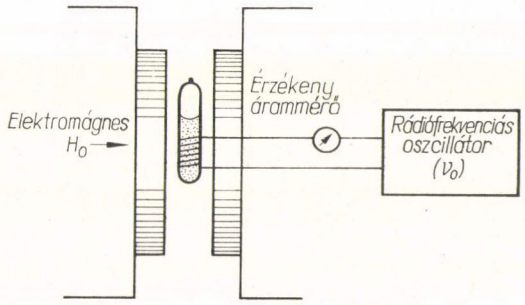
Az alábbiakban a mérési elv bemutatása után egy korszerű (1965 típusú) protonspektrométer felépítését és működését ismertetjük a felhasználó szempontjából.

A mérés elve

A $\mathbf{H}_0$ mágneses teret létrehozó mágnes, a $\mathbf{H}_1$ rádiófrekvenciás teret keltő tekercs és a mérendő minta elhelyezését a 23. ábrán tüntettük fel. $\mathbf{H}_1$ merőleges $\mathbf{H}_0$ irányára és párhuzamos a mintatartó cső tengelyével.

A magrezonancia abszorbció a *Larmor-egyenlet* által megszabott frekvencia közelében észlelhető, mert a szabad magok rezonancia-feltételét a kémiai eltolódások kevéssé módosítják csak. A rezonancia abszorpció folyamatában elnyelt energiát a rádiófrekvenciás tér szolgáltatja, így a rezonancia bekövetkezését legegyszerűbben egy *transzmissziós* kísérlettel észlelhetjük: ezen elrendezésnél — az optikai spektroszkópia nyelvén szólva — átvilágítjuk a mérendő mintát, és az áthaladó energia gyengülése jelzi az abszorpció fellépését és mértékét. Jelen esetben a konstans feszültségű rádiófrekvenciás generátor által szolgáltatott feszültség kelti a H_1 besugárzó teret a tekercs

tengelye mentén. Abszorpció esetén e tér gyengülését észlelhetjük. A gyakorlatban erre különböző kompenzációs módszerek (pl. kettős *T*-híd) szolgálnak, melyek rezonancia esetén, érzékeny szupervevő felé szolgáltatnak a rezonancia abszorpció erősségével arányos rádiófrekvenciás jelet.



23. ábra

A spektrométer felépítése

Minden NMR spektrométer két fő része: a mágnes-rendszer és a mérőelektronika.

a) *A mágnes-rendszer* részei:

1. a térbelileg nagyon homogén és időben igen stabilis állandó mágneses teret létrehozó mágnes. Lehet elektromágnes (régebben szinte kizárólag) vagy permanens mágnes. Utóbbit a protonstabilizálás által megkívánt állandó tér miatt, valamint kisebb hely és energiaigénye következtében előnyben részesítik.

2. Mágnes tápegység (elektromágnes esetén), amely az elektromágnes stabilis, változtatható, de szabályozott áramát biztosítja.

3. A mágneses tér inhomogenitásait kompenzáló tekercs rendszer (ún. shim-tekercsek) és tápfeszültségforrásaik.

4. Fluxus-stabilizátor. A mágnespofákon elhelyezett vevő-tekercseiben indukált feszültség révén érzékeli a tér esetleges változásait, az ugyanott elhelyezett adó-tekercseivel pedig — kellő visszacsatolás révén — kikompenzálja őket. Segítségével garantálni lehet, hogy a tér-változás mértéke adott idő alatt nem lépi túl a megengedett határokat (ami a relatív térváltozásban a 10^{-9}/óra nagyságrendben kell legyen). Mesterségesen alkalmazott hibajel hatására a fluxus stabilizátorral a tér lineáris, lassú változtatása érhető el — a véletlen zavarok kikompenzálása mellett —, ez az ún. mágneses-tér sweep: a spektrumok felvételének egyik módja. Világos ui., hogy a Larmor-egyenlet akár a frekvencia változtatásával teljesíthető (rögzített mágneses tér esetén), akár fordítva, a tér változtatásával (ha a frekvencia értéke marad állandó).

b) *A mérőelektronika* egységei:

1. a rádiófrekvenciás generátor. Feszültségéből attenuátor segítségével osztjuk le a jelet a szükséges H_1 tér keltéséhez, továbbá innét tápláljuk a rádiófrekvenciás fázisdetektort is, amely a szupervevő kimenetéhez csatlakozik (lásd 24. ábrát). Ha protonon kívül más mag rezonanciáját is akarjuk mérni, akkor a rádiófrekvenciás egységet is cserélni kell a konstans (protonnak megfelelő) mágneses térhez tartozó eltérő rezonancia frekvencia (l. Függelék I. táblázat) miatt.

2. Mérőfej, amely a mintát és a rezonancia keltéséhez szükséges H_1 teret létrehozó tekercset, valamint moduláló tekercseket tartalmaz. A minta közelében helyezik el sokszor a shim-tekercsrendszert is. A minta felfogása kis légturbinával történik, utóbbira a minta mechanikus forgatása miatt van szükség (mintegy 10—30 Hz-el), ami a shim-tekercsek korrigáló hatása után is megmaradt kis inhomogenitásokat átlagolja ki a forgás síkjában. Ez az átlag ugyan nem egzaktul zérus, de mintegy másfél nagyságrend javulást eredményez. A forgás következménye a spektrumban kis (1—2%-nyi) oldalsávok fellépése a megfigyelt vonal mindkét oldalán, a forgási frekvencia értékével megegyező távolságban: ez mechanikus moduláció következménye, a forgás ugyanis a mintatartó cső precíz megmunkálása mellett is visszahat a rádiófrekvenciás térre. A rádiófrekvenciás tekercshez és így a mintatartóhoz is lehető legközelebb helyezik el az

3. előerősítőt. Ez a fokozat határozza meg az elektronikus jel/zaj viszonyt, másrészt kábelre adja a távolabb elhelyezett kezelőasztal felé a magrezonanciás jelet.

4. Szuperrendszerű vevő, kimenetén fázisdetektorral (középfrekvenciás). Szimmetrikus kétcsatornás egység, a magrezonancia jel és a referens jel részére. Utóbbi fázisa és az első csatorna erősítése szabályozható a mérés folyamán.

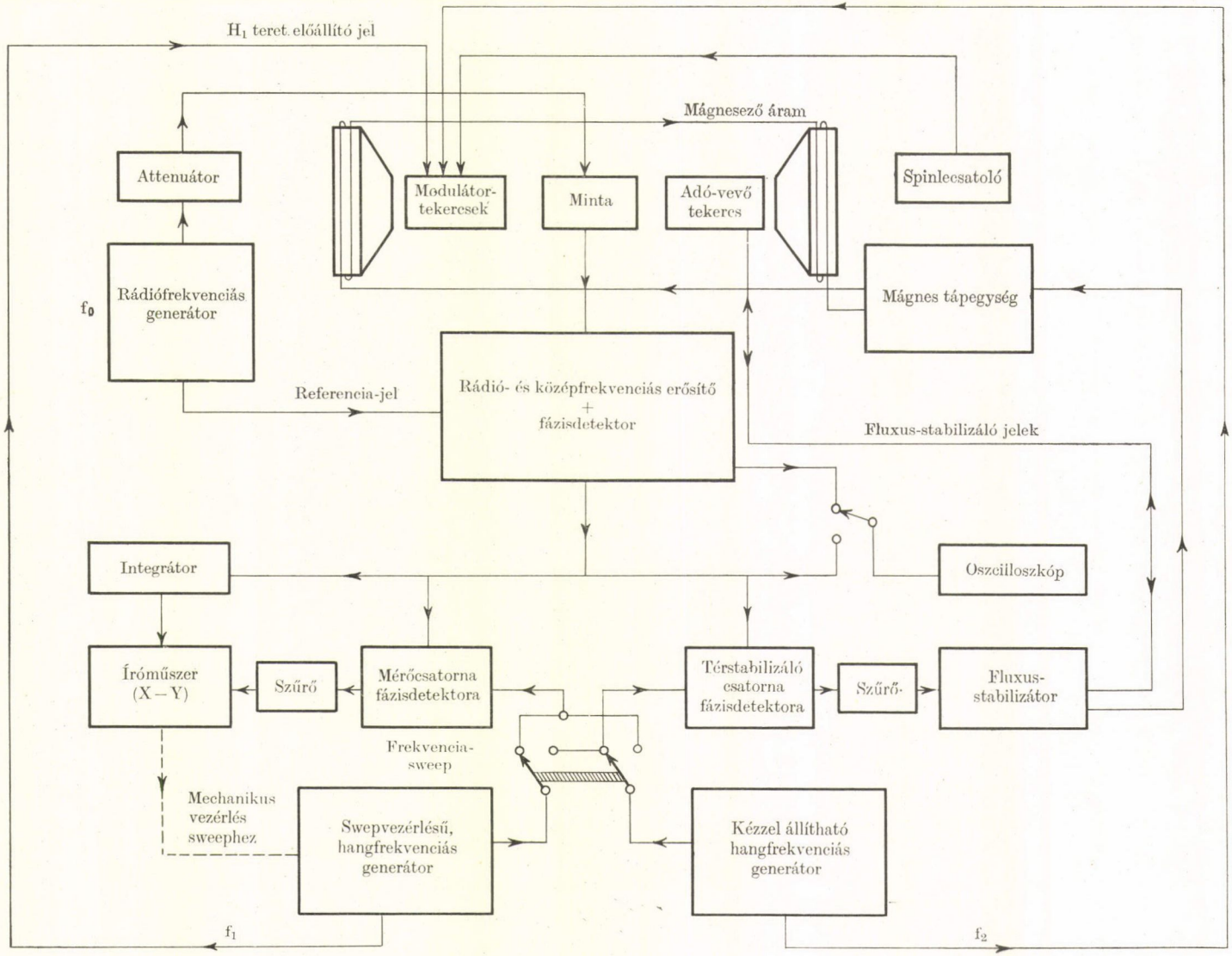
5. Hangfrekvenciás generátorok az f_0 rádiófrekvencia modulálására, a hangfrekvenciás fázisdetektorok táplálására, változtatható amplitúdóval és fázissal.

6. Íróműszer a spektrumok rögzítésére (általában $X-Y$ típusú, lapos, asztalba épített kivitel), amely x irányú elmozdulásával arányosan, vezérelni képes az egyik hangfrekvenciás generátor frekvenciáját. Így időben lineárisan változó hangfrekvencia áll elő (jellemző tartomány: 2500—4000 Hz).

7. Integrátor: elektronikus elven működve az íróműszeren felrajzolható jelet szolgáltat, amely a spektrumvonalak alatti terület integrálfüggvénye.

8. Oszcilloszkóp a magrezonanciás jel megfigyelésére a spektrometria felvétel előtti, beállítási szakaszához.

9. Digitális frekvenciamérő a hangfrekvenciás generátorok pontos mérésére. Rendszerint feszültségmérővel van összekötve és átkapcsolható a szabályzó jel amplitúdójának mérésére.



Protonstabilizált nagyfelbontású NMR spektrométer blokkdiagramja

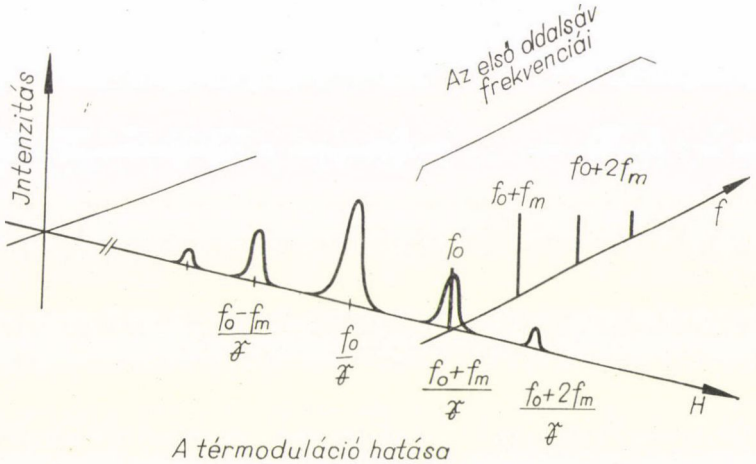
24. ábra

10. Spin-lecsatoláshoz szolgáló külön frekvenciaforrás.

Az egységek fenti felsorolása közben nem érintettük a spektrométer nagyfokú stabilitását és a spektrumok előrekalibrált papírra való felvételének lehetőségét biztosító legfontosabb rendszertechnikai megoldást: a spektrométer miközben spektrumfelvételre használjuk, maga is egy másik magrezonanciás folyamat által stabilizálva van.

A protonstabilizáció

Régebbi készülékeknél nagy gond volt a Larmor-egyenletben szereplő f_0 rezonancia frekvencia és a hozzátartozó H_0 mágneses tér stabilitásának megoldása. Külön-külön stabilizálták őket, azonban technikailag nem sikerült



25. ábra

a 10^{-8} értékeknél jobbat megvalósítani hosszabb időre vonatkoztatva. Ugyanakkor a spektrum vonalakat is külön-külön kellett kalibrálni az ***oldalsávtechnika*** segítségével. A rádiófrekvenciás tér amplitúdóját vagy a H_0 mágneses teret f_1 hangfrekvenciával modulálva azt tapasztaljuk, hogy egyetlen magrezonanciás vonal helyett, annak közvetlen környezetében, f_1 távolságra egymástól, több, bizonyos törvények szerint változó amplitúdójú, mellék rezonancia jeleket is mérhetünk, akár a mágneses tér változtatásával, akár a frekvencia változtatásával vesszük is fel a spektrumot. Sőt, egy adott oldalsávnál a mérőfej jele nemcsak az f_0 frekvenciát tartalmazza (amit mi tápláltunk bele), hanem ennek az oldalsávjait is $f_0 + n \cdot f_1$ értékeknél (ahol n egész szám). Távoli oldalsávok egyre kisebbek lesznek, kis modulációs amplitúdó esetén gyakorlatilag elég az első oldalsávokat figyelembe venni. Az első oldalsáv helyén mérhető frekvenciákat tünteti fel a 25. ábra. A különböző

n-hez tartozó frekvenciakomponenseket a rádiófrekvenciás fázisdetektor kimenetén is megfigyelhetjük, szétválogatásukra a hangfrekvenciás fázisdetektorok adnak lehetőséget. Így az f_1 referens frekvenciával táplált fázisdetektor csupán a keverék f_1 frekvenciás komponenseit méri.

Az oldalsávtechnika tehát ismeretlen vonalak távolságának mérését tette lehetővé szándékosan keltett oldalsávoknak a spektrumba való bevitelével: a frekvenciát addig kellett változtatni, míg a kívánt oldalsáv fedésbe nem került a mérendő másik vonallal.

Ugyanezt az elvet használja ki a spektrum felvételére a frekvencia-sweepelés. A mágneses teret konstansul tartjuk, értékét előzőleg úgy állítottuk be, hogy a 2—4 kHz-es oldalsáv tartomány valamely frekvenciájára teljesüljön a Larmor-egyenlet (azaz a rezonanciát az első oldalsáv helyén észlelhetjük). Mármost a hangfrekvencia sweepelésével mindig más-más kémiai eltolódású magok rezonancia feltétele teljesül: az íróműszert az f_1 frekvenciájú fázisdetektorra kötve a teljes spektrumot felrajzolhatjuk. Sőt, ennél több is lehetséges: ha az íróműszerrel vezéreljük az f_1 változását — amint erre fent utaltunk —, akkor adott papírtávolság, adott kémiai eltolódásnak feleltethető meg. Az infraspektrométerekhez hasonlóan, a frekvenciaskálát mindig előre meghatározott léptékkel rögzíthetjük.

Természetesen mindez csak akkor lesz reprodukálható, ha a H_0 és f_0 kapcsolata igen pontosan állandó. Mivel a gyakorlatban mindkettő ingadozik (a stabilizátorok hibáján belül), továbbá a mágneses tér kis egyenáramú eltolódásokat is szenved (drift) a környező hőmérséklet megváltozásával, a fent említett kalibrációnk aligha lenne túl pontos. Szerencsére van mód a H_0 tér és az f_0 rádiófrekvencia változásainak igen pontos összekapcsolására. A protonstabilizáció elve az, hogy egy második, f_2 hangfrekvenciás moduláció által keltett oldalsávon, f_2 fázisdetektorral megfigyelve hozzunk létre a mintába tett valamely éles vonal helyén (pl. alkalmas erre a mindenkori referencia jel) magrezonanciát, és csatoljuk vissza e magrezonanciás jelnek bármely külső zavar által keltett *megváltozását* a H_0 teret szabályozó fluxus stabilizátorra, olyan értelemben, hogy a Larmor-egyenlet mindenkor a lehető legpontosabban teljesüljön. Az f_1 és f_2 frekvenciájú rendszer egyidőben egymástól függetlenül működhet, tehát a spektrométert rástabilizálhatjuk fix f_2 frekvencia mellett a referencia jel helyére, míg az f_1 hangfrekvencia lineáris változtatásával felvehető a spektrum. Ez utóbbi üzemmód a *frekvencia-sweep*. A korábban említett mágnesestér-sweep üzemmód az f_1 és f_2 oszcillátorok cseréjével valósítható meg: az íróműszer most nem az oldalsáv frekvenciát változtatva veszi fel a spektrumot, hanem a mágneses teret változtatja annak következtében, hogy a referens jel rezonanciáját időben lineárisan változó oldalsávra stabilizálja.

Alapvonalstabilizálás és integrálás

A minta magrezonancia jelét f_1 moduláció esetén f_1 hangfrekvenciás detektorral figyelve — amint fent megbeszéltük — járulékos előnyként az alapvonalstabilizálást is kaptuk. A korábbi spektrométerek nem alkalmazták az említett elvet, az f_0 frekvenciás komponenst figyelték meg, aminek hátránya az íróműszerre vezethető jel egyenáramú komponensének instabilitása volt. Ez utóbbi kis koncentrációjú minták esetén volt különösen zavaró, a pontos integrálást pedig lehetetlenné tette. Az oldalsáv rezonancia használatakor megszűnik e jelenség (pontos magyarázata a fázisdetektor egyenleteivel adható meg).

Az alkalmazott hangfrekvenciák értékei, illetve a spektrum-felvételt meghatározó különbségeik a mindenkor tanulmányozni kívánt kémiai eltolódás tartomány szerint választhatók meg. Így például a stabilizáló rendszer f_2 frekvenciáját 4 kHz-re választva, 100 MHz-es f_0 esetén 15 ppm tartomány söpörhető át, ha f_1 2,5—4kHz-ig változik. A hangfrekvenciák amplitúdójára vonatkozóan meg kell jegyeznünk, hogy velük a rádiófrekvenciás tér oldalsávjaiban levő energia változtatható, azaz a rezonanciát létrehozó effektív H_1 teret nem csupán f_0 attenuátorával, hanem a modulációs amplitúdóval is szabályozhatjuk.

A fenti nagyfelbontású alkalmazásoktól eltérően, a *szélessávú technikában* az amplitúdó moduláció előnyösen használható fel széles rezonancia jelek vizsgálatára. A nagyfelbontású méréseknél a moduláló tér amplitúdója sokszorosa a rezonancia vonalak szélességének, a szélessávú technikában fordított a helyzet. Emiatt a modulációs frekvenciával váltakozó magrezonanciás jel komponens értéke a jel mindenkori differenciálhányadosával lesz arányos, a spektrum helyett a deriváltját kapjuk. Nem szükséges a protonstabilizáció használata sem: a fellépő instabilitások a vonalak vastagságához képest kicsinyek. Épp ezért a nagyfelbontású készülékek általában nem alkalmasak minden további nélkül a szélessávú munkára, hanem külön erre a célra készült szélessávú spektrométerekkel dolgoznak (lásd az idevonatkozó fejezetet).

Tipikus készülék specifikációk

Érdemes a fentiekhez kapcsolni az említett követelmények ma könnyen teljesíthető numerikus értékeit. Ezért lejegyezzük egy 100 MHz-es nagyfelbontású protonspektrométer néhány jellemzőjét:

Mágneses tér:	23 490 gauss
Rádiófrekvencia:	100 MHz
amplitúdója:	14 μgauss—50 mgauss
Pólusátmérő:	12 inch, Légrés: 1,5 inch
Felbontóképesség:	$5 \cdot 10^{-9}$—0,5 Hz — 118 μgauss
Stabilitás:	$< 1 \cdot 10^{-9}$/nap

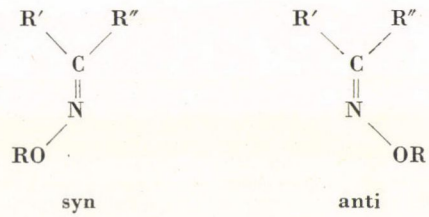
Mintatérfogat:	0,2—0,4 cm^3, 5 mm külső átmérőjű csőben
Érzékenység:	1%-os etilbenzol mintában a kvartett nagyobbik vonala 20-as jel/zaj viszonnyal mérhető
Integrálás pontossága:	1%
Mintahőmérséklet változtatási lehetősége:	—100° — +220°C
Protonstabilizálás:	belső referenciával
Mágnes tápegység:	félvezetőkkel dolgozik
Értéke:	20—60 ezer $

A protonrezonancia spektroszkópia alkalmazása a kémiai szerkezet meghatározására

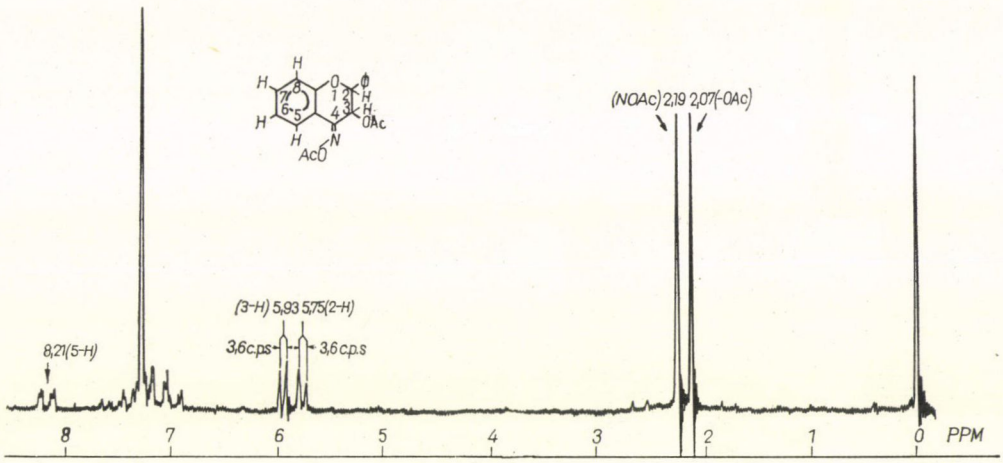
A nagyfelbontású protonrezonancia spektrumok eddig megismert három paramétere, a kémiai eltolódás, integrált intenzitás és a spin-spin kapcsolási állandó, mint láttuk, a következő információt szolgáltatja a vizsgált mintáról: *a)* hány fajta kémiai környezet fordul elő (az eltérő kémiai eltolódások száma alapján), *b)* milyen természetűek ezek (pl. alifás, olefin, aromás stb. protonok, a kémiai eltolódások nagysága szerint), *c)* mekkora az egyes környezethez tartozó protonok relatív száma (az integrált intenzitások aránya alapján) és *d)* milyen az egyes protonok, ill. protoncsoportok egymáshoz viszonyított helyzete, kapcsolata (a spin multipletek vonalszáma és a kapcsolási állandók értékei alapján). Ezek az ismeretek általában alkalmasak a vizsgált minta kémiai szerkezetének felderítésére vagy azonosítására, elegyek összetételének, anyagok tisztaságának meghatározására.

Az alkalmazási lehetőségek közül a protonrezonancia spektroszkópia teljesítőképessége leginkább a szerkezet vizsgálatok területén mutatkozik meg. Ki kell azonban hangsúlyozni, hogy a kémiai eltolódások és kapcsolási állandók viszonylag szűk intervalluma és az értéküket befolyásoló tényezők lehetséges nagy száma miatt, teljesen ismeretlen szerkezetek felderítése csak az egyszerűbb esetekben lehetséges. Éppen ezért a protonrezonancia spektroszkópia nem tekinthető egyedülálló szerkezetmeghatározó módszernek. Hasznossága elsősorban olyankor nyilvánul meg, ha a kémiai meggondolások és egyéb szerkezetvizsgálati módszerek (pl. IR, UV és tömegspektroszkópia) egynél több szerkezeti alternatívára vezetnek. E szerkezeti alternatívák között — ha azok a protonokat eltérő kémiai környezetekben tartalmazzák — a protonrezonancia spektrumok alapján csaknem mindig egyértelműen választani lehet. Jellegzetes egyszerű esetei ennek a különféle izoméria viszonyok, telítetlen kötések és szubsztitúció helyének meghatározása, konformációs problémák eldöntése stb. A következőkben néhány illusztratív példát mutatunk be.

Az oximok és származékaik — mint ismeretes — két izomer formában, ún. *syn* és *anti* módosulatban létezhetnek, amelyek egymástól a C=N kötésre vonatkoztatott konformációikban különböznek:

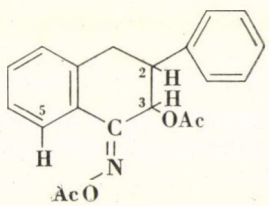


syn anti

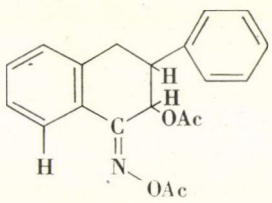


26. ábra

A két módosulat sok esetben szétválasztható kristályosítással, vékonyréteg-kromatográfiával, azonosításuk azonban nem mindig végezhető el fizikai állandóik vagy egyéb spektroszkópiai tulajdonságaik alapján. Az izomerek protonrezonancia spektruma ilyenkor egyszerű hozzárendelési lehetőséget biztosít. A 26. és 27. ábra a 3-acetoxiflavanon-oxim-N-acetát *syn* és *anti* formájának (I., ill. II.) deuterokloroformos oldatban készített spektrumát mutatja. A spektrumok értelmezése a következő:

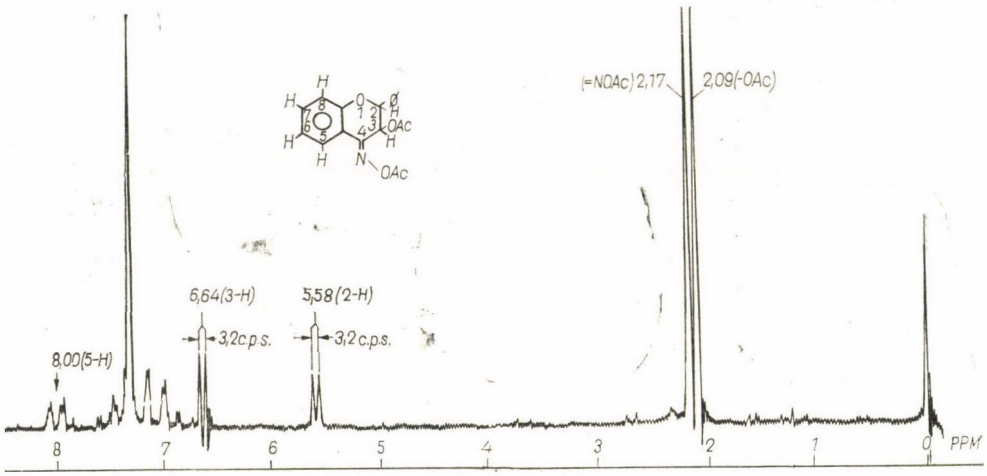


I



II

Az eltolódási skála az oldathoz adott (kb. 1%) tetrametilszilán éles vonalával kezdődik ($\delta_{TMS} = 0$), majd 2 ppm környékén mindkét spektrumban két-két intenzív vonal jelentkezik, amelyek intenzitásuk és kémiai eltolódásuk alapján az O-acetil és N-acetil-metil protonokhoz rendelhetők. (Az O-acetil és N-acetil-metil protonok eltolódásbeli különbsége azzal magyarázható, hogy a karbonil-csoport melletti oxigénatom nagyobb elektronegativitása kismértékben csökkenti a karbonil-csoport elektronszívó, azaz paramágneses eltolódást eredményező hatását, emiatt az O-acetil-metil protonok viszonylag nagyobb mágneses térben jelentkeznek, mint az N-acetil-metil protonok,

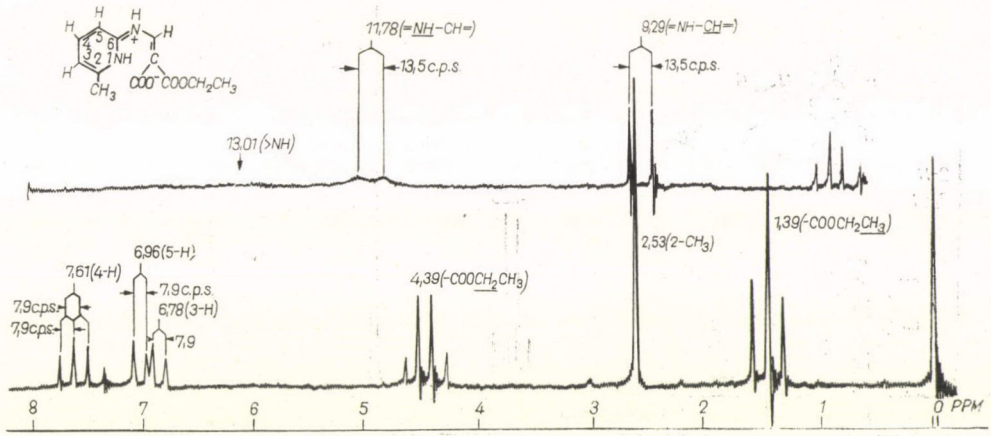


27. ábra

amelyekre a karbonil melletti C=N kötés ilyen effektust nem fejt ki.) A 6,8—8,2 ppm közötti intervallumban, az ún. „aromás tartományban" a várakozásnak megfelelően a molekula aromás protonjainak rezonancia vonalai jelentkeznek; ezek közül a 2-es helyzetű fenil-csoport protonjai mágnesesen ekvivalensek lévén, egyetlen vonalat adnak, míg a többi négy *ABCX* típusú multiplet struktúrát eredményez, amelyből a legnagyobb eltolódású 5—6 helyzetű (*X*) könnyen azonosítható. A fennmaradó *AB* (26. ábra), ill. *AX* (27. ábra) típusú vonalrendszert alkotó két dublet a vicinális helyzetű 2-es és 3-as szénatomhoz kapcsolódó hidrogénatomoktól származik. (A két hidrogénatom hozzárendelését az teszi lehetővé, hogy a 2-es helyzetű a szomszédos aromás gyűrű protonjaival „long-range" kapcsolást mutat, emiatt e proton vonalai kissé szélesebbek, azaz amplitúdójuk kisebb.) A szóban forgó izomériaviszony eldöntése a C=N—O csoport diamágneses anizotrópiája segítségével lehetséges. Az anizotrópia ebben az esetben hasonlít ahhoz, amit az amidcsoporttal kapcsolatban korábban megismertünk, nevezetesen, azok a protonok, amelyek a C=N—O csoport síkjában az oxigénatomhoz közel kerülnek, paramágneses eltolódást szenvednek. A *syn* izomer esetében ez a hatás vár-

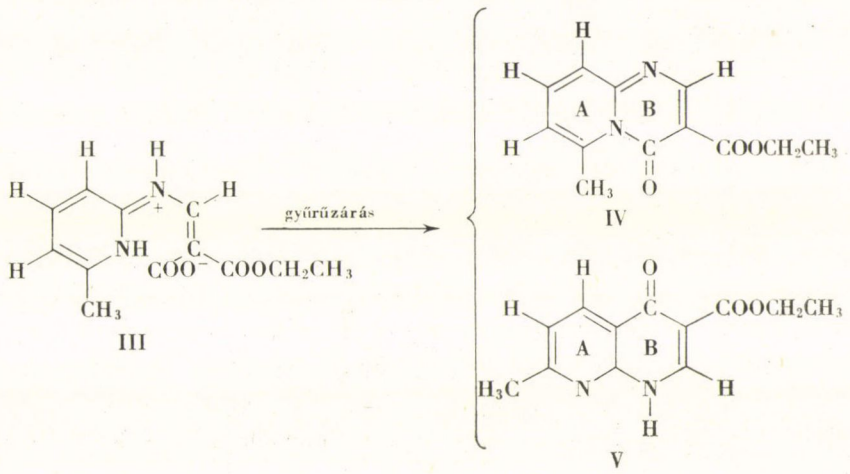
hatóan az 5-ös helyzetű aromás proton rezonanciáján, az *anti* izomer esetében pedig a 3-as helyzetű hidrogénatom eltolódásában nyilvánul meg. A 26. és 27. ábra spektrumait összehasonlítva ebből a szempontból, megállapíthatjuk, hogy az említett két protonhoz tartozó vonalak a C=N—O csoport konformációjának megváltozásakor valóban ellentétes irányban mozdulnak el. Így a *syn* izomerhez a nagyobb eltolódású 5-ös (26. ábra), az *anti* formához pedig a nagyobb eltolódású 3-as protont tartalmazó spektrum (27. ábra) tartozik.

A III. szerkezeti képlettel felírt molekulából gyűrűzárási reakció eredményeként egy vegyület keletkezik, amely a kémiai tulajdonságok, az UV és

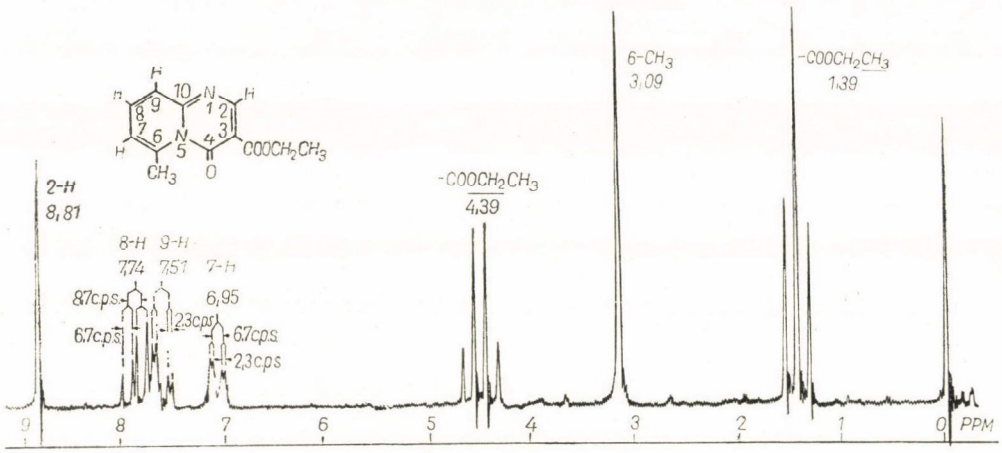


28. ábra

IR spektrum alapján a IV. és V. szerkezettel egyaránt értelmezhető. Tekintettel arra, hogy e szerkezeti alternatívák a hidrogénatomokat eltérő eloszlásban tartalmazzák, a protonrezonancia spektrum lehetőséget nyújt, hogy a legvalószínűbbet kiválasszuk.



A kiindulási anyag (III) és a kapott termék deuterokloroformban felvett spektrumát a 28. és 29. ábra mutatja. A III. spektrumának értelmezése a következő (az előforduló nagy eltolódású vonalak miatt a spektrum két egymás fölé rajzolt részből tevődik össze, a felső görbe 7,4 ppm-nél kezdődik): Az 1,39 és 4,39 ppm-nél jelentkező triplet, ill. kvartet a karbetoxi csoport metil-, ill. metilén-hidrogénjeitől származik. (A metil és metilén protonok, ugyanúgy mint az etilbenzol esetében, külön-külön ekvivalensek, és így vonalaik a szomszédos protoncsoporttal való spin-spin kölcsönhatás folytán 2 + 1, ill. 3 + 1 komponenst tartalmazó multipletre hasadnak fel.) A 2,53



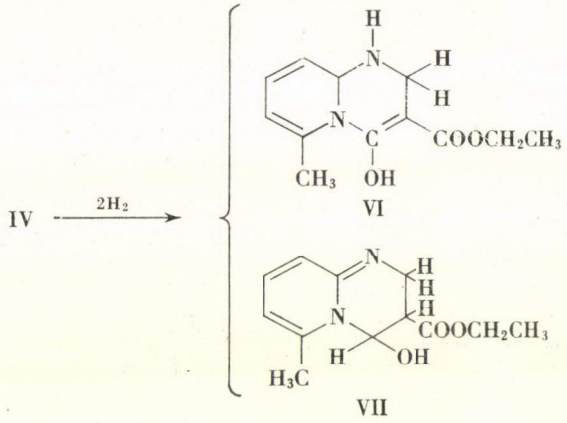
29. ábra

ppm-nél található rezonancia vonal intenzitása és eltolódása alapján a telítetlen gyűrűhöz kapcsolódó metil-csoporthoz rendelendő; a telítetlen gyűrű három protonja a spektrum aromás tartományában jelentkezik. A fennmaradó három hidrogénatom kémiai eltolódása a szokásosnál valamivel nagyobb, ami a gyűrű konjugációjával és elektronegatív csoportok jelenlétével függ össze. Figyelemre méltó a két nitrogénatomhoz kapcsolódó proton rezonanciavonalának szélessége. (A gyűrű N—H proton vonala az adott erősítés mellett szélessége miatt teljesen beleolvad az alapvonalba.) Ez a tulajdonság általában jellemző a nitrogénhez kapcsolódó proton rezonanciájára, és mint látni fogjuk, részben a nitrogénatommag kvadrupólmomentumával járó relaxáció, részben pedig az N—H protonok kémiai cserereakciójával áll összefüggésben. Jelen esetben a vonalszélességet az utóbbi körülmény szabja meg.

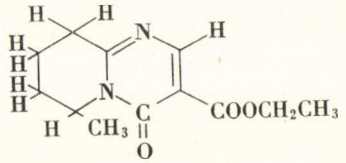
A IV. és V. szerkezet közötti különbség a protonrezonancia spektrumok szemszögéből elsősorban abban áll, hogy a IV. három egymás melletti telítetlen kötéshez kapcsolódó hidrogénatomot, az V. pedig csak kettőt tartalmaz, ugyanakkor az V.-ben megmarad az NH—CH= csoport, a IV.-ben pedig hiányzik. A 29. ábra spektrumát megvizsgálva megállapítható, hogy az a IV.

szerkezettel áll összhangban: a spektrumból eltűnt mindkét —NH proton, az eredetileg 9,29 ppm-nél dubletként jelentkező —N—CH= rezonancia az =N—CH= struktúra kialakulása folytán egyetlen vonalból áll (8,81 ppm), továbbá az aromás tartományban változatlanul 3 proton rezonanciája észlelhető. Figyelemre méltó, hogy a gyűrűzárással járó nagyobbfokú konjugáció a 6-os helyzetű metil-protonok eltolódásának növekedését, valamint a gyűrűprotonok közötti kapcsolási állandók megváltozását vonta maga után.

A IV. vegyület nátrium-bórhidrides redukciója során két mól hidrogént vesz fel. Az $NaBH_4$ a karbonil-csoport speciális redukálószere, emiatt a VI. és VII. szerkezetek egyikének kialakulása várható. A választás ebben az esetben is a protonrezonancia spektrum segítségével végezhető el.

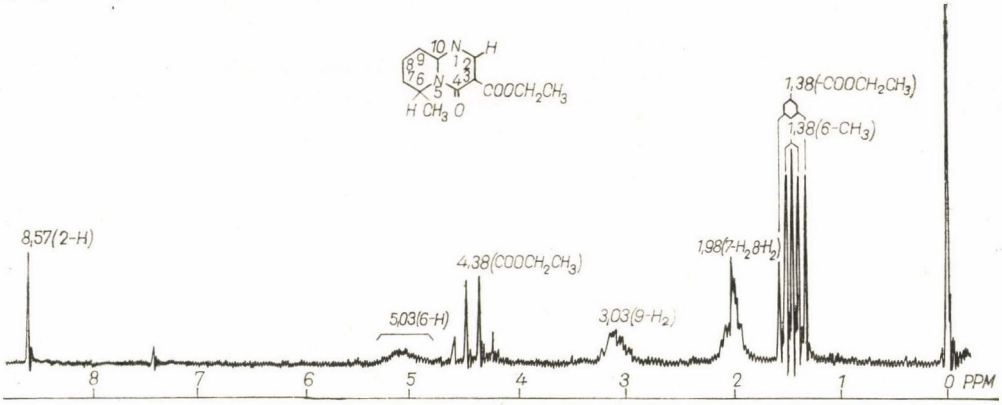


Mindkét szerkezeti alternatíva közös jellemzője, hogy a hidrogénezés a karbonil-csoportot tartalmazó *B* gyűrűben megy végre, és így az *A* gyűrű praktikusan változatlan marad. A 30. ábrán feltüntetett spektrum megvizsgálásakor azonban kitűnik, hogy a hidrogénezéskor kialakuló molekula szerkezete sem a VI., sem a VII. nem lehet, mivel a telítetlen *A* gyűrűre jellemző vonalak eltűntek a spektrum aromás tartományából. Ugyancsak eltűnt a 6-os helyzetű metil-csoport jellegzetes szinguletje, helyette lényegesen kisebb eltolódásnál (1,38 ppm) dublet formájában jelentkezik, viszont gyakorlatilag változatlanul megtalálható az eredeti, *B* gyűrűre jellemző =N—CH= proton rezonanciája (8,57 ppm). A felsorolt változások arra mutatnak, hogy a hidrogénezés a várakozással ellentétben az *A* gyűrűben ment végbe, és a termék szerkezete a spektrummal teljesen összhangban álló VIII. képlettel írható



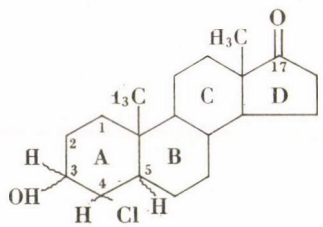
le. Adott esetben tehát a protonrezonancia spektrum segítségével ismeretlen szerkezet meghatározása volt elvégezhető.

Az idáig ismertetett példákban viszonylag kis molekula súlyú anyagok (M ~ 150—250) protonrezonancia spektrumaival találkoztunk, amelyekben az azonos jellegű kémiai környezetben levő hidrogénatomok száma kicsiny, és így a spektrum viszonylag kevés és könnyen hozzárendelhető vonalat, ill. vonalcsoportot tartalmaz. Gyakran — különösen pedig a nagyobb (M ~ 300—700) molekulasúlyú természetes szerves anyagok (szteroidok, alkaloidok, fehérjék, cukrok stb.) kémiájában — ez az egyszerűsíthető körülmény nem áll fenn: azonos jellegű protonok (mint például a szterán váz metilén hidrogénjei) bonyolult, összefolyó és emiatt nehezen értelmezhető vonalrendszert



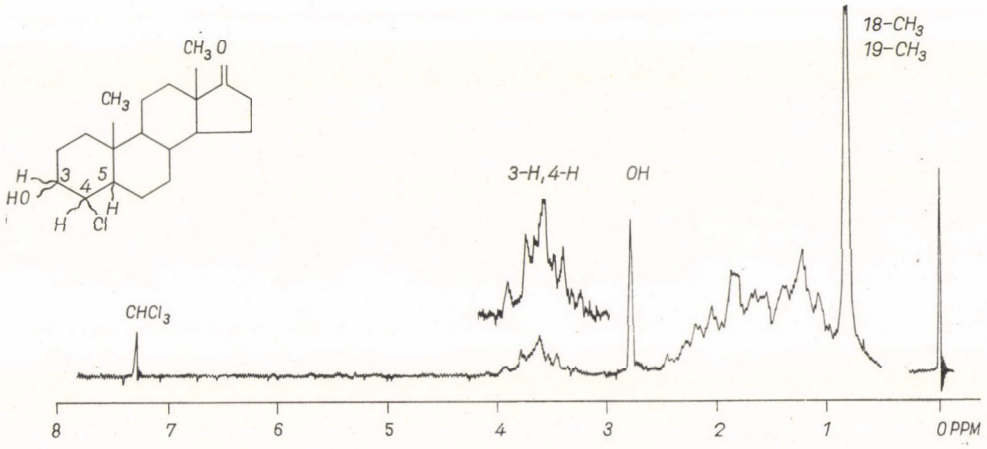
30. ábra

alkotnak, és így a spektrumból nyerhető információ mennyisége jelentősen csökken. A valóságban a helyzet bizonyos mértékig egyszerűbb, mivel a protonrezonancia módszert igénylő szerkezeti problémák többnyire olyanok, hogy valamely szubsztituens térállása, molekulán belüli helyzete vagy valamely kémiai átalakulás eredménye a meghatározandó. E kérdések megoldásában viszont gyakran segítséget jelent az a körülmény, hogy a vizsgált molekularészhez tartozó protonok rezonanciája a szubsztitúció következtében a nehezen kezelhető, összefüggő sávrendszertől elkülönülten jelentkezik. Tipikus példa erre a következő. Enzimatikus átalakulások eredményeként a kiindulási szteroid származékból 3-hidroxi-4-klór-andosztán-17-on keletkezik (IX.).

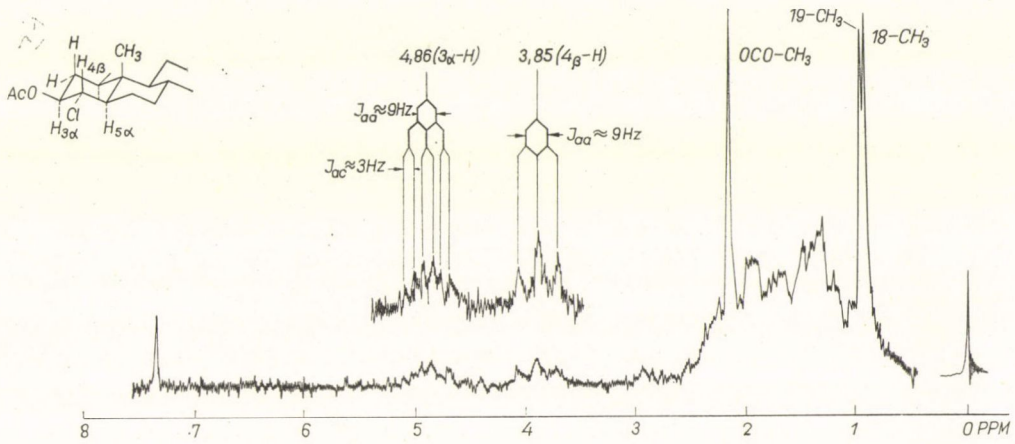


IX

Kérdés: milyen a 3-as és 4-es helyzetű szubsztituensek térállása, és milyen az *A/B* anelláció? Mindkét kérdésre választ kaphatunk a 3-as és 4-es szénatomhoz kapcsolódó protonok kapcsolási állandói segítségével. Az előzőekben láttuk, hogy a vicinális kapcsolási állandó nagysága a hidrogénatomok közötti



31. ábra

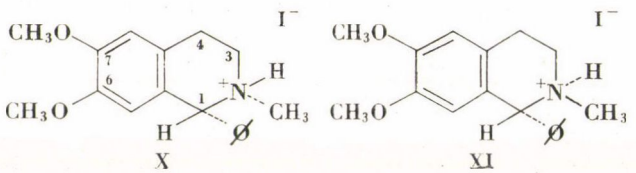


32. ábra

diéderes szög függvénye: szterán vázas vegyületeknél a diaxiális állású ($\Phi = 180°$) vicinális protonok kapcsolási állandója általában 9—11 Hz, az axiális-ekvatoriális ($\Phi = 120°$), valamint a diekvatoriális ($\Phi = 60°$) protonoké pedig 3—4 Hz körüli értéket vesz fel. A IX. deuterokloroformos oldatáról készült spektrumot a 31. ábra mutatja. A szterán váz metilén protonjaitól származó összefüggő sávrendszeren kívül azonosíthatóan csupán a 18-as és 19-es anguláris metil-csoportok, az —OH, valamint a kérdéses, 3-as és 4-es helyzetű proto-

nok rezonanciája jelentkezik. A két utóbbi proton kémiai eltolódása közel megegyezik, emiatt a kialakuló vonalrendszer túlságosan bonyolult ahhoz, hogy a keresett kapcsolási állandókat a spektrumból közvetlenül kiolvashassuk. Jelentősen egyszerűsödik a helyzet, ha a 3-as helyzetű OH csoportot acetilezéssel O-acetil csoporttá alakítjuk (a reakció minimális mennyiségű mintával is könnyen elvégezhető), tekintettel arra, hogy ez a változás a 3-as helyzetű proton eltolódásának mintegy 1—1,2 ppm-nyi növekedését, azaz a 3-as és 4-es helyzetű proton multipletjének szétválását vonja maga után. A IX. acetilezett származékának spektrumát a 32. ábra mutatja. A multipleteknek a spektrumon feltüntetett közelítő értelmezéséből (a pontos adatok csak a spektrum-analízis segítségével nyerhetők) és a kapcsolási állandók nagyságából következik, hogy a 4-es helyzetű proton a 3-as és 5-ös helyzetű protonnal diaxiális kölcsönhatást létesít; két diaxiális és egy axiális-ekvatoriális kapcsolás figyelhető meg a 3-as helyzetű proton multipletjében, amelyek értelemszerűen a 4-es és 2-es helyzetű protonoktól származnak. Az elmondottakból következik, hogy a 3-as és 4-es szubsztituens térállása egyaránt ekvatoriális, az *A/B* anelláció pedig trans (ill. 5α). Érdemes kihangsúlyozni, hogy a most ismertetett térszerkezeti kérdés más spektroszkópiai módszerekkel nem volt megoldható, a kémiai úton való felderítés pedig rendkívül hosszadalmas és jelentős mennyiségű értékes anyag elvesztésével járt volna.

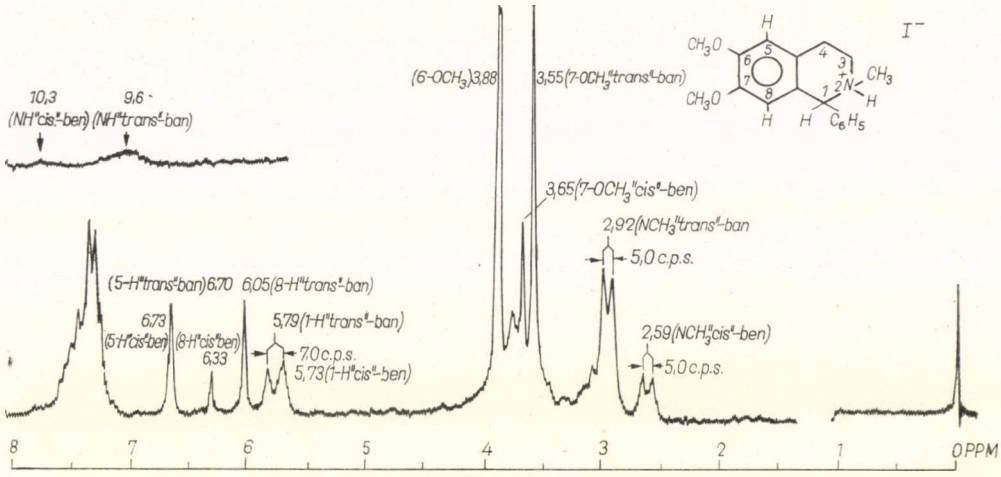
A protonrezonancia spektroszkópia másik alkalmazási területe a kvalitatív és kvantitatív kémiai analízis, az egyes anyagok azonosítása spektrumaik alapján, tisztaságuk meghatározása stb., az elmondottakból egyértelműen következik, és ebben a vonatkozásban elvileg hasonlít más ilyen céllal alkalmazott módszerekhez. Különös előnye főként olyankor jelentkezik, amikor a vizsgált anyag praktikusan megegyező fizikai tulajdonságú (és emiatt el nem különíthető) izomerek elegyéből áll. A protonrezonancia paramétereknek rendkívüli érzékenysége a kémiai környezetre lehetővé teszi, hogy a más módszerek szempontjából egységes anyagminta komponenseit azonosítsuk, azok szerkezeti eltéréseit megállapítsuk és relatív mennyiségüket meghatározzuk. Jellegzetes alkalmazási eseteket képviselnek az optikai izomerek egyes változatai (diasztereomerek, atropizomerek stb.) vagy a részlegesen deuterált, ^{15}N-nel, ^{13}C-vel jelzett izotóp molekulák elegyei. A 33. ábra egy tipikus diasz-



X XI

tereomer elegy, az 1-fenil-2-metil-6,7-dimetoxi-1,2,3,4-tetrahidro-izokinolinból protonálással előállított nitrogénen diasztereomer *cis* 1-fenil-2-metil (X.) és *trans* 1-fenil-2-metil (XI.) izokinolinium sópár spektrumát mutatja. Jól

látható, hogy a két izomer, amely egyébként éles olvadáspontú elegykristályokat képez, eltérő és egymástól könnyen megkülönböztethető protonrezonancia spektrumot szolgáltat, amelyek relatív intenzitása közvetlen mértéke az izomer-elegy összetételének. A protonrezonancia spektroszkópia ilyen irányú teljesítőképességét talán legjobban az optikai antipodok megkülönböztetése közelmúltban kidolgozott módszere szemlélteti. A kísérleti eljárás lényege abban áll, hogy az antipodokat tartalmazó oldathoz alkalmasan megválasztott, optikailag aktív oldószert adnak. Ez az oldott molekulákkal laza szolvátkomplexet képez, amelynek magrezonancia spektruma a két antipodra nézve eltérő.



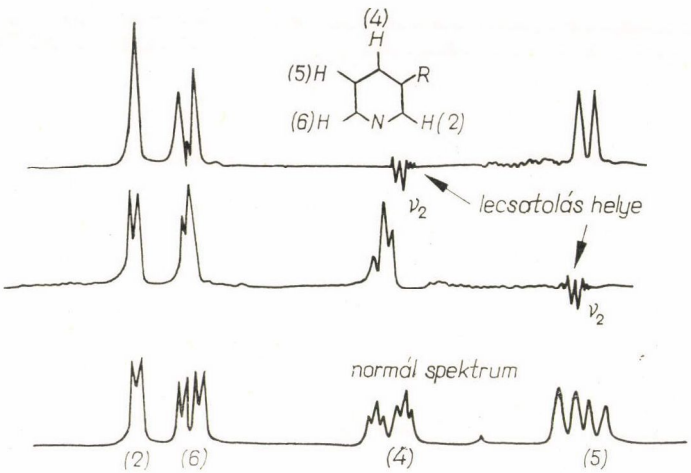
33. ábra

A fentiekben bemutatott néhány példa a protonrezonancia spektroszkópia alkalmazásának azon egyszerűbb eseteit képviseli, amikor a vizsgálati feladat megoldásához szükséges paraméterek a spektrumokból közvetlenül, ill. a spektrum-analízis módszereit követve megszerezhetők. Igen gyakran azonban a spektrumban foglalt értékes információ megszerzéséhez speciális kísérleti technika is szükséges. Néhányat ezek közül az alábbiakban ismertetünk.

Spektrum akkumuláció. A magrezonancia spektrumok egyik fontos minőségi jellemzője a jel/zaj viszony. A korszerű spektrométerek (a szokásos 0,3—0,4 ml mintatérfogatra számítva és a molekulasúlytól függően) mintegy 20—50 mg (60 MHz), ill. 10—25 mg (100 MHz) anyagmennyiséget igényelnek jól értékelhető, kielégítő jel/zaj viszonyú spektrumok készítéséhez. Túlságosan híg oldatok esetében (rossz oldhatóság, kevés anyagminta) a jel/zaj viszony lecsökken és a spektrum számos részlete felismerhetetlenné válik. A jel/zaj viszony növelésére szolgál a spektrum-akkumulációs technika, melynek lényege az, hogy egy e célra szolgáló elektronikus berendezés az egymás után

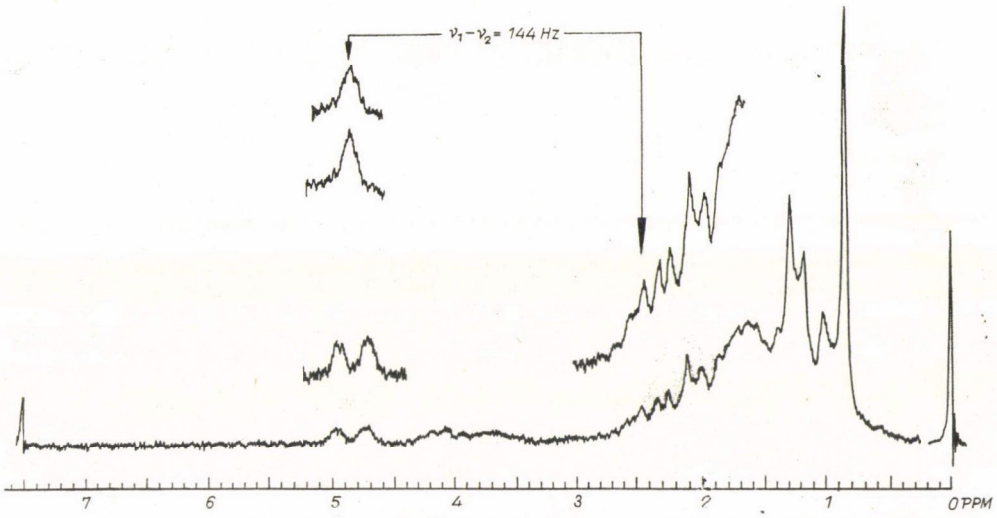
többször felvett spektrumot összegezi. Az összegezéskor a jel amplitúdója a spektrum felvételek számával lineárisan, míg a zaj annak négyzetgyökével arányosan növekszik. Kellő számú ismétlés esetén a jel/zaj viszony az egyszeri felvételének 10—15-szörösére növelhető (l. 41. ábra).

Kettős rezonancia. Ennek a kiterjedten alkalmazott kísérleti technikának lényege a következő. Tételezzük fel, hogy a spektrum két egymással kölcsönható A és X proton rezonancia vonalait tartalmazza. Abban az esetben, ha a spektrum felvételére szolgáló ν_1 frekvenciájú téren kívül a mintát egy másik, ν_2 frekvenciájú és H_2 amplitúdójú rádiófrekvenciás térrel is besugározzuk, és ν_2 értékét olyanra választjuk, hogy az az adott mágneses térben kielégítse az X proton rezonancia felvételét, az A proton rezonanciájának



34. ábra. A spin-lecsatolás alkalmazása spin multipletek egyszerűsítésére és a kapcsolás eredetének meghatározására

megvalósításakor azt tapasztaljuk, hogy az A és X proton közötti spin-spin kölcsönhatásból eredő multiplet megváltozik: igen kis amplitúdójú H_2 tér esetén az A proton vonalai megduplázódnak („spin-tickling"), nagy amplitúdójú H_2 tér esetén pedig az X protonok gyakori indukált átmenetei miatt az A és X proton között a spin-spin kapcsolat kiátlagolódik, az A proton rezonanciája szinguletként jelentkezik (spin-lecsatolás, spin-decoupling). A kettős rezonancia főbb alkalmazási területei a következők: *a)* a spektrumok egyszerűbbé tétele az analízist megnehezítő spin-multipletek megszüntetése útján (l. 34. ábra); *b)* olyan proton kémiai eltolódásának meghatározása, amelynek rezonancia vonala a spektrumban egyéb vonalakkal való átfedés miatt nem azonosítható, viszont spin-spin kölcsönhatásban van egy könnyen azonosítható protonnal (l. 35. ábra). Használatos ezenkívül feltételezett spin-spin kölcsönhatások igazolására, továbbá a kapcsolási állandók előjelé-



35. ábra. A spin lecsatolás alkalmazása elfedett vonal kémiai eltolódásának meghatározására (2,45 ppm). A spin-spin kölcsönhatásban levő két proton eltolódás-különbsége 144 Hz. A H_2 térrel a besugárzást 2,45 ppm-nél végezve a „látható" proton dublet-jellege — a kölcsönhatás lecsatolása miatt — megszűnik

nek meghatározására. A kettős rezonancia kísérlet nemcsak azonos, hanem eltérő magfajták esetén is megvalósítható (heteronukleáris kettős rezonancia).

A külső mágneses tér értékének növelése. Az árnyékolási effektus ismertetésekor említettük, hogy a kémiai eltolódásnak frekvencia — vagy mágneses tér egységekben mért abszolút értéke ($H_i - H_r$), azaz az eltérő eltolódású vonalak közötti távolság, a mágneses tér értékével együtt növekszik. A nagyobb külső mágneses tér tehát elősegíti a közel azonos kémiai környezetű protonok rezonanciájának elkülönítését és ezáltal azok tanulmányozását. Ez a megállapítás elsősorban a természetes makromolekulák (proteinek, nukleinsavak stb.) szerkezeti vizsgálata szempontjából jelentős. A jelenleg alkalmazott protonrezonancia spektrométerek túlnyomó többsége 60 MHz-en működik, az alkalmazott mágneses térerősség ennek megfelelően 14,1 kgauss. Az említett biopolimerek protonrezonancia spektruma ennél a mágneses tér értéknél kevéssé strukturált, a segítségükkel nyerhető szerkezeti információ meglehetősen korlátozott. Jelentősen javul a helyzet a 23,4 kgauss erősségű mágneses teret alkalmazó 100 MHz-es spektrométerrel készített felvételeknél. Valószínű azonban, hogy ez a kérdéscsoport csak az legmodernebb, 220 MHz-es (52 kgauss) készülékek segítségével közelíthető meg. E berendezések ma még igen kis számban léteznek (mágneses terüket cseppfolyós héliummal hűtött szupravezető szolenoid szolgáltatja). Az eddig kapott eredmények azonban arra engednek következtetni, hogy a protonrezonancia spektroszkópiai módszer ilyen nagyságú mágneses terek alkalmazása esetén lehetővé teszi a proteinek és nukleinsavak oldat struktúráinak és kölcsönhatásainak részletesebb

vizsgálatát, továbbá az eddig csak makroszkopikus paramétereken keresztül követett szerkezeti változások pontosabb értelmezését, ami tulajdonképpen a molekuláris biológia továbbfejlődésének központi kérdése.

Kicserélődési effektusok. Kémiai folyamatok vizsgálata proton rezonancia módszerrel

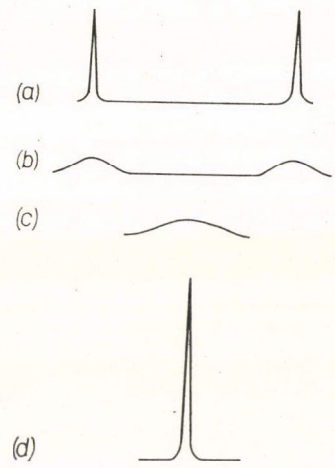
Eddigi áttekintésünk során mindig feltételeztük, hogy a rezonancia jelenséget szolgáltató mag környezete időben állandó. Kémiai rendszerek tanulmányozása során azonban igen gyakran előfordulnak olyan esetek is, amikor a vizsgált mag intra- vagy intermolekuláris folyamatok következtében megváltoztatja környezetét. E folyamatok közül a magrezonancia spektroszkópia szempontjából elsődleges jelentőségűek azok, amelyek a magok kicserélődéséhez vezetnek két vagy több környezet között. Tipikus példái ennek a molekuláris átrendeződések, gátolt belső forgások, atom-átviteli reakciók (pl. proton transfer), ligand csere stb.

Egyszerűség kedvéért tekintsünk egy olyan molekulát, amelyben két kémiai környezet (A és X) van és mindegyik környezet azonos számú protont tartalmaz, amelyek egymással nem állnak spin-spin kölcsönhatásban. A molekula protonrezonancia spektruma ekkor két egyenlő intenzitású vonalból áll; a vonalak közötti frekvenciában mért távolság egyenlő a két környezetre jellemző kémiai eltolódás különbségével $\nu_A^\circ - \nu_X^\circ = \nu_0 \delta_0$, a vonalak szélességét pedig (relaxációs effektusok távollétében, azaz, ha $1/T_{2A} = 1/T_{2X} \approx 0$) a spektrométer felbontóképessége szabja meg. Ha valamilyen külső behatásra (pl. melegítés, katalízis) a két környezet között proton csere indul meg és a cserereakció sebességi állandója τ^{-1} [τ (sec.) a csere folyamatok közötti átlagos idő] lényegesen nagyobb, mint az eltolódás különbség, $\tau^{-1} > 10\, \nu_0 \delta_0$, a spektrum csak egyetlen keskeny vonalat tartalmaz, melynek eltolódása az eredeti ν_A° és ν_X° középértékével egyenlő. Ha a folyamat sebességét (pl. a hőmérséklet változtatásával) szabályozni tudjuk, és a spektrumot a „lassú" és a „gyors" cserereakciónak megfelelő határok között (két, ill. egy keskeny vonal) közepes sebességeknél is felvesszük, a 36. ábrán látható görbéket kapjuk.

A bemutatott jelenség a határozatlansági reláció egyenes következménye, amelyet jelen esetben a

$$T\nu_0\delta \approx \frac{1}{2\pi}$$

alakban írhatunk fel, és úgy értelmezhetünk, hogy a kémiai reakció következtében az A és X állapotok élettartama (τ) rövidebb lett, emiatt az azokra jellemző energiát csak $2\pi\tau$ pontossággal tudjuk definiálni. Az élettartam rövidülése az energia szintek fokozatos „elmosódását", majd a két állapot megkülönböztethetetlenségét és végül teljes átlagolódását vonja maga után.



36. ábra. Protonok kicserélődése két környezet között; a csere sebességének hatása a rezonancia vonalak alakjára: a) igen lassú reakció, b) a csere sebességének növekedése a vonalak szélesedését, c) összeolvadását eredményezi. d) Egészen nagy sebességeknél a spektrumban egyetlen keskeny vonal jelentkezik

Hasonló jelenség figyelhető meg akkor is, amikor a csere reakcióban résztvevő protonok spin-spin kölcsönhatásban vesznek részt, akár egymás között, akár a környező magokkal.

A magrezonancia (és elektronrezonancia) spektroszkópia e tekintetben sajátos helyet foglal el a spektroszkópiai módszerek között, amennyiben számos kémiai folyamat karakterisztikus ideje (reciprok sebességi állandója) kommenzurábilis a spektrális állapotok élettartamával, illetőleg két állapot közötti (idő-egységben kifejezett) energia különbséggel. (Az optikai spektroszkópiai módszerek szempontjából a leggyorsabb kémiai reakció is túlságosan lassú ahhoz, hogy ilyen módon tanulmányozható legyen.)

Protonrezonancia spektrumokban az eltolódásbeli különbségek általában 10—100 Hz nagyságúak, azaz a teljes kiátlagolódást eredményező reakciók sebességi állandója 10^2—10^3 s^{-1} határok között mozog. Feltételezve, hogy a frekvencia faktor a szokásos 10^9—10^{13} nagyságrendbe esik, a spektrométerekben megvalósítható —100° — +200°C hőmérsékleti intervallum 0,5—25 kcal/mól nagyságú aktiválási energiák kimutatását, ill. kvantitatív meghatározását teszi lehetővé.

A kicserélődési effektus okozta vonalalak változás elméletét részletesen kidolgozták, ennek ismertetésétől ehelyütt azonban el kell tekintenünk és csupán az elmélet néhány egyszerű esetre vonatkozó következményét mutatjuk be.

Az előbbi példánál maradva, a két környezet között kicserélődő protonok eredő abszorpciós görbéjét a τ és a rezonancia frekvenciák függvényében a (7) egyenlettel megadott vonalalak-függvény írja le:

$$g(\nu) = K \frac{\tau(\nu_A - \nu_X)^2}{\left[\frac{1}{2}(\nu_A + \nu_X) - \nu\right]^2 + 4\pi^2\tau^2(\nu_A - \nu)^2(\nu_X - \nu)^2} \tag{7}$$

Ahol K a normálási tényező.

A 36. ábra ezt a függvényt ábrázolja a közepes sebességek tartományában. Látható, ahogyan τ^{-1} tart a $\nu_0\,\delta_0$ értékéhez, a vonalak egyre szélesebbek lesznek és kezdenek összeolvadni. A teljes összeolvadás a

$$\tau = \frac{1}{\sqrt{2}\,\pi\,\nu_0\,\delta_0} \tag{8}$$

pontnál következik be. A kísérleti rezonancia görbének fenti függvény szerinti analízise a csereréakció bármely sebességénél elvégezhető és a keresett τ érték (ill. ebből a reakció sebességi állandója) meghatározható. A gyakorlatban a vonalalak analízis többnyire nehézkes eljárás, emiatt a sebességi állandó becslésére elterjedten használják a (8) összefüggést.

Olyan sebességeknél, amikor a vonalak teljes összeolvadása még nem következik be (közepes sebességű csere esete), a (7) egyenletből kiindulva felírhatjuk

$$\tau = \frac{1}{\sqrt{2}\,\pi}(\nu_0\,\delta_0^2 - \nu_0\,\delta^2)^{-1/2} \tag{9}$$

ahol $\nu_0\,\delta$ a τ aktuális értékének megfelelő eltolódás különbség. A vizsgált reakció aktiválási energiájának (E_a) meghatározására ez a sebességi intervallum a legalkalmasabb. Ebből a célból a különböző hőmérsékleteken kapott $\log(^1/_2\,\pi\tau\nu_0\,\delta)$ értékeit kell az $1/T$ függvényében ábrázolni. Az így adódó egyenes iránytangense $-E_a/2{,}3\,R$-rel, a tengelymetszet pedig $\log(k_0/\pi\nu_0\,\delta_0)$-val lesz egyenlő, ahol k_0 a frekvencia faktor.

Néha a közepes sebességeknek ez a tartománya nem érhető el, vagy azért, mert a reakció túlságosan lassú a spektrométerben megvalósítható legmagasabb hőmérsékleteken is ($\sim 200°C$), vagy pedig azért, mert túlságosan gyors ahhoz, hogy hűtéssel az összeolvadt vonalakat szét lehessen választani. Ilyenkor a csereréakció hatását mint vonalszélesedési effektust lehet jó közelítéssel kezelni. Lassú reakció esetén például a mért vonalszélesség ($1/T_2'$)

$$1/T_2' = 1/T_2 + 1/\tau$$

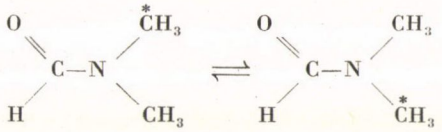
ahol $1/T_2$ a csere nélküli állapotban mért értéket jelenti.

A fenti összefüggések a két környezet között cserélődő protonok esetére vonatkoznak. A csere folyamatban résztvevő környezetek számának növekedésével a kísérleti vonalalak interpretálása komplikálódik, és a keresett

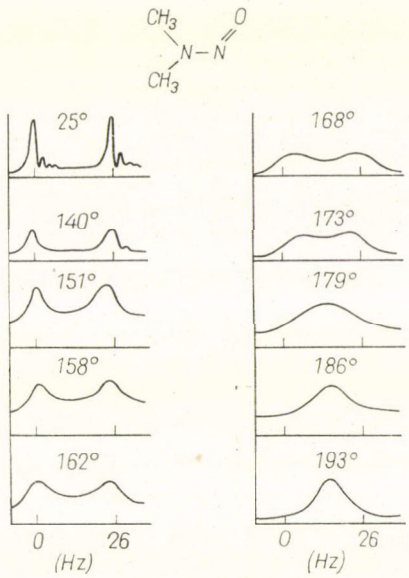
reakció paraméterek meghatározása kellő pontossággal csupán számítógépek segítségével lehetséges.

Az elmondottak illusztrálására a következőkben néhány alkalmazási példát mutatunk be.

Gátolt rotáció. Ez a folyamat tipikusan azon reakciók közé tartozik, amelyek tanulmányozása a magrezonancia módszer kidolgozása előtt az esetek túlnyomó többségében lehetetlen volt. Az új experimentális adottságokat igen hamar felismerték, és a gátolt rotáció sebességének, valamint aktiválási energiájának mérése képezte az első magrezonanciás kinetikai vizsgálatok tárgyát. Példaként nézzük az N,N-dimetil-formamid esetét. A forgási gátlás fellépése ennél a molekulánál az amidokra jellemző parciális C—N kettőskötés következménye. A cserereakció az alábbi módon tüntethető fel:

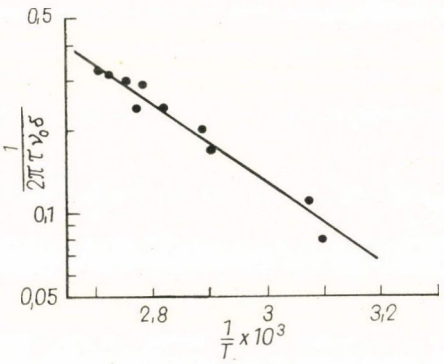


vagyis az N-metil csoportok a C—N kötés körüli elfordulás eredményeként helyet cserélnek. A két helyzet, mint láttuk, az amid karbonil csoport diamágneses anizotrópiája miatt nem ekvivalens. A szobahőmérsékleten felvett spektrum (l. 12. ábra) ennek megfelelően két N-metil vonalat tartalmaz, ami egyúttal azt is mutatja, hogy a csereakció sebessége ezen a hőmérsékleten



37. ábra. Metil protonok vonalalakjának változása az N,N-dimetilformamid melegítésekor

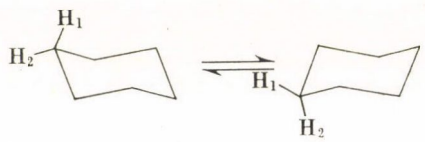
igen kicsiny. A hőmérséklet növelésével a rezonancia vonalak alakja a már ismert módon megváltozik (l. 37. ábra). A különböző hőmérsékleteken mért eltolódási különbségeket Arrhenius-diagramban ábrázolva egyenes adódik (l. 38. ábra), ahonnan a forgási energiagát értékére 7 ± 3 kcal/mól adódik.



38. ábra

Ezt a módszert alkalmazva egyéb amid, alkil-nitrit, N,N-dialkil-nitrózamin stb. gátolt forgását is tanulmányozták, és a kapott aktiválási energiák alapján meghatározták a forgási gátlást befolyásoló molekuláris tényezőket.

Inverzió. Tipikus inverziós folyamat a ciklohexán szék-szék átmenete (interkonverziója): melynek eredményeként az axiális és ekvatoriális térállású



protonok helyet cserélnek. Szobahőmérsékleten a ciklohexán spektruma egyetlen éles vonalból áll, utalva az inverziós folyamat nagy sebességére. A ciklohexán széndiszulfidos oldatát lehűtve −50° alatt a rezonancia vonal szélesedni kezd, −67° alatt dublet jellegű vonalrendszer jelenik meg, a dublet szeparációjára (60 MHz-es mérési frekvencián), $\nu_0\,\delta = 27{,}3$ Hz adódik, ami egyenlő az axiális és ekvatoriális protonok eltolódási különbségével. A dimetil-formamid esetében ismertetett módszert alkalmazva az inverzió sebessége −66,7°-on 105 s^{-1}, ahonnan az abszolút sebesség elmélet összefüggéseit alkalmazva $\Delta H^{\neq} = 10{,}3 \pm 0{,}2$ kcal/mól és $\Delta S^{\neq} = -0{,}2 \pm 0{,}9$ eu/mól nyerhető.

Más gyűrűs vegyületek interkonverziós folyamatain kívül a protonrezonanciás kinetikai módszer kiválóan alkalmas aminok inverziójának vizsgálatára is.

Intermolekuláris cserereakciók. E reakció típus legegyszerűbb példája az alkoholok és víz között lejátszódó proton átadási folyamat. A teljesen tiszta

etanol protonrezonancia spektrumában az OH proton a szomszédos metilén protonokkal való spin-spin kölcsönhatás folytán tripletként jelentkezik. Kismennyiségű sav vagy bázis hozzáadására az alkohol molekulák között katalitikus protonátadási folyamat indul meg, ami a vizsgálati hőmérséklettől függően a triplet komponenseinek kiszélesedését vagy teljes összeolvadását eredményezi. A reakció körülményeinek (pH, hőmérséklet stb.) változtatásával ezen az úton a protonátadási reakció elemi lépéseinek sebességi állandói is meghatározhatók. A protonrezonanciás mérési elv más, komplikáltabb rendszerekre is átvihető, és így a protonátadási folyamatok — mint ahogy ezt a sarcosin és glicin részletesen tanulmányozott példája is mutatja — biológiai rendszerekben is mérhetőkké válnak.

$$\mathrm{CH_3\,CH_2\,OH^* + CH_3\,CH_2\,OH \overset{\text{sav, bázis}}{\rightleftharpoons} CH_3\,CH_2\,OH + CH_3\,CH_2\,OH^*}$$

Ligand csere paramágneses komplexekben. Paramágneses komplexekben a párosítatlan elektron delokalizációja során hiperfinom kölcsönhatásba lép a ligand protonjaival, és a spin-sűrűséggel arányos ún. izotróp eltolódást eredményez. Ennek nagysága:

$$\left(\frac{\Delta\nu}{\nu_0}\right)_i = -A_i \frac{\gamma_e}{\gamma N} \frac{g\beta S(S+1)}{3kT}$$

ahol A_i az i-edik proton hiperfinom kapcsolási állandója, γ_e az elektron giromágneses faktora, g a spektroszkópiai felhasadási tényező, β a Bohr-féle magneton és S az elektron spin kvantumszáma. Abban az esetben, ha a paramágneses komplex és a szabad (diamágneses) ligand molekulák között gyors csere reakció lehetséges:

$$P + D \rightleftharpoons D + P$$

(ahol D és P a diamágneses, ill. paramágneses állapotú ligand molekulákat jelenti), a kísérleti eltolódás egyenlő a paramágneses és diamágneses eltolódások átlag értékével

$$\Delta\nu_i = \frac{[P]}{[D]} A_i \frac{\gamma e}{\gamma N} \frac{g\beta S(S+1)}{3\ kT} \nu_0$$

ahonnan a spin-sűrűségre jellemző hiperfinom kapcsolási állandó közvetlenül meghatározható. E módszer előnye az elektron rezonanciával szemben abban áll, egyrészt, hogy igen kis kapcsolási állandók is pontosan meghatározhatók, másrészt az eltolódás irányából a kapcsolási állandó előjele is eldönthető. Nem teljes csere esetében a vonalak analízis felvilágosítást adhatnak a ligand

kicserélődés sebességéről. E két paraméter, a spin sűrűség eloszlása a ligandon belül és a ligand csere sebessége rendkívül nagy fontosságú paramágneses ionokat tartalmazó organikus rendszerek tanulmányozása szempontjából.

A fentiekben láttuk, hogyan következik be kémiai folyamatok „átlagoló" hatására a rezonancia vonalak összeolvadása. Ilyen átlagolódási effektus megjelenése azonban nem minden esetben utal cserereakciók jelenlétére. Jellegzetes átlagolódási effektus figyelhető meg például a nitrogénhez (^{14}N) kapcsolódó protonok rezonanciája esetében is. A nitrogén magspinje egységnyi ($I = 1$), ezért valamennyi nitrogénhez közvetlenül kapcsolódó proton rezonanciájának triplet formában kellene jelentkeznie. A valóságban ez csak ritka esetekben következik be, helyette a spektrumban egyetlen széles elmosódott vonal látható. Ennek oka az, hogy a nitrogénatom kvadrupól momentuma intenzív relaxációs folyamatot indukál, a nitrogén mag mágneses állapotának élettartama emiatt igen rövid, következésképpen a spin-spin kölcsönhatás nem tud kialakulni. Ugyanígy átlagoló hatással értelmezhető a spin lecsatolás jelensége is. Az átlagolást ebben az esetben a lecsatolt magnak a H_2 tér által indukált átmenetei okozzák.

Nagyfelbontású magrezonancia spektroszkópia egyéb magok esetében

A magrezonancia technika alkalmazása a proton és fluor magok esetében fejlődött ki legjobban, ennek oka nem csupán kémiai fontosságukban rejlik, hanem mert e magok mérhetőek a legkedvezőbb jel/zaj viszony mellett (I. Függelék I. táblázat). A kémai szerkezet vizsgálat és analízis szempontjából nagyon fontos még a ^{11}B, ^{13}C, ^{2}H, ^{31}P, ^{17}O, ^{33}S és a halogén magok rezonancia vizsgálata. A ^{33}S kivételével sikerült is kielégítő nagyfelbontású spektrumot kapni mindegyiknél, a legkülönbözőbb vegyületekben. A halogének közül Cl, Br és I mérése nehézkes.

Közös vonás e magok rezonancia mérésénél:

1. kis relatív érzékenység, azaz kis jel/zaj viszony, amelyet tovább csökkenthet a természetes előfordulás (más nem mágneses izotóp sokszor nagyobb gyakorisággal fordul elő);

2. elektromos kvadrupól momentummal rendelkezhetnek, amely a jel kiszélesedéséhez vezet. Ez nemcsak a nagyfelbontású technikát nehezíti meg, de lényegesen csökkentheti a jel/zaj viszonyt;

3. kedvezőtlenül hosszú spin-rács relaxációs idők léphetnek fel.

Legtöbb esetben a kísérleti technika módosításával e nehézségek legyőzhetők. Így például a jel/zaj viszony spektrum akkumulációval növelhető (különösen fontos ez ^{13}C és deuteron rezonanciánál). A nehezebb magoknál szerencsés körülményként segítségünkre jön, hogy a kémiai eltolódások sokkal nagyobbak, mint a protonnál, ezért adott homogenitású mágnes megtartása mellett sokkal nagyobb mintatérfogat alkalmazható, mert a minta

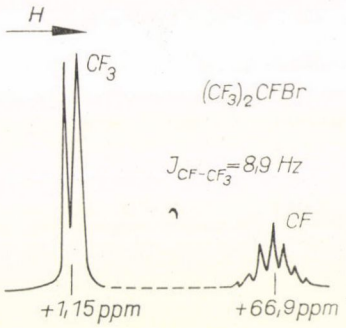
geometriai méreteinek növelése miatt kiszélesedett jel nem eredményez rosszabb relatív felbontású spektrumot, mint amit proton esetében kapnánk.

Az igen kis százalékban előforduló magok esetén dúsított stabil izotóp beépítése a molekulába elterjedt módja a jel/zaj növelésnek is.

A rádiófrekvenciás térerő növelése a kedvezőtlen relaxációs viszonyok esetén nem járható út, csupán a diszperziós módus használható ekkor, vagy a rezonancián való gyorsabb áthaladás felvételkor.

Fluor

Az utóbbi években ugrásszerűen megnőtt fluorrezonancia irodalom híven tükrözi az iránta tanúsított érdeklődést: nagy kémiai eltolódásai (600 ppm-ig) és spin-spin kapcsolási állandói következtében sokszor könnyebben



39. ábra

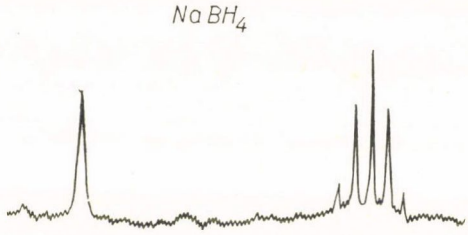
ad felvilágosítást molekulaszerkezeti kérdésekben és kémiai folyamatokról, mint a protonrezonanciás vizsgálat. A fluor 19-es izotópja az egyetlen természetesen előforduló fluor izotóp, másrészt $^1/_2$-es spinje miatt nincs kvadrupól momentuma, így ideális mag a magrezonanciás vizsgálatok számára, annak ellenére, hogy könnyebben telítődik, mint a megfelelő protontartalmú minta és valamivel kisebb érzékenységgel mérhető. Ugyanakkor számos vegyülete szobahőfokon folyadékfázisban vizsgálható.

Apparatúra szempontjából további előnye, hogy rezonancia feltétele nagyon közel esik a protonéhoz, így a legtöbb protonspektrométerrel — átkapcsolás után — mérhető (más magokhoz általában a gyárak csak külön rendelésre szállítják a szükséges rádiófrekvenciás egységeket). A spektrumok kiértékelése könnyebb, mint a protonnál, ugyanis a fluor-fluor és fluor-proton kapcsolási állandók viszonya a kémiai eltolódásokhoz kisebb (kevésbé komplex, tagoltabb spektrumot eredményezve).

Tipikus fluor spektrumot ábrázol a 39. ábra: $(CF_3)_2CFBr$ esetében 56,4 MHz frekvenciával felvéve. A feltüntetett eltolódás értékeket a fluor rezonancia technikában gyakran használt referens anyagtól, a CF_3COOH vonalától számítjuk.

Bór

Bár mindkét, a természetben előforduló bór izotóp mágneses, a nagyfelbontású mérések szempontjából a ^{11}B-et kell előnyben részesíteni, mert előfordulása 81,4% és mágneses momentuma is nagyobb. Relatív érzékenysége is kedvező, így már 5 mm-es mintatartócsövekkel is jól mérhető jelet ad. Kvadrupólmomentuma nem szélesíti túlságosan a jelet, de kis kapcsolási

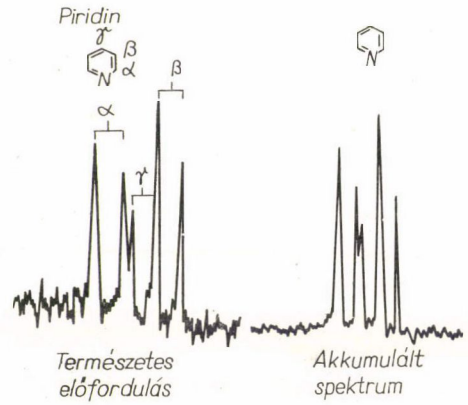


40. ábra

állandók már nem mérhetőek. A jelszélesedés sokszor a folyékony bórvegyületek nagy viszkozitásából származik, iners oldószerrel segíthetünk rajta. Referens anyagul metilborát szolgálhat. A 40. ábra illusztrálhatja a mondottakat, ahol $NaBH_4$ spektrumát láthatjuk 32,083 MHz-en.

Szén

A ^{13}C az egyetlen mágneses szén izotóp, amely a természetben megtalálható. Annak ellenére, hogy előfordulási százaléka alacsony, relatív NMR érzékenysége kicsi és relaxációs ideje is túl hosszú, számos szerző kielégítő nagyfelbontású spektrumot közölt természetes előfordulásban is. Igen nagy segítség e szempontból a spektrum akkumuláció használata (l. a 41. ábrán a természetes előfordulásban és 32-szeres akkumulációval felvett piridin ^{13}C spektrumot!).



41. ábra

A kis természetes előfordulás előnye ugyanakkor, hogy igen kis valószínűséggel épül be szomszédos szénatomként két ^{13}C-mas mag, így a ^{13}C spektrumokban a szén-szén spin-spin csatolással nem találkozunk, hacsak nem dúsított izotóp került beépítésre. Ezért a spektrumok nem tartalmaznak multipleteket, pusztán a kémiai eltolódások alapján értékelendők.

Szénvázak szerkezetének felderítésére nagy előnnyel használható a szén rezonancia technika. Nagyon érzékeny az elektronszerkezet kis változásaira. Karbonil gyök kimutatása például infraspektroszkópiával elvégezhető, de nehéz eldönteni, hogy ketonról vagy észterről van-e például szó. A magrezonancia könnyen eldönti az ilyen jellegű problémát.

Az előforduló kémiai eltolódások 350 ppm-ig terjednek, a proton-szén spin-spin kapcsolási állandók értéke 120—270 Hz között mozog.

Meg kell említenünk, hogy a ^{13}C-mal való kölcsönhatás a protonspektrumban is megfigyelhető. Az izotóp tracer technika szempontjából kedvező a ^{13}C, mivel már pár százalékos dúsításban is könnyen megkülönböztethető a jelzett vegyület.

Deutérium

A deutérium rezonanciánál a szénhez hasonló kedvezőtlen előfordulás és relatív érzékenységgel kell számolnunk, amit még a kvadrupólmomentum okozta vonalszélesedés is súlyosbít. Ezért természetes előfordulásban még kis molekulák esetében sem használható könnyen. Mindez nem jelent azonban hátrányt, mivel a deuterálás viszonylag könnyen elvégezhető, és dúsított vegyületekhez is könnyű már hozzájutni.

A vonalak kiszélesedése következtében a deuteron-deuteron kapcsolási állandók nem figyelhetők meg (0,5 Hz alatti értékkel rendelkeznek, míg a vonalvastagság 0,5 Hz vagy annál nagyobb).

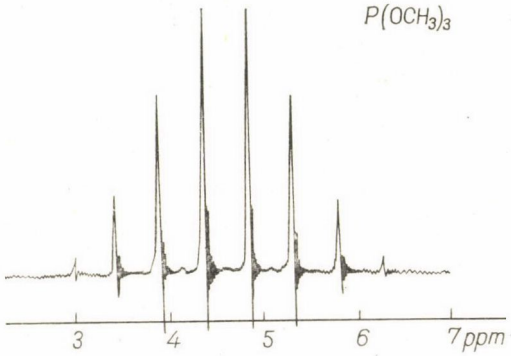
A deuterium rezonancia nagy előnye, hogy a kémiai eltolódás értékek igen pontosan megegyeznek a proton spektroszkópiában találtakkal, tehát az összes táblázatok használhatóak, ami ismeretlen szerkezet esetén jelentős előny, továbbá a deuteron-proton kapcsolása állandók értéke arányos a proton-proton kapcsolásokkal, az arányossági tényező 1/6,5. Emiatt a proton spektrumokban is jól megfigyelhető a deuterálás hatása, de ez természetesen nem pótolhatja minden esetben a deuterium rezonancia használatát.

Előnyösen használható a deuteriumrezonancia technika cserefolyamatok megfigyelésénél, valamint a deuteráltság helyének és mértékének meghatározására, különösen akkor, amikor a spektrumvonalak kis változása a protonspektrumban még nagy hibával lenne csak észlelhető.

A proton és deuteron eltérő relaxációs viszonyai miatt egyazon anyagban — a relaxációs idő alkalmas beállításával — elérhető a protonok lecsatolása, miközben a deuteron vonalak alig szélesednek ki.

Foszfor

A feles spinű ^{31}P 100%-os előfordulásával és 6,64%-os relatív érzékenységével már a proton mintákhoz hasonló méretek mellett is lehetővé teszi a mérést (mintegy 0,05 M koncentrációnál, azonban kvantitatív mérésekhez ennek hússzorosa szükséges). Az eltolódások 500 ppm-ig terjednek és a relaxációs viszonyok is kedvezőek, így mind a minta térfogatának, mind a rádiófrekvenciás térnek a növelésével javítható a jel/zaj viszony.



42. ábra

A foszfor rezonancia egyre nagyobb elterjedését nagy részben a foszfátok biológiai szerepének és a szervetlen foszfor tartalmú polimérek iránti érdeklődésnek köszönheti. A 42. ábra a trimetilfoszfit 40,479 MHz-es spektrumát tünteti fel. A metoxi csoportok kilenc protonjával való kapcsolás okozza a felhasadást.

Oxigén

A ^{17}O izotóp az egyetlen nem zérus spinű oxigén izotóp. $^5/_2$-es spinje, mintegy 4%-nyi természetes előfordulása és kvadrupólmomentuma következtében mérése nehézkes és az irodalomban nem túl sok publikációban találkozunk vele. Fontossága azonban mind a szervetlen, mind a szerves kémiában nagy, ezért fejlődés várható e téren is.

Különösen nagy jelentőségű a nem proton rezonancia munka szempontjából a nagy mágneses terek alkalmazása, amely a szupravezető mágnesek elterjedésével válik egyre inkább lehetővé (50—60 kgauss). A relatív érzékenység ugyanis — mint láttuk — a térerő négyzetével nő. A mérések ekkor konstans térben és más-más frekvencián kell történjenek (az 5—220 MHz tartományban).

Szélessávú magrezonancia spektroszkópia

A nagyfelbontású spektroszkópiával ellentétben, a szélessávú magrezonancia mérésnél nem lehetséges a különböző kémiai eltolódású magok

megkülönböztetése, mert a jel szélessége rendszerint túlságosan nagy ehhez (10—5000 mgauss). *Szilárd minták* jeleit tanulmányozzuk a szélessávú technikával, ahol a többé-kevésbé *rögzített szerkezet* határozza meg a vonalvastagság és relaxációs idők értékeit.

A szélessávú magrezonanciás mérések a kisebb felbontási igény (10^{-6}—10^{-5}) miatt időben megelőzték a nagyfelbontású technikát (1948—54), és impulzus módszerekkel kiegészítve (spin-echo) mindmáig nélkülözhetetlenek az alábbi területek vizsgálatánál:

szilárd testek szerkezeti analízise,
fázis átmenetek vizsgálata,
hibahelyek kristályokban,
molekuláris mozgások fellépése (poliméreknél is),
fémek, fémorganikus vegyületek vizsgálata,
kvadrupól effektusok,
adszorbciós és katalízis problémák, kristályvizet tartalmazó anyagok,
nedvességtartalom-mérés (szerves anyagokban, mikroorganizmusokban is).

A protonrezonancia spektroszkópia eddig áttekintett fogalmai segítségével könnyen leírhatók a fenti alkalmazások közös elvi alapjai. Részletes tárgyalásukat illetően az irodalomra utalunk [6, 7]. A felvételi technikát az apparatív részben érintettük. Hozzá kell még tennünk, hogy a kristályokban fellépő anizotrópia miatt a méréseket sok esetben a mágneses térhez képest több különböző irányítás mellett kell végeznünk, hogy a szögfüggésben rejlő információt kiértékelhessük. A szélessávú technika további jellegzetessége, hogy a rezonancia feltételt a különböző magokra tág határok között változtatható frekvenciával és térrel állítjuk be (a homogenitási és stabilitási követelmények is mintegy három nagyságrenddel szerényebbek itt).

1. *Vonalvastagság*

Az egymás közelében levő mágneses magok dipól-dipól kölcsönhatása (lásd (10)) és a környezettel való kölcsönhatás eredményezi a vonalak kiszélesedését. Ez utóbbi lehet ismét dipól-dipól csatolás útján, vagy elektromos kvadrupól kölcsönhatás következtében. Az elektronok által közvetített spin-spin csatolásnak általában kisebb szerepe van. A feles spinű magoknál (nem lévén kvadrupól kölcsönhatás) a dipól-dipól jelleg dominál. A továbbiak általában diamágneses anyagokra vonatkoznak, nem tárgyaljuk a paramágneses atomok, ionok és ferromágnesek esetét, melyek általában a Fermi-kontakt kölcsönhatás révén csatolnak és a vonalak helyét is eltolhatják (Knight-eltolódás pl.).

A dipól-dipól kölcsönhatás az egyik magnak a másik helyén létrehozott lokális tere által írható le:

$$E = -(\mu_2 \cdot \mathbf{H}_{loc}) = \frac{\gamma^1 \gamma^2}{r_{12}^3} \hbar^2 \left[\mathbf{I}_1 \cdot \mathbf{I}_2 - 3 \frac{(\mathbf{I}_1 \cdot \mathbf{r}_{12})\,(\mathbf{I}_2 \cdot \mathbf{r}_{12})}{r_{12}^2} \right] \qquad (10)$$

Gyakran előfordul, hogy a szilárd testekben a magok relatíve izolált csoportokban találhatók (a magspinek a csoporton belül lényegesen közelebb vannak, mint a csoportok egymáshoz képest), így például zérus magspinű, kristályvizet tartalmazó anyagokban. Mivel a dipól-dipól kölcsönhatás a távolsággal erősen csökken, e kis csoportok első közelítésben különálló rendszereknek tekinthetők. Rögzített rács esetén kiszámítható a csoportok geometriai elrendeződésétől függő vonalalak. Néhány jellegzetes esetben multiplettszerű vonalszerkezetet kapunk, a megfigyelt vonalalakból így visszafelé szerkezeti következtetést tehetünk, a vonalak távolságából pedig atomtávolságokat számolhatunk. Így például két azonos atomból álló csoport esetén a lokális tér értéke

$$H_{loc} = \pm \frac{3\gamma h}{4r^3} (3 \cos^2 \Theta - 1)$$

Egy adott szögnél tehát két átmenetet észlelünk, ezek távolsága — egykristályt vizsgálva — a mágneses térrel bezárt szöggel a fenti kifejezés szerint változik, tehát az r vektor irány és nagyság szerint meghatározható. Például szolgálhat a gipszkristály, $CaSO_4 \cdot 2\,H_2O$. Itt a Ca, S és O elemek nagy gyakorisággal előforduló izotópjai nem mágnesesek, tehát a vízmolekulák protonjait mérhetjük magrezonanciával. Ezek helyzetére és távolságára utal a dublettvonal. A mérés eredményéből 1,58 Å adódott (PAKE, 1948).

A relatíve izolált csoportok spektrumát a többi csoport hatása csupán kevéssé szélesíti ki. Ha azonban a relatíve izoláció nem áll fenn, általában csak egy széles sávot mérhetünk, melyet Van Vleck nyomán az alább definiált momentumaival jellemezhetünk:

$$\langle \Delta H^n \rangle = \frac{\int (H - H_0)^n g(H)\, dH}{\int g(H)\, dH}$$

ahol $g(H)$ az abszorpciós vonal alakja. A sok-spin kölcsönhatásból eredő spektrumok momentumai a kristályszerkezet függvényében elméletileg számíthatók, valamint megfordítva, sok esetben a mérésekkel a kristályszerkezet meghatározható. Por alakú mintákban a második momentum alapján egy ismeretlen magtávolságot értékelhetünk ki, vagy dönthetünk a molekula szerkezeti alternatívái között.

A *kvadrupól kölcsönhatás* kristályokban szögfüggő vonalfelhasadáshoz vezet — amennyiben ez a kölcsönhatási energia a Zeeman-energia perturbációjának tekinthető. A felhasadás homogén térgradiens esetén multiplett vonalstruktúraként figyelhető meg, ellenkező esetben lényeges vonalszélesedést okozhat. Por alakú mintákban páros magspin esetén rendszerint a kiszélesedés miatt a vonal intenzitása beleveszik a zajba.

Mivel köbös szerkezetnél a szimmetria miatt nem léphet fel térgradiens és így kvadrupól kölcsönhatás sem — ha a magok momentuma egyébként ezt lehetővé tenné —, az esetleg mégis megfigyelhető kvadrupól effektus feltétlenül rácshibákra utal, illetve ezek vizsgálatát teszi lehetővé.

2. *Molekuláris mozgások megfigyelése. Mozgási keskenyedés*

Szilárd testek nagy részénél megfigyelhető, hogy a magrezonancia jel szélessége a hőmérséklet csökkentésével lépcsőzetesen változva nő egy értékig, amely azután már állandó marad a további hűtés esetén is. Nyilván ez utóbbit kell a merev rácsnak megfelelő vonalszélességül tekintenünk, a lépcsőszerű változást pedig belső szabadsági fokok befagyása okozza, amint ezeket egyéb szerkezetvizsgálati vagy spektroszkópiai módszerekkel igazolni lehetett. A belső molekuláris mozgás (szabad vagy gátolt forgás, libráció, alagút-átmenet, öndiffúzió) a rezonancia vonalak keskenyedésében nyilvánul meg, ha a mozgás következménye a $(3\cos^2\vartheta - 1)$ kifejezés ϑ szögének átlagolódása bizonyos tartományokban a mérés körülményeivel megszabott kellő rövid idő alatt. A kellő rövid idő a makroszkopikus mágnesezettség fázismemóriájára utal (lásd a tranzverzális relaxációnál mondottakat), azaz a lokális terek okozta inhomogenitással felírható

$$T_2 = \frac{1}{\gamma H_{loc}}$$

érték jellemzi.

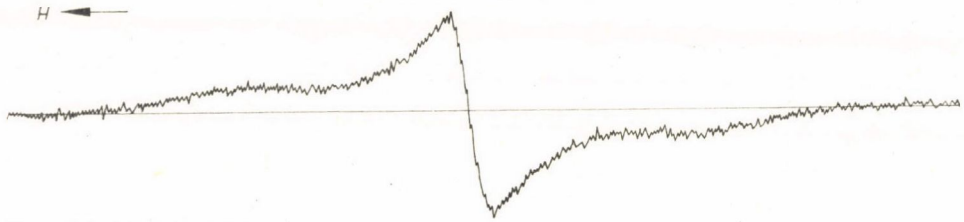
A vonalszélesség keskenyedésén kívül a belső molekuláris mozgások hatása a longitudinális T_1 relaxációs időt is befolyásolja. A reorientáció ugyanis hőmozgás eredménye, ezért frekvenciája

$$f = f_0 e^{-V/RT}$$

alakban írható (egyfajta folyamat esetén). A spin-rács relaxációért felelős fluktuáló mágneses terek Larmor-frekvenciás komponensének intenzitása erősen függ f-től: a relaxáció meggyorsul, ha f a Larmor-frekvencia közelébe eső érték. T_1 hőmérséklet-függését mérve, az f kifejezésében szereplő V aktivációs energia pontosan mérhető.

Így például kristályos benzolban 85°K és az olvadáspont között a molekuláris mozgás frekvenciája 10 kHz—100GHz tartományban változik, V értéke 3,7 kcal/mol (ez a hatfogású tengelyre vonatkozó reorientáció gátja). Hasonló gondolatmenettel, de a spektrum második momentumának csökkenésével mérve, állapították meg, hogy a szilárd ciklohexánban két kristályos módosulat van; 90°K felett, a puhábbik módosulatban már megindul a szék-szék átmenet jellegű mozgás.

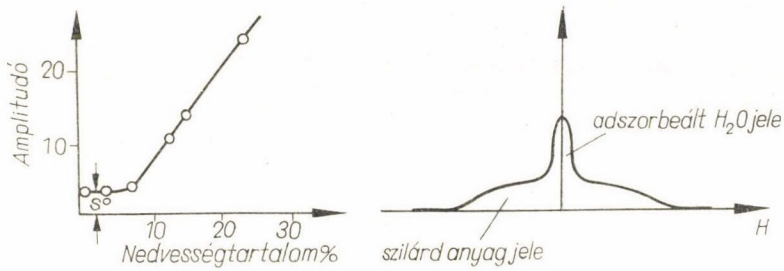
Egy másik példa lehet kristályos és amorf módosulat egyidejű jelenlétének kvantitatív meghatározása. Így polietilénben a mozgékony részek



43. ábra

szűkebb jele szuperponálódik a merev, kristályos tartomány széles jelére A kristályosodási arány területméréssel megadható (43. ábra).

Hasonló módszerrel mérhető nedvességtartalom is. Az adszorbeált jel keskeny vonalként figyelhető meg 4—5% nedvességtartalom felett, melynek



44. ábra

területe lineárisan nő a nedvességtartalommal. Az egyéb módon beépült víz, illetve hidrogéntartalom széles háttér-jelként jelentkezik (44. ábra). Szárított élelmiszerek, élesztő stb. esetén is alkalmazható e módszer.

IRODALOM

Kézikönyvek, monográfiák, spektrumatlaszok a magrezonancia spektroszkópia területéről.

1. ANDREW, E. R.: Nuclear Magnetic Resonance, Cambridge Univ. Press, New York (1955).
2. LÖSCHE, A.: Kerninduktion, VEB Deutscher Verlag d. Wissenschaften, Berlin (1957).
3. POPLE, J. A., SCHNEIDER, W. G. and BERNSTEIN, H. G.: High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance, McGraw-Hill, New York (1959).
4. JACKMAN, L. M.: Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry, Pergamon Press, London (1959).
5. BHACCA, N. S. and WILLIAMS, D. H.: Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry, Holden-Day, San Francisco (1964).
6. ABRAGAM, A.: The Principles of Nuclear Magnetism, Oxford Univ. Press, Oxford (1961).
7. SLICHTER, C. P.: Principles of Magnetic Resonance, Harper and Row, New York (1963).
8. WIBERG, K. B. and NIST, B. J.: Interpretation of NMR Spectra, Benjamin, New York (1962).
9. NACHOD, F. C. and PHILLIPS, W. D. Ed.: Determinations of Organic Structures by Physical Methods, Vol. II. Acad. Press, New York (1962).
10. EMSLEY, J. W., FEENEY, J. and SUTCLIFFE, L. H.: High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, I., II. köt. Pergamon Press, London (1966).
11. WAUGH, J. S. Ed.: Advances in Magnetic Resonance, I. és II. köt. Academic Press (1965—67).
12. EHRENBERG, A., MALMSTRÖM, B. G., VÄNNGARD, T. Ed.: Magnetic Resonance in Biological Systems, Pergamon, London (1967).
13. High Resolution NMR Spectra Catalog, Varian Ass. Palo Alto (1963). I. és II. köt.
14. High Resolution NMR Spectra, Japan Electron Optics Laboratory Co., Tokyo (1967). I., II. és III. köt.

AZ ELEKTRON SPIN REZONANCIA SPEKTROSZKÓPIA ALAPJAI

RADICS LAJOS és NESZMÉLYI ANDRÁS

MTA Központi Kémiai Kutató Intézete, Budapest

Bevezetés

Az elektron spin rezonancia (ESR) spektroszkópia elektronoktól származó paramágnesesség vizsgálatára alkalmas spektroszkópiai módszer. Mint ismeretes, az elektron paramágnesesség meglehetősen gyakran előforduló anyagi tulajdonság. Ezt mutatják egyebek között a „szabad" vagy párosítatlan elektronú atomok, szabad gyökök, egyes molekulák, mint például az NO, O_2, ClO_2, biradikálisok, a részlegesen töltött belső héjú fémionok (átmeneti fémek, ritkaföldfémek és aktinidák ionjai), a telítetlen vezetési sávval rendelkező fémek és félvezetők, színcentrumok (kristályrácsban rögzített elektronok, ill. lyukak), sugárkémiai defektusok stb.

Az ESR spektroszkópia tárgya e különféle paramágneses rendszerek erős külső mágneses térben megjelenő mágneses energianivóinak kísérleti és elméleti vizsgálata. A kísérleti vizsgálat alapjául a paramágneses rezonancia jelensége szolgál.

Az első sikeres elektronrezonancia kísérletet kereken két évtizeddel ezelőtt valósították meg (ZAVOISZKIJ, 1944). Az ötvenes évek elején megindult kiterjedt kutatói munka nyomán világossá vált, hogy az elektron paramágneses rezonancián alapuló spektroszkópiai módszer korszerű apparatúra kialakításával rendkívül hasznos és különösen a kémiai és biológiai kutatásban sokoldalúan alkalmazható vizsgálati módszerré válhat. E feltételezés helyességét az elmúlt évtized eredményei messzemenően igazolták.

Az ESR spektroszkópiának mint vizsgálati módszernek jelentősége két alapvető körülményből adódik. Az első ezek közül tisztán technikai jellegű. Nevezetesen az, hogy a korszerű ESR spektrométerek kedvező kísérleti körülmények között már igen kisszámú, $5 \cdot 10^9$— $5 \cdot 10^{10}$ paramágneses részecske/minta esetén is lehetővé teszik a paramágnesesség kimutatását. Ez rendkívül nagy fontosságú lehet például kémiai, biológiai vagy katalitikus folyamatok paramágneses köztitermékeinek (gyököknek, gyök-ionoknak stb.) reakció közben történő tanulmányozása esetén.

A másik tényezőnek sokkal mélyrehatóbbak az okai. A paramágneses rendszerekben az ESR által vizsgált mágneses energianivók a mindenkori elektronenergia függvényei. A paramágnesességet okozó párosítatlan elektro-

nok energiája viszont a részecskén belül fellépő, valamint a részecskéknek egymás közötti és környezetükkel létesített elektrosztatikus és mágneses kölcsönhatásai folytán a szabad részecske energiájához képest kisebb-nagyobb mértékben módosul. E kölcsönhatások energiája nagyságrendileg a 10^{-3}—10^{-8} eV ($2 \cdot 10^{-2}$— $2 \cdot 10^{-7}$ kcal/Mól) tartományba esik és ugyanakkor messzemenően specifikusak egy adott rendszerre nézve, annak molekula-, kristályszerkezeti, valamint egyéb belső tulajdonságaival állnak szoros összefüggésben. Az ESR spektrumok tanulmányozása útján sok esetben lehetőség nyílik e kölcsönhatások mennyiségi azonosítására, és ezen keresztül hasznos felvilágosítást szerezhetünk a vizsgált paramágneses rendszer bennünket érdeklő tulajdonságaira vonatkozóan. Szemléletesen kifejezve, a paramágneses tulajdonságot hordozó elektronok az ESR kísérleti körülményei között úgy viselkednek, mint a vizsgált rendszerbe beépített szubmikroszkopikus detektorok, amelyek rendkívül érzékenyen reagálnak környezetükre, valamint környezetükben bekövetkező kismértékű változásokra és erről a spektrométer segítségével tájékoztatják a megfigyelőt. Érdemes megemlíteni, hogy éppen azt a szemléletes elvet valósítja meg az utóbbi időben — elsősorban biológiai alkalmazások céljaira — kifejlesztett ún. spin-jelzési (spin-labelling) technika.

A következőkben röviden áttekintjük az ESR módszer elméleti és kísérleti alapjait, valamint alkalmazásának jelentősebb módozatait. Tekintettel arra, hogy az ESR módszernek speciálisan biológiai területeken nyert felhasználásával külön előadás foglalkozik (l. 355. old), ehelyütt főként az általános elméleti és kísérleti kérdésekkel foglalkozunk. A tárggyal közelebbről megismerkedni kívánók számára több kiváló monográfia áll rendelkezésre (l. irodalomjegyzék). Némelyek ezek közül (10—12) a biológiai kutatás szempontjainak szem előtt tartásával íródtak.

A szabad elektron paramágneses rezonanciája

Az elektronrezonancia spektroszkópia elmélete és kísérleti megvalósítása sok közös vonást mutat az előbbiekben megismert magrezonancia spektroszkópiával. A módszer alapjául szolgáló fizikai jelenség, a paramágneses rezonancia ebben az esetben is külső mágneses tér és rádiófrekvenciás elektromágneses sugárzás együttes hatására következik be. Az alapvető eltérés abban áll, hogy a rezonancia atommagok helyett az ugyancsak mágneses tulajdonságú elektronok részvételével valósul meg. További különbséget jelent még az, hogy rezonancia jelenséget csak a paramágnesességet okozó, párosítatlan elektronok mutatnak, valamint az is, hogy az elektronok mágneses tulajdonsága nem csupán spinjüknek, hanem pályamozgásuknak is következménye.

Az elektron mágneses momentuma μ töltésének, valamint mechanikai, azaz pálya- és pörgőmozgásának (spinjének) velejárója. Tapasztalat szerint

a mágneses momentum a megfigyelés szempontjából úgy viselkedik, mint az elektron mechanikai momentumával párhuzamos (de azzal ellentett irányú) vektor. Ennek megfelelően, a kvantummechanika formalizmusa szerint az elektron mechanikai momentumából egyszerű tényezővel állítható elő:

$$\mu_j = -\gamma j \hbar \tag{1}$$

ahol j az elektron teljes (pálya + spin) momentuma, γ a mechanikai és mágneses momentum viszonyát kifejező, ún. giromágneses faktor. A kétfajta momentumot összekapcsoló egyenlet másik szokásos alakja:

$$\mu_j = -g(|e|\hbar/2mc)j = -g\beta j \tag{2}$$

Itt β a Bohr-féle magneton és g a momentumok arányát e/2mc egységekben mérő spektroszkópiai felhasadási tényező vagy röviden csak „g-faktor". Utóbbinak az értéke tisztán pályamágnesesség esetén (s = 0) 1, spinmágnesesség esetén (l = 0) pedig 2 (ill. a relativisztikus korrekció figyelembevételével 2,0023). Így az elektron pálya- és spinmozgásához tartozó mágneses momentumok külön-külön:

$$\mu = -\beta l \qquad \mu_s = -2\beta s \tag{3}$$

Ha a vizsgált részecske több elektront tartalmaz (paramágneses atom, ion stb.) az elektronok egyedi l, s és j momentumai helyett azok együttes viselkedését jellemző *eredő* (a Russel—Sanders-féle csatolási szabályok értelmében levezethető) **L**, S és **J** = **L** + **S** momentumait kell figyelembe venni. A részecske teljes mágneses momentumát most is az előzőekhez hasonló módon kapjuk meg, azaz:

$$\mu_J = -g\beta J \tag{4}$$

ahol most g az optikai spektroszkópiából ismert Landé-féle tényező:

$$g = \frac{3}{2} + \frac{S(S+1) - L(S+1)}{2J+1} \tag{5}$$

A bevezetőben felsorolt paramágneses rendszerek közös jellemzője, hogy részecskéiknek párosítatlan elektronjuk, azaz eredő, kompenzálatlan μ_J mágneses momentumuk van. Ha az ilyen részecskéket tartalmazó anyagmintára nem hat külső mágneses tér, az elektronok mágneses momentuma a térben tetszőleges irányt vehet fel. Ilyenkor az elektronok energiája, beleértve a mágneses energiát is, azonos, a rendszer eredő mágneses momentuma zérus.

Ha viszont a párosítatlan elektronokat tartalmazó részecskéket valamely **H** erősségű, stacionárius (egyenáramú) mágneses térbe helyezzük, a külső tér kölcsönhatásba lép az elektronok mágneses momentumával. A kölcsönhatás

az elektronok potenciális energiájának megváltozását vonja maga után. A változás nagyságát a térerősségtől és a részecske mágneses momentumától függő

$$E = (\mu_J \cdot H) = g\beta(J \cdot H) = g\beta J \cdot H\cos\Theta = g\beta m H \qquad (6)$$

kölcsönhatási energia szabja meg, ahol Θ a mágneses momentum és a külső tér által bezárt szög, m mágneses kvantumszám, azaz $g\beta m$ a mágneses momentumnak a tér irányában mért vetülete. Mivel a kölcsönhatási energia nem lehet tetszőleges, az elektronok mágneses momentuma a külső mágneses térhez viszonyítva csak meghatározott irányokban helyezkedhet el, vagyis a külső tér az elektronok mágneses momentumaira „rendezőleg" hat. A mágneses térhez való megengedett „beállások" száma egyenlő az m kvantumszám lehetséges értékeinek ($J-1, J-2 \ldots -J+2, -J+1, -J$) számával, azaz $2J+1$-gyel. Mivel az egyes beállási irányokhoz különböző energiák tartoznak, a mágneses térbe helyezett párosítatlan elektronok számára az eredeti egyetlen energiaszint helyett $2J+1$ számú, egymástól egyenlő távolságra elhelyezkedő nivó (Zeeman-nivó) áll rendelkezésére. Az egymás után következő nivók közötti energiakülönbségre:

$$\Delta E = g\beta H \qquad (7)$$

összefüggés adódik, vagyis az elektron mágneses nivói közötti távolság a külső mágneses térerősséggel egyenesen arányos. Az elmondottakat a legegyszerűbb paramágneses részecskék, a szabad elektronok esetére ($L = 0$, $S = 1/2$, $m = \pm 1/2$) az 1. ábra szemlélteti.

Érdemes megvizsgálnunk, hogy a szabad elektronok hogyan oszlanak meg az 1. ábrán feltüntetett két energiaszint között. Ha feltételezzük, hogy az elektronok („spinrendszer") termikus egyensúlyban állnak környezetükkel (az ún. „ráccsal"), a nivók benépesítésére érvényesnek tekinthetjük a Boltzmann-eloszlást. Az energetikailag magasabb és alacsonyabb nivók benépesítésének aránya:

$$\frac{n_{+1/2}}{n_{-1/2}} = \exp(-\Delta E/kT) \qquad (8)$$

Közepes nagyságú (3000 gauss) mágneses teret véve alapul, az állandók behelyettesítésével az energiakülönbségre

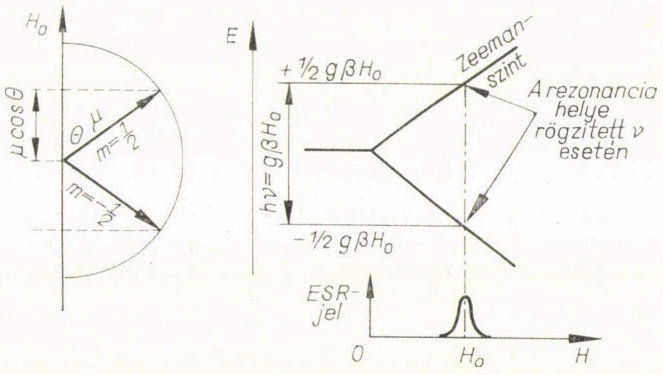
$$\Delta E \approx 10^{10}\ \text{Hz} \approx 0{,}3\ \text{cm}^{-1} \approx 4 \cdot 10^{-5}\ \text{eV} \approx 1\ \text{cal/mól}$$

adódik, azaz nem túlságosan alacsony hőmérsékleteken a termikus energiánál mintegy 2—3 nagyságrenddel kisebb mennyiség. Szobahőfokon a fenti benépesítési arányra 0,9984 adódik, vagyis az alacsonyabb nívó részecske-többlete mindössze 0,15%. A nivók közötti csekély energiakülönbség és az ezzel járó

csaknem egyenletes részecskeeloszlás jellemző az ESR spektroszkópiára és ugyanúgy, mint a magrezonanciánál láttuk, több alapvető következménnyel jár. Ezek elsősorban a módszertani sajátságokban nyilvánulnak meg.

Az ESR spektroszkópia alapját képező fizikai jelenség, az elektron paramágneses rezonancia akkor következik be, ha a mágneses tér hatásának kitett paramágneses részecskékkel, adott esetben a szabad elektronokkal a $\Delta E = h\nu$ összefüggésnek megfelelően

$$\nu = g\beta H/h \tag{9}$$



1. ábra. A szabad elektron mágneses momentumának orientációja külső mágneses térben a szabad elektron Zeeman-szintjei és a rezonancia feltétel

frekvenciájú elektromágneses sugárzást közlünk. A sugárzási tér mágneses komponense ekkor kölcsönhatásba lép az elektronok mágneses momentumával, és ennek eredményeként a rendelkezésre álló mágneses nivók között spektrális átmenetek indukálódnak, vagyis az alacsonyabb energiaszinten elhelyezkedő elektronok a sugárzási térből energiát vesznek fel, és megváltoztatva mágneses momentumuk irányát az energetikailag magasabb állapotba mennek át. Ugyanekkor a magasabb energiaszinten tartózkodó elektronok az elektromágneses tér hatására indukált emisszió útján elvesztik az alacsonyabb nivóhoz viszonyított energiatöbbletüket.

A paramágneses részecskék és az elektromágneses sugárzás közötti kölcsönhatás a frekvencia és a mágneses tér egy adott értékpárjánál rezonanciaszerűen következik be. Ez azt jelenti, ha a paraméterek egyikét — a frekvenciát vagy a külső mágneses tér erősségét — rögzítjük, a másikat (tehát megfelelően a mágneses teret, ill. a frekvenciát) egyenletesen változtatva végig haladunk a (9) feltétel kis környezetén, és egyúttal valamilyen módon mérjük a bekövetkező spektrális átmenetek számát, a szabad elektronok esetében az 1. ábrán látható tipikus rezonancia görbét kapjuk. A görbe maximuma a (9)-et pontosan kielégítő ν_0 és H_0 értékpárnál jelentkezik, vagyis amikor az elektromágneses sugárzás frekvenciája egybeesik (rezonanciába kerül) a részecskék „sajátfrekvenciájával" (Larmor-frekvencia, l. a magrezonanciáról szóló fejezetet).

A paramágneses részecskék indukált átmeneteinek kísérleti megfigyelése több módon is lehetséges aszerint, hogy a rezonanciajelenség bekövetkezését milyen makroszkopikus anyagi tulajdonság megváltozásán keresztül, milyen méréstechnikai elv szerint követjük. Legáltalánosabban a nagy érzékenységet biztosító és viszonylag könnyen megvalósítható abszorpciós technika terjedt el.

Ennélfogva ESR spektroszkópián azt a kísérleti módszert szokás érteni, amely a Zeeman-nivók közötti átmeneteket az indukáló sugárzási térből való energiafelvétel mérése útján tanulmányozza. A Zeeman-nivók csaknem egyforma benépesítettsége folytán a méréshez szükséges stacionárius abszorpció fenntartása néhány, a magrezonanciánál ismertetett szempont figyelembevételét teszi szükségessé. A rezonanciafeltétel teljesülésekor bekövetkező átmenetek mindkét formája, az indukált abszorpció és emisszió valószínűsége egyenlő. Emiatt mérhető makroszkopikus energiafelvétel a sugárzási térből kizárólag az alacsonyabb energiaszint benépesítési többletének „rovására" történhet. Ahhoz tehát, hogy az abszorpció stacionáriussá váljon, szükséges, hogy a magasabb nivóra került részecskék számára az indukált emisszión kívül egyéb út is rendelkezésükre álljon, amely által elveszthetik energia-feleslegüket, és így a mindenkori egyensúlyi eloszlás létrejöjjön. Ellenkező esetben a kezdeti energiafelvétel a nivók benépesítésének gyors kiegyenlítődését és a mérhető abszorpciós effektus megszűnését okozná. A nivók benépesítésének kiegyenlítődése *telítési effektus*, az egyensúlyi részecskeeloszlást biztosító energiaátadási folyamat pedig *relaxáció* néven ismeretes.

A relaxáció legkézenfekvőbb útja az, amikor a sugárzási térből felvett energia a paramágneses részecske hőenergiájává alakul át. Az energiaátadás eredményessége a spinrendszer és a rács közötti kapcsolat erősségétől függ. Ennek mennyiségi jellemzője a relaxációs folyamatok reciprok sebességi állandója, az ún. *spin-rács relaxációs idő* (T_1). Nagysága a relaxáció konkrét mechanizmusától és a vizsgált rendszer sajátságaitól függően széles határok között (10^{-10}— 10 s) változhat. A paramágneses relaxáció másik lehetséges — és az előbbivel párhuzamosan megvalósuló — formája az ún. *spin-spin relaxáció;* karakterisztikus ideje T_2 (általában $T_2 \leq T_1$). A felvett energia ennél a relaxációnál a spinrendszeren belül oszlik el.

Kísérleti technika

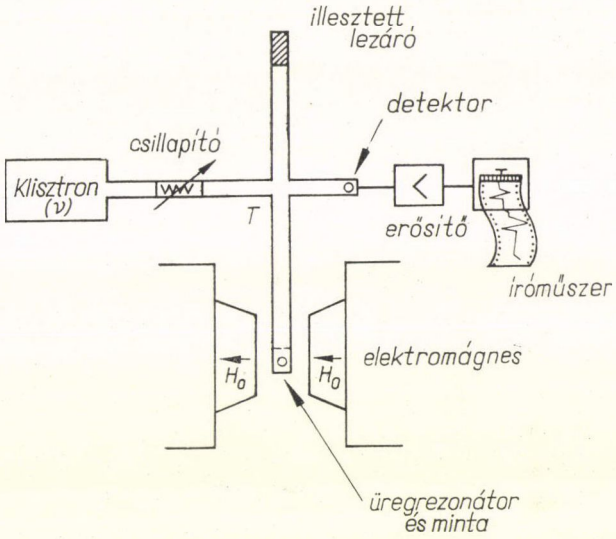
A (9) összefüggésből következik, hogy a paramágneses rezonancia bármilyen frekvenciájú elektromágneses sugárzással megvalósítható, ha az adott frekvenciához előírt H külső mágneses tér biztosítva van. Tisztán spin-mágnesességű, szabad elektronok esetében (g = 2) az állandók behelyettesítésével a (9) egyenletet számszerűen is felírhatjuk:

$$\nu(\text{MHz}) = 2{,}80255\text{H (gauss)}$$

vagy általában:

$$\nu(\text{MHz}) = 1{,}4011\text{gH (gauss)}$$

Az abszorpciós effektus, és ezzel a mérés érzékenysége, annál nagyobb, minél nagyobb a Zeeman-nivók közötti energiakülönbség, azaz minél nagyobb az alkalmazott mágneses térerősség. Ilyen meggondolásokból kiindulva a korszerű ESR készülékekben 3 000—25 000 gauss nagyságú mágneses tereket és a hozzájuk tartozó 10^{10}— 10^{11} Hz frekvenciatartományba eső centiméteresre —



2. ábra. Egyszerű ESR spektrométer elvi felépítése

milliméteres mikrohullámokat alkalmaznak. Leggyakoribb frekvencia és mágneses tér értékpár (szabad elektronra vonatkoztatva): 9400 MHz és 3300 gauss.

Az elektronrezonancia jelenség tanulmányozására alkalmas ESR spektrométer a következő fő részekből áll: 1. cm-es rádióhullámokat adó sugárforrás; 2. a vizsgált mintát magábafoglaló abszorpciós cella, mely a minta helyén nagy mikrohullámú térerőt biztosít; 3. kellő nagyságú stacionárius mágneses teret létesítő elektromágnes; 4. detektor, amely méri a mintában bekövetkező mikrohullámú abszorpciót és végül 5. a detektorból kijövő jelek erősítésére és regisztrálására alkalmas elektronikus berendezés. A felsorolt funkcionális egységeket tartalmazó spektrométer gyakorlati kivitelét vázlatosan a 2. ábra mutatja. A készülék működési elve a következő: A sugárforrásból — klisztronból (a radar technikában használatos mikrohullámú oszcillátor) — kijövő és csillapító által szabályozott mikrohullámú energia a mikrohullámok vezetésére alkalmas csőtápvonalon át az ún. mágikus T szerelvénybe jut, mely az energiát két egyenlő részre osztja. Az energia egyik része a mágneses térben elhelyezett és az abszorp-

ciós cella szerepét betöltő üregrezonátorba jut, másik része pedig az ú. n. illesztett lezáróban elnyelődik. A mágikus T tulajdonképpen mikrohullámú hídnak fogható fel, amely abban az esetben, ha az üregrezonátorban nincs abszorpció, a detektáló kristályra nem juttat teljesítményt (a híd egyensúlyi állapotban van). Az üregrezonátor (általában réztömbből kimunkált henger- vagy tégla alakú üreg) nagy jósági tényezőjű ($Q = \frac{\text{felvett teljesítmény}}{\text{leadott teljesítmény}} = 5000 - 10\,000$) rezgőkör. Ha a vizsgálati mintában abszorpció következik be, az üregrezonátor energiavesztesége megnövekszik, csökken a Q-ja, ezzel együtt változik az üregre, mint rezgőkörrel jellemző mikrohullámú ellenállás, a híd egyensúlya megszűnik és a detektornál az abszorpció mértékével arányos mikrohullámú teljesítmény jelentkezik. Tekintettel arra, hogy az üregrezonátor és a klisztron frekvenciája konstrukciós okok miatt nem változtatható, a rezonancia feltétel teljesítését a mágneses tér megváltoztatásával szokás megvalósítani. Az így kapott jelet a spektrométer a radartechnikából átvett módszerek egyikével felerősíti és azt oszcilloszkóp, vagy pedig folytoníró segítségével regisztrálja. A jelenleg alkalmazott spektrométerek többségénél az íróműszeren — technikai okok miatt — az abszorpciós görbe helyett annak első deriváltja jelenik meg. A korszerű készülékekben ez a jel tetszés szerint integrálható vagy tovább deriválható és így előállítható az abszorpciós görbe vagy annak második deriváltja is.

Az ESR legtöbb alkalmazási területe a spektrométertől nagy felbontóképességet és érzékenységet követel meg. A felbontóképesség iránti igény a klisztron frekvencia-stabilitásának és a mágneses tér homogenitásának valamint stabilitásának általában 10^{-5}— 10^{-6} (relatív) értékre történő együttes növelésével érhető el. A spektrométer érzékenységét számos tényező szabja meg. Ide tartozik — mint láttuk — az alkalmazott mágneses tér erőssége, a minta abszolút hőmérséklete (előbbivel növekszik, utóbbival csökken az érzékenység). Az érzékenység ezenkívül egyenesen arányos a mikrohullámú üreg jósági tényezőjével, valamint az alkalmazott mikrohullámú teljesítmény négyzetgyökével. Számottevő tényezőt jelent továbbá az alkalmazott detektor és az erősítő rendszer zaja is. A jelenleg ismert legjobb ESR spektrométer érzékenysége (szobahőfokon, valamint 1 gauss szélességű vonalat véve alapul) $5 \cdot 10^9$ szabad spin/minta. Ez a szám tovább növelhető az utóbbi években meghonosodott ún. spektrum-akkumulációs (time-averaging) technikával.

Részecskékhez kötött elektronok paramágneses rezonanciája

A fenti elméleti meggondolások során abból a feltételezésből indultunk ki, hogy a paramágneses tulajdonságot hordozó párosítatlan elektronok szabadok, azaz sem környezetükkel, sem pedig egymással nem állnak számottevő kölcsön-

hatásban és így energiájukat a mágneses térben a két Zeeman-nivó adja meg. Bár az ilyen, szabad elektronokat tartalmazó paramágneses rendszerek a gyakorlatban is megfigyelhetők, sokkal gyakoribbak azonban az olyan esetek, amikor a fenti egyszerűsítő feltételezések nem teljesülnek. A párosítatlan elektronok ugyanis többnyire delokalizáltak a vizsgált molekulában, kristályban stb., és e delokalizáció során kölcsönhatásba kerülnek a részecskét felépítő atommagok és elektronok mágneses, ill. elektrosztatikus erőterével. Ezek a részecske szerkezetétől függő erőterek megváltoztatják az elektron energiáját és így korábban felírt egyszerű rezonancia-feltétel (9) is módosul. A mágneses terek hatását például úgy képzelhetjük el, hogy azok a külső mágneses tér értékéhez hozzáadódnak és előjelüktől függően annak értékét megnövelik, vagy csökkentik. Az elektrosztatikus erőtereknek (kristálytér, ligand-tér) nincs közvetlen hatásuk az elektron spin-mágneses momentumára. A párosítatlan elektronoknak igen gyakran azonban nemcsak spin-, hanem pálya-momentumuk is van, amely viszont kölcsönhatásba lép az elektrosztatikus terekkel és a spin-pálya kapcsolaton keresztül befolyásolja az elektron mágneses energiáját. A párosítatlan elektron delokalizációja folytán tehát mintegy „letapogatja" a paramágneses részecskében fellépő erőtereket. Nagy általánosságban, a mágneses eredetű kölcsönhatások elsősorban szabad gyökök tanulmányozása szempontjából jelentős, míg az elektrosztatikus hatások főleg kristályrácsban vagy komplexben helyet foglaló paramágneses ionok esetében számottevők. További módosító tényezőkkel kell számolnunk akkor, ha a párosítatlan elektronok például a paramágneses részecskék nagy koncentrációja miatt egymás közelébe kerülnek és egymás energiáját befolyásolják, vagy ha a párosítatlan elektron nem egyetlen részecskéhez kapcsolódik, hanem valamely elektron-átadási folyamat következtében részecskéről részecskére ugrásszerűen helyzetét változtatja.

A párosítatlan elektronok energiáját és ezáltal az ESR spektrumok jellegét meghatározó kölcsönhatások részletes ismertetésétől e rövid áttekintésben el kell tekintenünk. Az alábbiakban bemutatott néhány spektrális tulajdonság elsősorban a ESR spektroszkópia kémiai és biológiai alkalmazása során előforduló rendszerekre jellemző.

Az ESR spektrumok hiperfinom szerkezete

Abban az esetben, amikor a párosítatlan elektron pályája valamely zérustól eltérő mágneses momentumú magot ($\mu_I \neq 0$, pl. ^1H, ^2H, ^{13}C, ^{19}F, ^{31}P stb.) vesz körül, az elektron és a mag mágneses momentuma között mágneses természetű kölcsönhatás lép fel. Ez az ún. hiperfinom kölcsönhatás két, egymástól szétválasztható energia-tagból tevődik össze, nevezetesen a mag és elektron mágneses momentumai között fellépő dipól-dipól (vagy anizotróp) kölcsön-

hatás energiájából (E_{dd}) és az elektronnak a mag körüli egyenletes eloszlásából származó izotróp (vagy Fermi-féle) kontakt kölcsönhatási energiájából (E_k):

$$E_{dd} = g\,\beta\,g_N\,\beta_N \frac{3\cos^2\Theta - 1}{r^3} M_I\,m \tag{10}$$

ahol g_N az adott magra jellemző nukleáris g-faktor, β_N a mag-magneton, M_I a mag mágneses kvantumszáma, r a magot és az elektront összekötő vektor, θ pedig az r és a mágneses tér által bezárt szög. Egy proton esetében, ha az r értékét Å-ben fejezzük ki

$$E_{dd} \sim 28\,\langle 1/r^3\rangle \text{ (gauss)}$$

ahol $\langle 1/r^3\rangle$ a hullámfüggvény szerinti átlagértéket jelenti.

$$E_k = A M_I\,m \tag{11}$$

A az ún. *hiperfinom kapcsolási állandó*. Mivel az E_{dd} nagyságát a magot és az elektront összekötő helyvektornak a külső mágneses térhez viszonyított mindenkori iránya szabja meg, gömbszimmetrikus (s-típusú) atomi vagy molekula pályán tartózkodó elektronok, valamint folyadékfázisban levő gyökök esetében, ahol a részecskék gyors termikus mozgása következtében mindenféle helyzet előfordulhat, a dipól-dipól kölcsönhatás időátlaga zérus ($\ll 1/r^3 \gg = 0$) és így a spektrumban nem jelentkezik. A második — izotróp — energiatag sokkal általánosabb érvényű és a kémiai-biológiai kutatásban leggyakrabban előforduló paramágneses részecskék, a szabad gyökök tanulmányozása szempontjából elsőrendű fontosságú. Ez az energiatag a részecskék mozgása folytán nem átlagolódik ki. Ennek megfelelően az izotróp kölcsönhatásban résztvevő elektron teljes mágneses energiája:

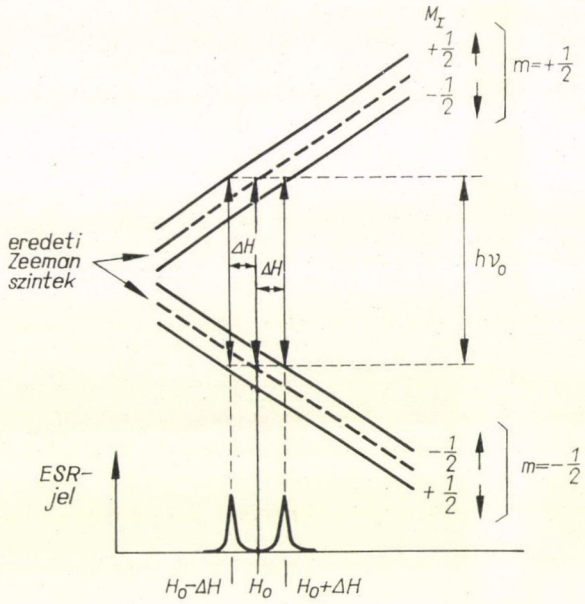
$$\begin{aligned} E &= g\beta m \cdot H + A M_I\,m \\ &= g\beta(H + A M_I/g\beta)\,m \end{aligned} \tag{12}$$

vagyis az izotróp hiperfinom kölcsönhatás egyenértékű a mag által létesített $AM_I/g\beta$ nagyságú lokális mágneses tér hatásával. Az M_I lehetséges értékeinek ($M_I = I, (I-1), (I-2) \ldots -I$), azaz a kérdéses mag mágneses térhez viszonyított lehetséges orientációinak megfelelően az eredeti (6) összefüggés által meghatározott két energianivó helyett $(2S+1)(2I+1)$ számú energianivó jön létre. (Itt feltételeztük, hogy a paramágneses részecske csak egyetlen párosítatlan elektront tartalmaz, azonkívül az elektron mágneses momentuma kizárólag spin mozgásától ered, azaz $S = \pm 1/2$. Ez a helyzet a szabad gyökök nagy többségénél, eltérő viszont a triplet állapotú molekuláknál, fémionoknál stb.)

A fennálló kiválasztási szabályok miatt ($\Delta m = 0, \pm 1, M_I = 0$) a $(2(2I + 1)$ számú nivó között $2I + 1$ számú átmenet valósítható meg és így az egyetlen rezonanciavonal helyett $2I + 1$ számú hiperfinom vonal észlelhető.

A legegyszerűbb gyök, a hidrogénatom esetében ($I = 1/2$, $S = 1/2$) fennálló viszonyokat a 3. ábra szemlélteti. Az egyes hiperfinom vonalakhoz tartozó mágneses tér-értékek az előbbiek szerint

$$H_1 = H_0 - A_H/2g\beta$$
$$H_2 = H_0 + A_H/2g\beta$$



3. ábra. Hiperfinom felhasadás létrejötte egy proton esetén

A két hiperfinom vonal közötti távolság pedig (tetszés szerinti I esetén is):

$$H_{(\text{gauss})} = A_{H(\text{MHz})}/g\,\beta \tag{13}$$

Fermi által elvégzett elméleti számítások szerint az A kapcsolási állandó az

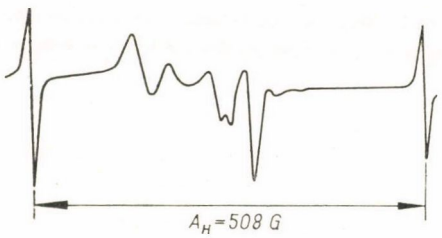
$$A = \frac{8\pi}{3} g_N \beta_N |\psi(0)|^2 \tag{14}$$

alakban írható fel, ahol $|\psi(o)|^2$ a párosítatlan elektronnak a mag helyén vett tartózkodási valószínűsége, más néven a spin-sűrűség. Hidrogénatomok eseté-

ben a kapcsolási állandó értéke könnyen kiszámítható. Az ls párosítatlan elektron hullámfüggvénye

$$\psi(s) = \frac{1}{\sqrt{\pi a_0^2}} e^{-r/a_0}$$

ahol a_0 a Bohr-féle rádius, r pedig az elektron és proton közötti távolság. A mag helyén vett értéket r = 0 helyettesítéssel kapjuk, a megfelelő spinsűrűség értékére pedig (négyzetre emelés után) $1/\pi a_0^2$ adódik. Az állandók behelyettesítésével A értékére 1420 MHz vagy 508 gauss adódik. Az így kapott számított érték kísérletileg is ellenőrizhető. Az ESR módszer érzékenységi követelményének megfelelő koncentrációban a hidrogénatomok előállíthatók a $H_2 + O_2$



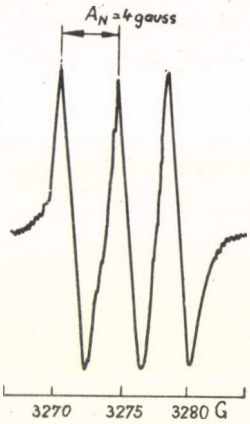
4. ábra. 4,2°K-on besugárzott jég ESR spektruma: a hidrogénatomoktól származó hiperfinom vonalak a spektrum két szélén jelentkeznek

láncreakcióban, továbbá kisülési csőben és a kisülési csőből kiáramló gázok gyors kifagyasztásával (cseppfolyós helium hőmérsékletén, 4,2°K) vagy 4,2°K-ra lehűtött jég besugárzásával. A 4. ábra az utóbbi technikával előállított hidrogénatomok ESR spektrumát tünteti fel. A spektrum közepén elhelyezkedő vonalak a besugárzás során keletkezett egyéb (OH, HO_2 stb.) gyököktől származnak, míg a spektrum bal és jobb szélén jelentkező két éles vonal a hidrogénatomoktól. A kísérletileg mért hiperfinom kapcsolási állandó megegyezik a számított értékkel.

Ha a fenti módszerek valamelyikével deutériumatomokat állítunk elő és felvesszük azok ESR spektrumát, a hidrogénatomokéhoz képest két változást tapasztalunk: a spektrum két vonal helyett három vonalból áll, a vonalak távolságából meghatározható kapcsolási állandó pedig lényegesen kisebb (75 gauss). E változások egyrészt arra vezethetők vissza, hogy a deuteron mágneses kvantumszáma (I = 1) + 1, 0, −1 értékeket veheti fel és emiatt az elmondottak értelmében a lehetséges átmenetek száma kettőről háromra növekedett, másrészt pedig mágneses momentuma a protonénak mintegy 6,5-öd része.

A deutériumatomokéhoz hasonló megjelenésű az ugyancsak I = 1 magspinű ^{15}N nitrogénatomok ESR spektruma. A kisülési csőből kiáramló nitrogén

gáz 4,2° K-ra történő hűtésével stabilizált atomos nitrogénről készült ESR abszorpciós görbét az 5. ábra mutatja. A kísérletileg mért hiperfinom kapcsolási állandó 4 gauss. Az A értékének ekkora csökkenését nem indokolja a ^{15}N kisebb mágneses momentuma (a deutériuménak mintegy harmad része). A jelenség magyarázata az, hogy a nitrogénatom három párosítatlan elektronja (a nitrogén elektron-konfigurációja $1s^2 2s^2 2p^3$) p-típusú atomi pályán foglal helyet. Ezeknek a pályáknak alakja — mint ismeretes — olyan, hogy a mag helyén a hullámfüggvény zérussá válik ($|\psi(o)|^2 = 0$), azaz a hiperfinom kapcsolat a zérus spin-sűrűség miatt nem is jöhetne létre. Az, hogy ennek ellenére a kísérletek véges nagyságú hiperfinom kölcsönhatás megjelenéséről tanúskod-

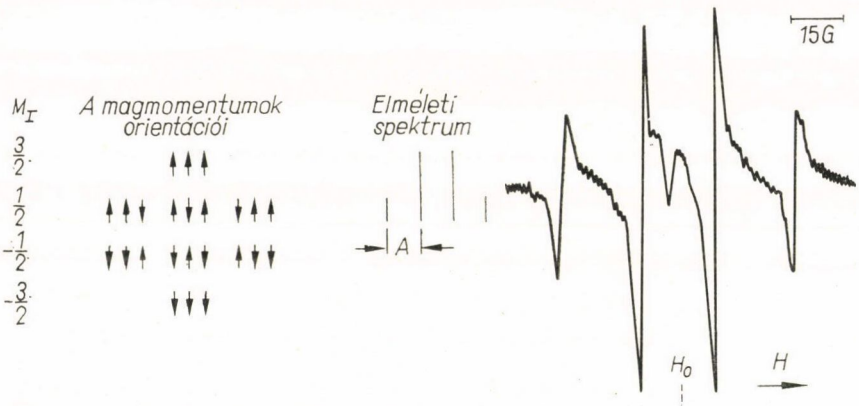


5. ábra. 4,2°K-on kifagyasztással stabilizált nitrogénatomok ESR spektruma

nak, azt jelenti, hogy létezik egy olyan mechanizmus, amely a mag helyén zérustól eltérő spinsűrűséget eredményez olyankor is, amikor a párosítatlan elektronok p- (vagy molekulák esetében π-) típusú pályán tartózkodnak. Ez az elektronkorreláció vagy konfigurációs kölcsönhatás néven ismert mechanizmus igen nagy jelentőségű a szabad gyökök jelentős részénél. Lényege az, hogy a közvetlen hiperfinom kölcsönhatásra nem képes párosítatlan elektronok kisebb-nagyobb mértékben polarizálják a belső, telített héjakon tartózkodó elektronok spinjét. Aszerint, hogy a polarizáció következtében létrejött spinsűrűség milyen orientációjú belső elektrontól származik, megkülönböztetünk pozitív ($S = +1/2$) és negatív ($S = -1/2$) spinsűrűséget. A közvetett kölcsönhatás nagysága ugyanazon atom esetében más lesz, ha megváltozik a vegyérték héjban tartózkodó párosítatlan elektron pályája. Így például a nitrogén tartalmú szabad gyökökben mért A_N kapcsolási állandó a szabad atomban mért értéknél nagyobb és változik aszerint, hogy az adott vegyületben milyen a nitrogén hibridizációja. Ezen az úton az ESR spektroszkópia lehetőséget nyújt arra, hogy a kapcsolási állandó nagyságán keresztül közvetlen felvilágosítást

nyerjünk a kémiai kötésnek az eddig csak elméletileg feltételezett elektron szerkezeti kérdéseiről.

Ha a párosítatlan elektron nem atomi, hanem molekula pályán tartózkodik, és delokalizációja folytán több, mágneses momentummal rendelkező atommaggal léphet hiperfinom kölcsönhatásba, az egyes magok hatásai összegeződnek és ennek megfelelően a fenti energia kifejezésben szereplő AM_IM_S tag helyébe a megfelelő egyedi tagok $A_1M_{I_1}M_S+A_2M_{I_2}M_S+\ldots=\sum_i A_iM_{Ii}M_S$ összegét kell helyettesíteni. Hasonló értelemben módosulnak a hiperfinom vonalak számára vonatkozó összefüggések is. A valóságban több hiperfinom

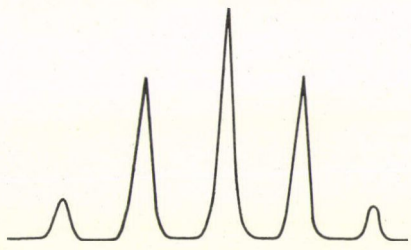


6. ábra. A metil-gyök elméleti és kísérleti ESR spektruma

vonal átfedése miatt a vártnál kevesebb számú vonal jelentkezik a spektrumban, ilyenkor azonban az eredő vonal intenzitása egyenlő az egybeeső vonalak intenzitásának összegével. A spektrum alapján most is könnyen meghatározható A_i értékek viszonya az egyes magok helyén vett spin-sűrűségek arányát fejezik ki, azaz szemléletesen azt, hogy a párosítatlan elektron az adott részecskén belül mennyi időt tartózkodik az egyes magok környezetében. A hiperfinom szerkezet szempontjából egy részecskén belül a magok ekvivalensek, ha kapcsolási állandójuk azonos értékű. N számú ekvivalens proton esetén a spektrumban megjelenő vonalak száma $N+1$, a vonalak intenzitása pedig binomiális együttható szerinti eloszlást mutat. Ez annak a következménye, hogy ekvivalens magok esetében a hiperfinom vonalak számát leíró kifejezésbe az eredő magspinnek $\Sigma I_i = I$ megfelelő M_I mágneses kvantumszámot kell helyettesíteni. Ugyanazon M_I érték az egyes magok orientációjának többféle kombinációjaként is előállítható. A lehetséges kombinációk száma megszabja a megfelelő állapot statisztikus súlyát, azaz a vonal relatív intenzitását.

A három ekvivalens protont tartalmazó metil gyök energia-diagrammját, az egyes vonalakhoz tartozó magorientációk kombinációit és kísérletileg mért

ESR spektrumát a 6. ábra mutatja. A protonok ekvivalenciája annak az általános kémiai tapasztalatnak felel meg, hogy a metil gyök hidrogénatomjai kémiai reakciókban egyformán viselkednek, vagyis a szénatomhoz képest szimmetrikusan helyezkednek el, ezenkívül elektron-környezetük megegyező. Megemlítjük, hogy az ESR spektroszkópia segítségével nemcsak a hidrogénatomok kémiai meggondolások alapján várható ekvivalenciáját lehetett igazolni, hanem el lehetett dönteni azt is, hogy a metil gyök nem piramidális elrendezésű (sp^3 hibridizációjú szénatom), hanem sík térszerkezetű, vagyis a centrális szénatom hibridizációja sp^2. Ez a párosítatlan elektronnak ^{13}C izotóppal ($I = 1/2$) jelzett metilgyökben mért hiperfinom kapcsolási állandójából következett. A mért kapcsolási állandó $A_{13_C} = 43$ gauss értéke igen kicsiny az sp^3 hibridizáció esetén várható kapcsolási állandóhoz képest (300 gauss), ami arra mutat, hogy a



7. ábra. A *p*-benzo-szemikinon ESR spektruma (abszorpciós görbe)

párosítatlan elektron a metil-gyökben gyakorlatilag tisztán π szimmetriájú molekulapályán tartózkodik és a hiperfinom kölcsönhatás emiatt a nitrogénatom esetében ismertetett közvetett úton valósul meg.

Hasonlóan közvetett úton valósul meg a hiperfinom kölcsönhatás aromás gyökök esetében, aholis a párosítatlan elektron π-szimmetriájú molekulapályán delokalizálódik. A biológiai kutatások szempontjából fontos aromás gyök, a hidrokinon alkalikus oxidációja során köztitermékként keletkező p-benzoszemikinon ESR spektrumát a 7. ábra tünteti fel. A spektrum vonalainak száma és a vonalak intenzitásának binomilis eloszlása (1: 4: 6: 4: 1) arra mutat, hogy az aromás gyűrű négy hidrogénatomja mágnesesen ekvivalens, vagyis a párosítatlan elektron a szokásos írásmóddal ellentétben nem lokalizálódik az egyik oxigénatomra, hanem a molekulán belül a hidrogén-atomokra nézve szimmetrikus molekulapályán tartózkodik. A kapcsolási állandó nagysága mindössze 2,37 Gauss, vagyis a hidrogénatomok esetében mért értéknek 2,37/508 = 0,4%-a. Az aromás gyökökön végzett kísérleti és elméleti vizsgálatok lehetővé tették, hogy a gyűrű hidrogénatomjaira talált kapcsolási állandóból egyszerű összefüggés segítségével ki lehessen számítani a spin-sűrűség értékét a megfelelő gyűrű szénatomokon. Az összefüggés alakja:

$$A_i = -Q\varrho_{Ci} \qquad (15)$$

ahol A_i a hidrogénatom kapcsolási állandója gauss-ban kifejezve, Q = 23 gauss, ϱ_{Ci} pedig a párosítatlan elektron spin sűrűsége a kérdéses szénatomon. A benzoszemikinon példájánál maradva azt találjuk, hogy az egyes szénatomokon a spin sűrűség értéke 2,37/23 = 10%, más szóval az adott gyök esetében a párosítatlan elektron mintegy 60%-ban az aromás gyűrű szénatomjai által kialakított π-típusú molekulapályán tartózkodik.

A 8. ábra egy másik érdekes szabad gyök, a biológiailag fontos diacetil kondenzációja során átmenetileg keletkező 2,5-dimetilparabenzoszemikinon spektrumát mutatja. Érdemes rámutatni, hogy e gyök képződését már korábban is feltételezték a kondenzációs folyamat értelmezése kapcsán, közvetlen

8. ábra. A diacetil alkalikus kondenzációja során keletkezett 2,5-dimetil-*p*-benzo-szemikinon gyök-ion ESR spektruma. A hat metil- és két gyűrű-hidrogénnel történő hiperfinom kapcsolás következtében a spektrum 21 vonalat tartalmaz

kimutatására azonban csak az ESR módszer adott lehetőséget. A spektrumban hét vonalcsoport azonosítható, melyek mindegyike további három vonalra hasad fel. A szóban forgó gyök képletéből kiindulva a spektrum hozzárendelése könnyen elvégezhető: a nagyobb kapcsolási állandóval jellemzett szeptett hat ekvivalens protontól, nyilvánvalóan a két metil-csoport hidrogénatomjaitól, a kisebb kapcsolási állandójú triplet-felhasadás pedig az úgyszintén ekvivalens gyűrű protonoktól származik. Míg a spin-sűrűség megjelenése az aromás gyűrű hidrogénatomjain az ESR spektroszkópiát megelőző elméletek alapján nem volt várható, a gyűrűhöz kapcsolódó metil csoport hidrogénatomjainak hiperfinom kölcsönhatása a párosítatlan elektronnal tulajdonképpen közvetlen fizikai bizonyítéka a már korábban feltételezett hiperkonjugációnak, ami a molekulapálya elmélet szerint oly módon jön létre, hogy a metilcsoport hidrogénjeinek 1s atomi pályája átfedésbe kerül az aromás gyűrű π molekulapályájával.

Az elmondottak alapján megállapíthatjuk, hogy az ESR spektrumok hiperfinom szerkezetének tanulmányozása értékes adatokat szolgáltathat szabad gyökök, és más gyök-jellegű vegyületek elektronszerkezetének, kötéstípusainak, téralkatának tanulmányozására. Mivel a kapcsolási állandó közvetlen számszerű értéket szolgáltat a párosítatlan elektron delokalizációjára,

tartózkodási valószínűségére a molekula egyes atomjainak környezetében, érthető, hogy e módszer kiválóan alkalmas a molekulák elektronszerkezetét megadó elméletek kísérleti ellenőrzésére, ezen keresztül pedig tökéletesítésére. Így például a molekulák elektronszerkezetének leírásánál jelenleg elterjedten használt elektron-korreláció, valamint a negatív spin-sűrűség fogalmának bevezetését az ESR spektrumok értelmezése tette szükségessé.

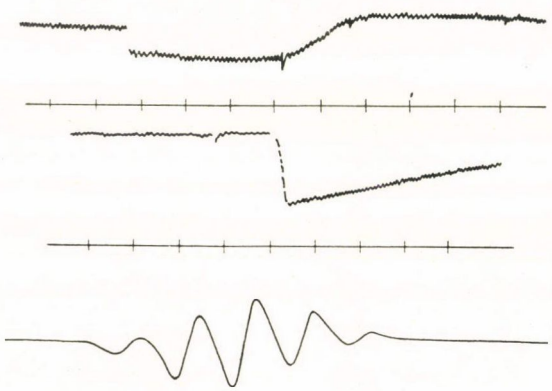
Szabad gyökök részvételével lejátszódó folyamatok vizsgálata ESR módszerrel

Nem kisebb fontosságú, természetesen, az ESR módszernek gyakorlati felhasználása olyan rendszerek tanulmányozásában, amelyekben fizikai, kémiai vagy biológiai folyamatok során köztitermékként szabad gyökök vagy gyökjellegű molekulák (gyök-ionok, biradikálisok, triplet állapotú molekulák) keletkeznek. Igen gyakran már magának a paramágneses köztitermék megjelenésének is döntő jelentősége lehet valamely feltételezett mechanizmus alátámasztására vagy elvetésére, a spektrumok hiperfinom szerkezete pedig ezen túlmenően értékes iránymutatást adhat a köztitermék gyök kémiai szerkezetére vonatkozóan.

Az elmondottakból következik, hogy az ESR módszer azáltal, hogy a paramágneses részecskékre nézve messzemenően specifikus, más módszerekkel ellentétben egyszerű lehetőséget biztosít gyökök keletkezésére vezető vagy gyökök részvételével lejátszódó folyamatok követésére, kinetikájának meghatározására. Olyan esetekben, amikor a kérdéses reakció lassú és a keletkező gyökök stacionárius koncentrációja elegendően nagy az ESR módszer érzékenységéhez képest, vagy a gyökök képződési sebessége a meghatározandó, (mint például a fotokémiai, sugárkémiai defektusok tanulmányozása esetében) az ESR egyszerűen mint analitikai módszer (kvalitatív és kvantitatív) alkalmazható.

A köztitermékként keletkező szabad gyökök nagy reakciókészségük miatt általában — különösen folyadék fázisú rendszerekben — igen nagy sebességgel továbbreagálnak, ezért élettartamuk és stacionárius koncentrációjuk néha olyan kicsiny lehet, hogy az egyébként rendkívül érzékeny ESR módszer érzékenységének alsó határát nem éri el (10^{-10}— 10^{-8} Mól/l). A stacionárius gyökkoncentráció megnövelése céljából sok esetben eredményesen alkalmazhatók a különböző ismert gyökstabilizálási eljárások (befagyasztás; olyan adalékanyagok (gyökbefogók) hozzáadása a rendszerhez, amelyek a gyökökkel reagálva stabilis szabad gyökök képződéséhez vezetnek; a reakció közegének alkalmas megváltoztatása stb.). Ezek a módszerek, amelyek tulajdonképpen drasztikusan beleavatkoznak a gyökös folyamat lefutásába, értelemszerűen nem használhatók olyan esetekben, amikor éppen a kérdéses folyamat időbeni lefutásának meghatározása képezi a vizsgálati feladatot. Ilyenkor gyakran

eredményesen használható az a technikai fogás, hogy a reagáló komponensek áramló folyadékok formájában, külön-külön jutnak el a mérőcelláig, aholis gyors és eredményes keverés után reakcióba lépnek. Az áramlási sebesség nagyságának alkalmas megválasztásával elérhető, hogy a kontakt idő megegyezzék a gyökök élettartamával és így a stacionárius koncentráció kellő nagyságú legyen. Egészen gyors reakcióknál alkalmazható a „megállított áramlás" (stopped flow) módszere, amikor az áramlási és keverési sebesség olyan nagy, hogy a komponensek nem tudnak reagálni. A reakció az áramlás hirtelen leállítása után indul meg, a keletkező gyökök koncentrációjával arányos jel

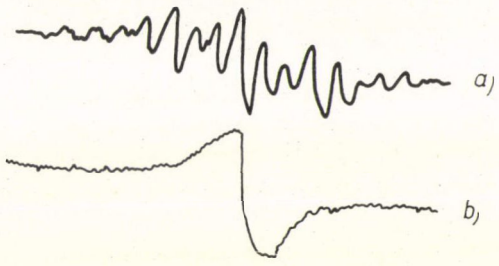


9. ábra. Reakciósebesség mérése „stopped-flow" módszerrel. A felső két görbe a jel intenzitásának változását mutatja az idő függvényében, az időtengely beosztása 1 s. Áramlás esetén a jel amplitudója zérus. Az áramlás megszakításakor a jel-amplitudó a gyökképződési reakció sebességének megfelelően növekedni kezd, majd a kiindulási anyag elfogyásával lassan csökken

oszcilloszkópra vihető és a kinetikai görbe közvetlenül értékelhető. Egy ilyen példát mutat a 9. ábra.

Az imént felsorolt alkalmazási lehetőségek elsősorban abban térnek el az egyéb konvencionális módszerekétől, hogy az ESR spektroszkópia rendkívül érzékeny és specifikus paramágneses részecskékre nézve. Teljesen sajátos azonban az ESR spektroszkópia alkalmazása olyan reakciók sebességének meghatározásánál, amelyek a párosítatlan elektron átadását eredményezik egy másik, diamágneses molekulának. A mérési elv itt ugyanaz, mint amit a protonok cseréjével kapcsolatban a magrezonancia spektroszkópiai részben ismertettünk: amiatt, hogy a párosítatlan elektron tartózkodási ideje egy részecskében lerövidül, a határozatlansági reláció értelmében csökken az elektron energiájának definiálhatósága, a rezonanciavonal kiszélesedik. Ha az elektronátadási folyamat ugyanazon molekula diamágneses és gyökös formája között megy végbe, és a gyök ESR spektruma hiperfinom szerkezetet mutat, az elektron energiájának határozatlansága a hiperfinom vonalak elmosódását eredményezi. A jelenség oka szemléletesen úgy képzelhető el, hogy a hiperfinom kölcsönhatást okozó

magok a gyök és a diamágneses formában eltérően orientáltak (pl. $M_I = +1/2$ és $-1/2$) a külső mágneses térhez képest. A párosítatlan elektron cserélődése során hol ilyen, hol olyan orientációjú mag hatását érzékeli és így a spektrumban a kétféle értelmű hiperfinom kölcsönhatás átlaga jelentkezik. A vonalak megváltozásából közvetlenül meghatározható a csereakció sebességi állandója. Az ilyen módon mérhető sebességi állandók a 10^6— 10^8 l · mól^{-1} · s^{-1} tartományba esnek. A 10. ábra egy tipikus elektronátadási reakció esetét mutatja be. Jól látható a kiindulási naftalin negatív gyök-ion 25 hiperfinom vonalat tartalmazó spektruma (4 ekvivalens α + 4 ekvivalens β proton, azaz 5×5 hiperfinom vonal), valamint a diamágneses naftalin hozzáadására bekövetkező elektronátadási reakció okozta vonalszélesedés.



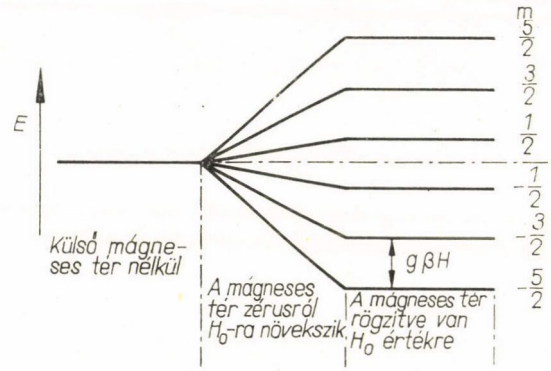
10. ábra. A $C_{10}H_8 + Li = C_{10}H_8^- + Li^+$ reakcióban keletkező naftalin negatív gyök-ionok ESR spektruma: a) naftalin felesleg nélkül és b) naftalin felesleggel. A tetrahidrofuránban mért reakció sebessége $5 \cdot 10^8$ liter · mól^{-1} · s^{-1}

Paramágneses fémionok elektronrezonanciája. Az ESR spektrumok finomszerkezete

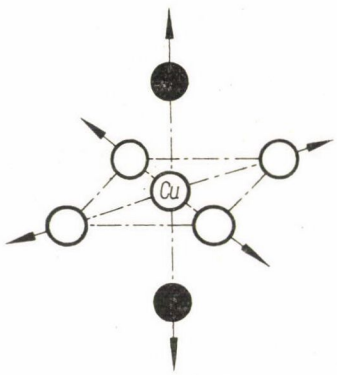
A szabad elektronok paramágneses rezonanciájára elmondottak igen könnyen kiterjeszthetők a szabad paramágneses fémionok esetére. Az egyedüli, amit figyelembe kell vennünk az, hogy a fémionok mágneses momentumát az elektronok eredő (teljes) impulzusmomentuma $\mathbf{J}$ határozza meg. A külső mágneses tér hatására megjelenő $2J + 1$ ekvidisztáns Zeeman-nivók száma az optikai alaptermből közvetlenül meghatározható. A rezonancia feltételben szereplő g-faktor értékét annak (5) egyenlettel megadott általános alakjából lehet levezetni, amiből kiadódik egy adott frekvenciához tartozó mágneses tér érték. Így például a $^2D_{5/2}$ alapállapotú szabad Cu^{2+} ion, melynek Zeeman-nivóit a 11. ábra tünteti fel, g faktorára 6/5 (1,2) adódik, azaz a rezonanciafeltétel teljesítéséhez (egy adott frekvencián) a szabad elektron esetében szükséges mágneses térerősségnek csaknem kétszerese szükséges.

A gyakorlatban található paramágneses rendszerekben fémionok nem fordulnak elő szabad állapotban, hanem vegyületeik, komplexeik stb. alakjában, vagy pedig kristályrácsba beépítve, ill. oldószermolekulákkal körül-

véve. A kémiai környezet, a szomszédos atomok elektronfelhője által létesített elektrosztatikus erőtér (kristály-tér, ligand-tér) jelentős változást eredményez a szabad ion elektronrezonanciájához képest. Így például az előbbi réz(II) ion elektronrezonanciája $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ vegyületben közel a szabad elektronéval megegyező mágneses térben jelentkezik (ugyancsak azonos frekvenciát tételezve fel), azaz g-faktora közel 2. A jelenség magyarázata az, hogy az iont körülvevő



11. ábra. A $^2D_{5/2}$ alapállapotú szabad Cu^{2+}-ion Zeeman-szintjei

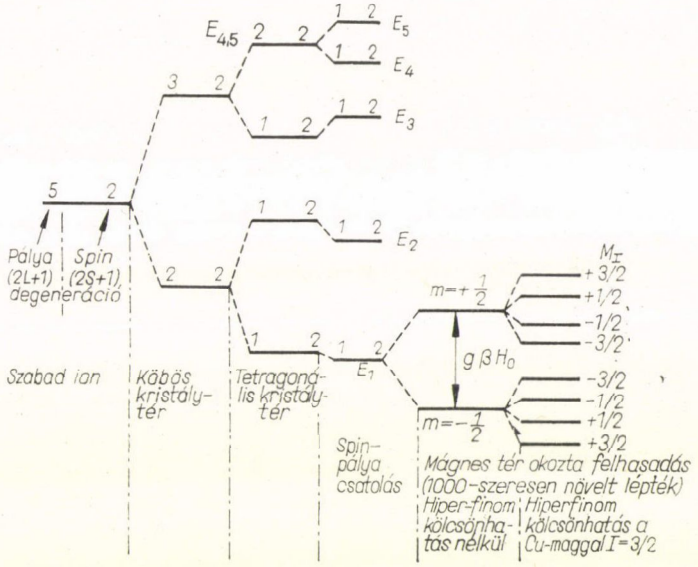


12. ábra. A Cu^{2+}-ion elhelyezkedése a $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ kristályrácsban. (A befeketített karikák az oxigénatomokat, az üresek a vízmolekulákat jelölik; a nyilak a megfelelő elektron-dipólus momentumok irányát mutatják)

töltések (l. pl. 12. ábra) létrehozta elektromos tér Stark-effektus útján az ion természetétől függően lazítja, vagy teljesen megszünteti a spin és pályamomentum közötti kapcsolatot.* Ennek következtében a szabad ion alapnivója felhasad, és az ion természetétől, valamint az erőtér erősségétől és szimmetriájától függő pálya nivórendszer alakul ki, amelyek közötti távolság mintegy ezer-

* Ez a helyzet tulajdonképpen a szabad gyökök esetében is. Itt a spin-pálya kapcsolat gyakorlatilag teljes megszűnéséért a kovalens kötések rendkívül erős elektromos tere a felelős.

szerese a mágneses tér okozta felhasadásnak. Mivel az elektrosztatikus tér nem lép kölcsönhatásba az elektron spinjével, a benépesített alsó nivó spin szerinti degenerációja továbbra is fennmarad. Az ilyen részecske paramágneses rezonanciáját vizsgálva azt tapasztaljuk, hogy az eredeti alaptermnek megfelelő J impulzusmomentum helyett az elektron mágneses momentumát és így a Zeeman-nivók számát elsősorban a spin szabja meg. A kristálytér hatásának illusztrálása céljából a 13. ábrán bemutatjuk a réz (II) ion energianivóit köbös- és tetragonális szimmetriájú környezetben.



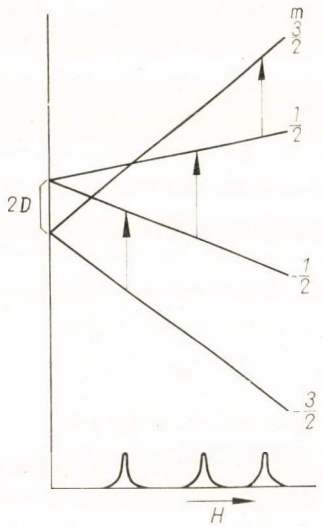
13. ábra. A Cu^{2+}-ion elektron-nivójának felhasadása erős kristály- és mágneses térben. (A mágneses tér okozta felhasadást csak a betöltött legalsó nivóra tüntettük fel, valójában a többinél is bekövetkezik, ezek azonban benépesítés hiányában normális hőmérsékleteken a rezonancia jelenség szempontjából nem jönnek számításba)

A kristálytér hatása ezenkívül a g-faktor értékében is megnyilvánul, ami annak a következménye, hogy az elektron spinje és pályamomentuma közötti kapcsolat, ha kis mértékben is, de a nivók felhasadása után is fennmarad. Az eredő g-faktor értékét a fennmaradó spin-pálya kapcsolat erőssége, pályanivók és a kristálytér okozta felhasadásának viszonya szabja meg. A g-faktor ilyenkor még anizotróppá is válik, azaz különböző irányokban mérhető értéke a kristálytér erősségének és szimmetriaviszonyainak függvénye. Az előbbi réz(II)-szulfát példájánál maradva, a g-faktor értékét, aszerint, hogy a két oxigénatom által definiált szimmetriatengely mentén vagy arra merőlegesen mérjük (pl. a mágneses térhez képest alkalmasan elhelyezett monokristályban) a következő kifejezések adják meg (az E_i mennyiségek a 13. ábra szerinti jelölésben):

$$g_{II} = 2\left[1 - \frac{4\lambda}{E_3 - E_1}\right]$$

$$g_{\perp} = 2\left[1 - \frac{\lambda}{E_{4,5} - E_1}\right]$$

Olyan ionok esetében, amelyek eredő spinje meghaladja az 1/2 értéket, a kristálytér már zérus mágneses térben is felhasadást okozhat. Ilyenkor a Zeeman-nivók relatív elhelyezkedése megváltozik, mégpedig oly módon, hogy egy adott frekvenciaértéknél a rezonancia feltétel több mágneses térértéknél



14. ábra. Az S = 3/2 spinű paramágneses ion Zeeman-szintjei a kristály-tér szimmetria tengelyével párhuzamos mágneses térben mérve. A függőleges nyilak a rezonancia átmeneteket jelölik egy adott frekvenciaérték esetében

is bekövetkezhet. Az axiális szimmetriájú kristálytérbe helyezett 3/2 spinű ionnak mágneses energiadiagrammját a szimmetriatengely irányában a 14. ábra tünteti fel. (A kristálytér okozta felhasadás miatt ezen az ábrán csak a spintől származó nivókat tüntettük fel, a pályanivók csak a g-faktoron keresztül érezteti hatásukat.) Az ábrán 2D-vel jelölt mennyiség az ún. zérus-tér-felhasadás, a három lehetséges átmenetnek megfelelő vonal pedig a spektrum finomszerkezete. A finomszerkezet mindhárom komponense további felhasadást mutathat az ion mágneses magjával, azaz a spektrum finomszerkezeten túlmenően hiperfinom vonalakat is tartalmazhat.

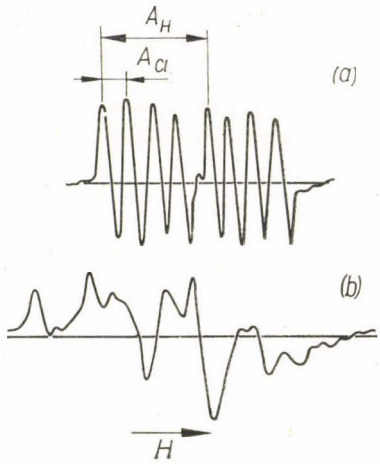
E rövid ismertetés összefoglalásaként azt a megállapítást tehetjük, hogy a paramágneses fémionok elektronrezonanciája segítségével betekintést nyerhetünk az iont körülvevő környezet szimmetriaviszonyaiba, a környezet és az

ion közötti kémiai kapcsolat természetébe, felvilágosítást kaphatunk a kémiai kötés típusára, erősségére. Ha pedig a fémion valamilyen folyamat eredményeképpen megváltoztatja környezetét, az ESR módszer lehetőséget nyújt a folyamat követésére, sebességének meghatározására, valamint az új környezet kémiai és fizikai jellemzésére.

Anizotrópia, paramágneses részecskék közötti kölcsönhatás és vonalalak

Mind a hiperfinom, mind pedig a finomszerkezet ismertetésénél utaltunk arra, hogy a kölcsönhatást leíró energiatag egy része iránytól függő, anizotróp mennyiség. Láttuk azt is, hogy hatásuk részben megszüntethető oly módon, hogy a paramágneses részecskék számára szabad mozgást biztosítunk, azaz folyadékfázisú rendszerben tanulmányozzuk őket. Ez a lehetőség azonban a gyakorlatban nem minden esetben áll fenn, részben azért, mert ilyen körülmények között a vizsgálni kívánt paramágneses részecskék nem életképesek (mint például a szabad gyökök többsége), részben pedig azért, mert a vizsgálati feladat éppen szilárdfázisú rendszer tanulmányozását kívánja meg (pl. sugárhatási effektusok, fémionokat tartalmazó szilárd anyagok stb.). Ilyenkor az ESR spektrumban az iránytól függő paraméterek (g-faktor, hiperfinom kölcsönhatási állandó, zérus-tér-felhasadási tényező stb.) valamennyi tér iránynak megfelelő értékükkel jelentkeznek, ami — érthető módon — meghatározásukat jelentősen megnehezíti. E probléma néha megkerülhető, ha gondoskodunk arról, hogy a vizsgált mintában valamennyi paramágneses részecske rendezetten helyezkedjék el. Ez a helyzet áll elő például akkor, ha a részecskék monokristályba ágyazottan fordulnak elő. Az egykristályt a mágneses tér irányához képest forgatva és az egyes forgatási helyzetben a rezonancia görbét felvéve a kérdéses paraméterek, valamint azoknak a kristály szimmetriatengelyeire vonatkoztatott főértékei pontosan meghatározhatók. Az amorf, ill. a polikristályos mintákra jellemző rezonanciagörbékre mutat tipikus példát a 15. és 16. ábra. Az egyik esetben (15) a hiperfinom köcsönhatás anizotrópiájának hatását láthatjuk a polikristályos monoklórecetsav besugárzása útján előállított $\dot{C}ClHCOOH$ spektrumán. Összehasonlításképpen feltüntettük ugyanezen gyökről a mágneses térhez képest alkalmasan beállított monokristályban készült ESR spektrumát is. (A spektrum nyolc hiperfinom vonala egy protonnal és a 3/2-es spinű klóratommal való kölcsönhatástól származik.) A 16. ábra pedig a g-faktor anizotrópiáját szemlélteti egyszerű (finom, ill. hiperfinom felhasadás nélküli) rezonancia vonalat adó minta esetében, amikor a paramágneses részecske hengerszimmetrikus kristálytérben foglal helyet. Az egyes részecskék rendszertelen orientációja miatt a spektrumban egyetlen vonal helyett aszimmetrikus dublet jelentkezik. A g-faktor két főértéke az ábrán feltüntetett módon határozható meg.

Mindeddig a paramágneses részecskéket izoláltaknak képzeltük el. Ez a feltételezés gyakran helytálló, mint például szabad gyökök, ionok stb. híg oldataiban, diamágnesesen hígított paramágneses kristályokban. Igen gyakran azonban a paramágneses részecskék viselkedése nem tárgyalható a részecskék egymással való kölcsönhatásának figyelembevétele nélkül. Ezek a kölcsönhatások elsősorban a rezonanciagörbék alakjában nyilvánulnak meg. Néhány, a vonalalakot befolyásoló tényezővel már eddig is találkoztunk. Ide sorolandók (az egykristályok speciális esetétől eltekintve) az imént tárgyalt anizotrópia

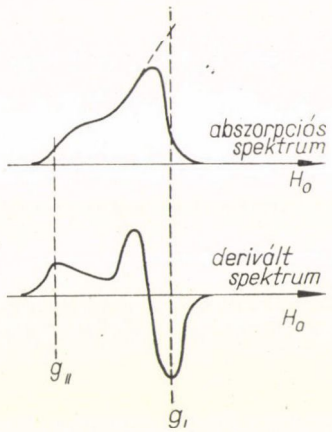


15. ábra. Besugárzott szilárd monoklór-ecetsav ESR spektruma: a) a külső mágneses térhez képest megfelelően irányított egykristályban, b) polikristályos mintában mérve

esetei, valamint a korábban említett gyors elektron átadási reakciókat kísérő vonalszélesedési effektus. Paramágneses részecskéket nagy koncentrációban tartalmazó rendszerek esetében e hatásokon kívül számottevő lehet még az elektronok közötti dipól-dipól, valamint az úgynevezett elektron kicserélődési kölcsönhatás.

A párosítatlan elektronok között fellépő dipoláris spin-spin kölcsönhatás jellegére nézve hasonló a magspin-elektronspin közötti dipól-dipól kölcsönhatáshoz, és ugyanúgy vonalszélesedésre vezet, azonban, tekintettel az elektronok nagyobb mágneses momentumára, az előbbinél lényegesen hatásosabb. Ezt a körülményt bizonyos mértékig az kompenzálja, hogy az elektronok egymás közötti távolsága nagyobb, mint az elektron és a környező magok közötti távolság. Az elektronok közötti dipól-dipól kölcsönhatás befolyása, mivel nagysága a távolság harmadik hatványával arányosan csökken, a paramágneses részecskék koncentrációjának csökkentésével gyengíthető, illetve teljesen ki is küszöbölhető.

Ha a vizsgálati minta a paramágneses részecskéket igen nagy koncentrációban tartalmazza és emiatt a szomszédos részecskék olyan közel kerülnek egymáshoz, hogy párosítatlan elektronjuk hullámfüggvényei átfedik egymást, a részecskék között elektron csere folyamat indulhat meg. Az így kialakuló csereréakció sebességétől függően az eredeti rezonancia görbe alakja megváltozik: kisebb sebességek esetén (10^7— 10^8 s^{-1}) a vonalszélesség megnövekszik (ehhez hasonló esetet láttunk a paramágneses és diamágneses naftalin közötti elektron átadási reakcióval kapcsolatban), míg a szilárd fázisban könnyen megvalósuló 10^{10} s^{-1}, vagy annál nagyobb sebességek a vonalszélesség erőteljes



16. ábra. Polikristályos paramágneses mintában jelentkező egyedi abszorpciós görbe és annak deriváltja hengerszimmetrikus g-faktor esetében

csökkenését vonják maguk után. A vonalszélesség megváltozásából számszerű következtetéseket lehet levonni az elektron kicserélődési folyamat sebességére, ami igen gyakran hasznos felvilágosítást jelenthet a vizsgált rendszer tulajdonságaira vonatkozóan. Érdemes megemlíteni, hogy a kicserélődési kölcsönhatás okozta vonalkeskenyedés egyes esetekben kompenzálja, vagy túlkompenzálhatja a dipoláris elektron spin-spin kölcsönhatás okozta vonalszélesedést.

Teljes általánosságban az elektronrezonancia görbék szélességét (ha eltekintünk a készülék által esetlegesen fel nem bontott hiperfinom komponensektől vagy telítési effektus által okozott vonalszélesedéstől) a párosítatlan elektron mágneses állapotának élettartama szabja meg. Minél rövidebb az adott élettartam, annál kevésbé definiálható az elektron energiája, azaz annál szélesebb a rezonancia vonal. A korszerű kísérleti technika általában lehetőséget ad arra, hogy a vonalszélességet meghatározó kölcsönhatásokat azonosítsuk és így betekintést nyerhessünk a vizsgált rendszer azon jellemzőibe, amelyek befolyásolják az elektron energia átadását, akár a környezetnek (rácsnak), akár pedig a többi paramágneses részecskének (spinrendszernek). E vizsgálatok általában a relaxációs idők mérésen keresztül valósíthatók meg, és bár több-

nyire speciális apparatúrát igényelnek, térhódításuk a kémiai és biológiai kutatások terén, a „konvencionális" ESR módszer mellett jelentősen megnövekedett (l. pl. [12]).

IRODALOM

Kézikönyvek, monográfiák az ESR tárgyköréből.

1. INGRAM, D. J. E.: Spectroscopy at Radio and Microwave Frequencies. Butterworth Sci. Publ. London (1955).
2. INGRAM, D. J. E.: Free Radicals as Studied by Electron Spin Resonance. Butterworth Sci. Publ. London (1958).
3. LOW, W.: Paramagnetic Resonance in Solids. Solid State Physics (Ed. Seitz, F.—Ternbull, D.) Academic Press Inc. New York (1960). 2. kieg. kötet.
4. BLUMENFELD, L. A., VOJEVODSZKIJ, V. V., SZEMJONOV, A. G.: Primenyenyie elektronnogo paramagnitnogo rezonansza v himii. Izd. Szib. Otgy. Akad. Nauk. Sz. Sz. Sz. R. Novoszibirszk (1962).
5. PAKE, G. E.: Paramagnetic Resonance, Benjamin Inc. New York (1962).
6. BERSOHN, R.: Electron Paramagnetic Resonance of Organic Molecules. Determination of Organic Structures by Physical Methods (Ed. Nachod, F. C.—Phillips, W. D.) Academic Press Inc., New York (1962). 9. fejezet.
7. ROBERTSON, R. E.: Electron Paramagnetic Resonance of the Organometallics. Determination of Organic Structures by Physical Methods (Ed. Nachod, F. C.—Phillips, W. D.) Academic Press Inc. New York (1962). 10. fejezet.
8. ALTSCHULER, S. A., KOSYREV, B. M.: Paramagnetische Elektronenresonanz. Teubner Vlg. Leipzig (1963).
9. ANDERSON, R. S.: Electron Spin Resonance. Methods of Experimental Physics. III. kötet: Molecular Physics, Academic Press Inc. New York (1963).
10. SCHOFFA, G.: Elektronenspinresonanz in der Biologie. Vlg. G. Braun, Karlsruhe (1964).
11. Free Radicals in Biological Systems (Ed. BLOIS, M. S.—BROWN, H. W.—LEMMON, R. M.) Academic Press Inc. New York (1961).
12. Magnetic Resonance in Biological Systems. Weener-Gren Center International Symposium Series. 9. kötet (Ed. EHRENBERG, A.—MALMSTRÖM, B. G.—VÄNNGÅRD, T.) Pergamon Press Ltd. Oxford, London (1967).

AZ ESR SPEKTROMETRIA BIOLÓGIAI VONATKOZÁSAI

BELÁGYI JÓZSEF

Pécsi Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézete, Pécs

Az utóbbi évtized folyamán a biológiában is az érdeklődés homlokterébe kerültek és egyre inkább tért hódítanak azok a módszerek, amelyek lehetőséget nyújtanak a biológiai objektumokban végbemenő folyamatok molekuláris szintű tanulmányozására. Az élő organizmusok struktúráját, a strukturális változásokat, funkcióit is részben meghatározza az őket alkotó atomok és molekulák szerkezete, azok elektronkonfigurációja, ill. a konfigurációban végbemenő változás. Ezért minden módszer, amely lehetővé teszi magának az elektronkonfigurációnak vagy az elektronkonfiguráció változásának tanulmányozását, hasznos eszköz a biológiai struktúra és funkció tanulmányozásánál.

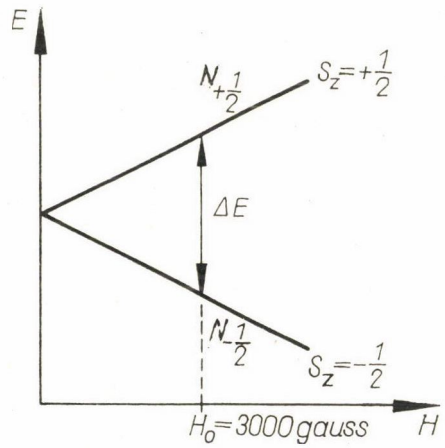
Az anyagok mágneses tulajdonságainak vizsgálata az információszerzés egyik bő forrásának bizonyult a molekuláris szerkezetkutatásban. A biológiai anyagok ilyen természetű vizsgálatainak az első lökést PAULING és mtsainak a 30-as évek második felében a haemoglobin és származékain végzett mágneses szuszceptibilitás mérései adták, amelyekből a kémiai kötés természetére, a koordinációs számra, valamint a térbeli szerkezetre következtettek (PAULING, CORYELL, 1936); továbbá a MICHAELIS-féle hypotézis, hogy a szabad gyökök mint közti termékek fordulnak elő a biológiai elektron-transfer folyamatokban (MICHAELIS, 1932). Az egyre érzékenyebb kísérleti technika és a finomodó elméleti módszerek az utóbbi 15 esztendőben a paramágneses biológiai anyagokon végzett kutatások rohamos növekedéséhez vezettek. Az ESR módszer felfedezésével pedig úgy tűnik, egy igen hatásos módszer került a biológusok kezébe is, amelyet mi sem bizonyít jobban, mint a biológiai intézetekben az ESR-rel dolgozó kutatócsoportok gombamódra szaporodó száma és a mintegy félezer biológiai anyagon végzett mérésről megjelent publikáció.

Az ESR spektroszkópia azon alapul, hogy a mágneses tulajdonsággal rendelkező elektronok külső mágneses térbe helyezve karakterisztikus módon lépnek kölcsönhatásba a térrel, amely kölcsönhatás megfelelő térerősségű mágneses térnél és megfelelő frekvenciájú elektromágneses sugárzásnál megfigyelhető.

A biológiai anyagok legtöbbjében az elektronok, bár individuálisan spinnel és mágneses momentummal rendelkeznek, lepárosított állapotban léteznek,

azaz mágneses momentumaik antiparalel helyezkednek el és olyan szorosan vannak csatolva, hogy nem lépnek megfigyelhető módon kölcsönhatásba a külső mágneses térrel. Így a módszer a biológiai problémák megoldásánál azon anyagokra korlátozódik, melyek lepárosítatlan elektront vagy elektronokat tartalmaznak.

Ha a lepárosítatlan elektronokat tartalmazó biológiai rendszer H külső mágneses térbe kerül, a térrel való kölcsönhatás folytán a lepárosítatlan elektronok spinjei két lehetséges orientációval rendelkezhetnek, vagy a térrel párhuzamosan, vagy a térrel antiparalel helyezkednek el, és a két orientáció-



1. ábra. Energiaszint felhasadása külső mágneses térben

hoz különböző nagyságú energia tartozik (1. ábra). Az energiakülönbség a két energiaszint között:

$$\Delta E = g\beta H_0 = 0{,}3 \text{ cm}^{-1} = 4 \cdot 10^{-5} \text{eV} = 1 \text{ kcal/M}$$

3000 gauss külső térnél, amely 10^2— 10^3-szor kisebb a hőmozgás átlagos energiájánál. Ha a H mágneses téren kívül $\nu = \Delta E/h$ rádiofrekvenciás tér is van jelen, akkor emisszióval és abszorpcióval átmenetek keletkeznek. Mivel a populáció a két energiaszinten nem azonos ($N_{-\frac{1}{2}} > N_{+\frac{1}{2}}$), netto energiaabszorpció jelentkezik, amely a

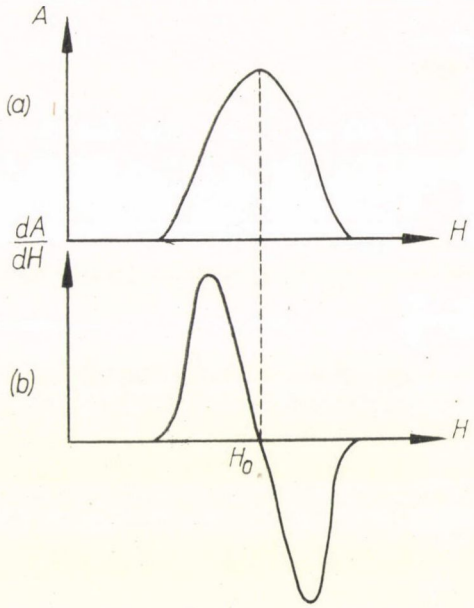
$$\Delta N = N \cdot \frac{\Delta E}{2kT}$$

kifejezéssel arányos, ahol $\Delta N = N_{-\frac{1}{2}} - N_{+\frac{1}{2}}$, míg $N = N_{-\frac{1}{2}} + N_{+\frac{1}{2}}$ a lepárosítatlan elektronok száma. Az összefüggés igen fontos fizikai tartalmat

takar: az energiaabszorpcióból a lepárosítatlan elektronok számára lehet következtetni.

Mivel a rezonancia feltétel teljesülését a legtöbb berendezésnél a H mágneses tér változtatásával valósítják meg, ezért rendszerint az energiaabszorpciót vagy az energiaabszorpció H szerinti differenciálhányadosát mérik a H függvényében (2. ábra).

Ha a lepárosítatlan elektron környezetétől teljesen izoláltan helyezkedne el, az ESR pusztán teoretikus érdekességgel bírna. Azonban ez nincs így, mivel



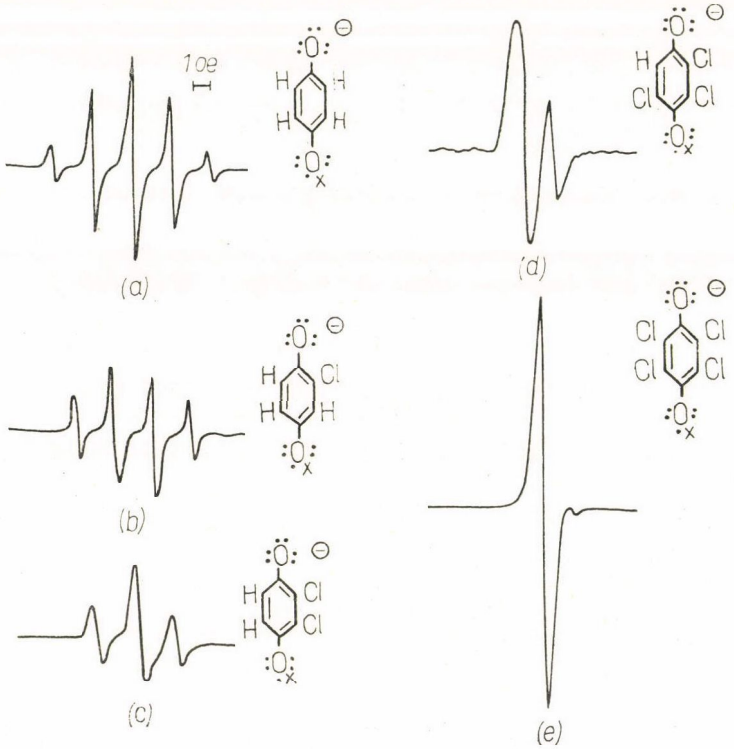
2. ábra. (a) ESR abszorpciós görbe; (b) ESR abszorpciós görbe H szerinti első differenciálhányadosa

a biológiai rendszereket alkotó molekulákban több olyan atom található, melyek magspinje zárustól különböző, pl. H, N vagy Mn, Cu, és így a lepárosítatlan elektronoknak a mag mágneses nyomatékával való kölcsönhatása hiperfinom struktúrát hoz létre az abszorpciós spektrumban, amely értékes információkat szolgáltathat a lepárosítatlan elektron környezetéről. Ezt illusztrálja a 3. ábra, amely a p-benzosemichinon és klórszármazékai ESR spektrumát mutatja (WERTZ, VIVO, 1955). A lepárosítatlan elektron kölcsönhatásban áll a H atomok magnyomatékával, és a kölcsönhatásban résztvevő H atomok számától függően más és más lesz az ESR spektrum.

A delokalizált lepárosítatlan elektron elektronfelhője egyenletesen oszlik el a benzolgyűrű felett, és így valamennyi H atom magspinjével egyenlő kölcsönhatásban áll. Ilyen esetben a spektrum hiperfinom vonalainak száma

$$2nI + 1$$

ahol n a kölcsönhatásban álló ekvivalens magok száma, I azok magspinje. A vonalak intenzitásviszonyai I = 1/2 esetben a binomiális sor együtthatóinak felelnek meg. Így pl. három ekvivalens H atom esetében a hiperfinom vonalak száma 4, azok intenzitásviszonya: 1:3:3:1. A triklór-chinone esetében a várt intenzitásviszonytól eltérést tapasztaltak.



3. ábra. p-benzosemichinon és klór származékai ESR spektruma (első differenciálhányados): (a) p-benzosemichinon, (b) monoklór-chinon, (c) 2.3-diklór-chinon, (d) triklór-chinon, (e) tetraklór-chinon

Az ESR módszer ZAVOISKY (1945) által történt felfedezését követően alig 10 esztendő telt el, amikor COMMONER, TOWNSEND és PAKE (1954) számos növényi és állati objektumon ESR jelet tudott találni. Miután az ESR spektrométerek érzékenységét sikerült megnövelni és számos metodikai újdonságot bevezetni, kiderült, hogy az ESR abszorpció biológiai anyagokban meglehetősen gyakori. Az élő és holt állati és növényi szövetek, ill. organizmusok, azok építőkövei ESR jelét a következő okokra ill. anyagokra lehet általában visszavezetni (SCHOFFA, 1964):

1. Paramágneses fémionok, melyek szabadon vagy organikus komplexekben fordulnak elő, mint pl. a vas a haemoglobinban és myoglobinban vagy a réz pl. a laccaseban.

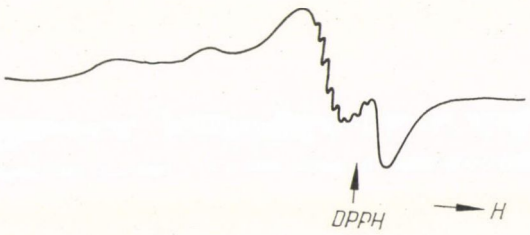
2. Szabad gyökök, melyek enzimatikus folyamat során keletkeznek, vagy olyan szabad gyökök, melyek struktúrkémiai okokból stabilisak, mint amilyen eset a melaninnál forog fenn.

3. Szabad gyökök, melyek oxigén hatására keletkeznek.

4. Szabad gyökök vagy vezetési elektronok, melyek a fotoszintézis folyamán keletkeznek, vagy a látható vagy UV fénnyel történő besugárzás hatására.

5. Biológiai objektumokban gamma vagy röntgen besugárzással vagy más beavatkozással mesterségesen létrehozott szabad gyökök.

6. Triplett állapotok.



4. ábra. Cu-klorofillin ESR spektruma (első differenciálhányados)

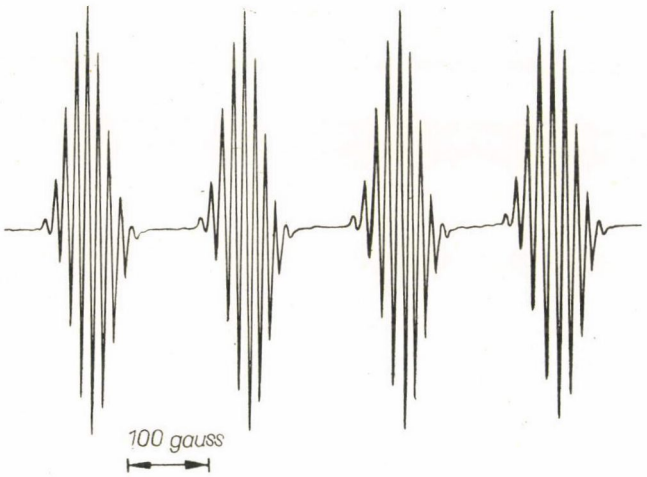
Az ESR vizsgálatok a biológia területén jelenleg az adatgyűjtés stádiumában vannak, így a rendszerezés inkább fizikai, semmint biológiai funkció alapján történik.

A következőkben néhány alkalmazási területet vizsgálunk meg, amelyeken lehetőség látszik, hogy az ESR vizsgálatokkal közelebb kerülünk a biológiai folyamatok megértéséhez.

1. *Biológiai fémkomplexek ESR spektruma.* Az átmeneti fémek (Cu, V, Co, Mn, Fe, Cr) ionjainak biológiai makromolekulákkal alkotott komplexeinek előfordulása meglehetősen gyakori a természetben. A fémkomplexek gyakran lényeges szerepet töltenek be a biológiai anyagcsere folyamán, mivel csekély energiafelhasználással képesek elektronok felvételére és leadására.

A porphyrin, klorofill, ftalocianin önmagukban diamágnesesek, csupán egy paramágneses fémion beépülésével válnak paramágnesessé és vizsgálhatók az ESR módszerrel. Az ESR spektrum a fémkomplexekben a centrális fémion elektronjaitól származik, ezért a spektrumot elsősorban a centrális fémion fogja karakterizálni. Kiterjedt vizsgálatokat eddig a réz és vas komplexein végeztek el. A 4. ábra mutatja a diamágnesesen magnézium-klorofillal hígított Cu-klorofillin spektrumát, amelyet 3,2 cm-es spektrométerrel vettek fel (LASSMANN et al., 1961). A Cu^{2+} ion 3 d alhéján levő kilenc elektron közül nyolc lepárosítva van, a kilencedik marad szabad, amely paramágnességhez vezet. A lepárosítatlanul maradt spinnek a Cu mag $I = 3/2$ magspinjével való kölcsönhatása hiperfinom struktúra kialakulásához vezet. A vonalintenzitások normálisan

egyenlőek, azonban mint McConnel (1956) kimutatta, a különböző hiperfinom átmenetek ez esetben különböző relaxációs idővel rendelkeznek, amely a vonalszélesség megváltozásához és így intenzitásváltozáshoz vezet. Megfigyelhető még az ábrán egy rosszul feloldott további hiperfinom struktúra, amely a N ligand magoktól származó kölcsönhatásból ered. Ha a négy ekvivalens N magtól származó kölcsönhatás mind a négy hiperfinom vonalat $2\,nI + 1 = 9$ vonalra hasítja fel ($I = 1$ az N^{14} magnál), amelyek intenzitásviszonya 1 : 4 : 10 : 16 : 19 : 16 : 10 : 4 : 1. Ez utóbbi jól megfigyelhető az 5. ábrán, amely a Cu^{2+}-tetraphenylporphyrin spektrumát mutatja (Schoffa, 1964).



5. ábra. Cu-tetrafenilporfirin ESR spektruma (első differenciálhányados)

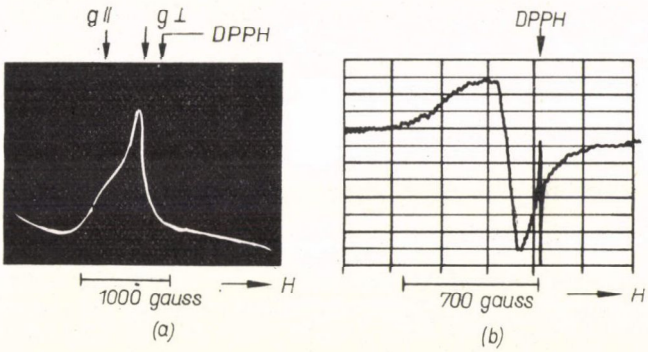
Itt a Cu magtól származó négy hiperfinom vonal kilenc további hiperfinom vonalra hasad fel a négy N magtól való kölcsönhatás következtében, és intenzitásviszonyuk is megfelel a várt intenzitásviszonynak. Mindez direkt bizonyítékát adja annak, hogy a centrális ion elektronfelhői kiterjednek egészen a ligand magokig. A hiperfinom struktúra ligand magoktól származó megjelenése erős kovalens kötésről tanúskodik, amely a réz elektronjainak delokalizációját jelenti a ligand magok irányában.

Kristályoknál a különböző kristálytengely irányokban különböző g faktort találunk. Polykristályos anyagban a számos rendezetlenül fekvő mikrokristály anizotrop g faktora miatt aszimmetrikus vonalformát kapunk. A 6. ábra a polikristályos Cu^{2+}-ftalocianin spektrumát mutatja, amelyet 8 mm-en és 3,2 cm-en működő spektrométerekkel vettek fel (Lassmann et al., 1961). Az ábra bal oldali része a 8 mm-es spektrométerrel felvett abszorpciós spektrumot, míg a jobb oldali a 3,2 cm-es spektrométerrel készített első differenciálhányadost mutatja. A polikristályos mintával az utóbbi esetben DPPH-t is mértek, amely jelzi a szabad elektron g faktorát. Az ábrákon, különösen a

baloldalin, jól felismerhető az asszimetrikus vonalforma. GORDY és mtsai (VAN ROGGEN et al., 1957) mutattak rá, hogyha a minta g-faktor anizotrópiával rendelkezik, mint ez az axiális szimmetriával bíró Cu^{2+}-ftalocianinnál az eset, amely két $g_{||}$ és $g_{\perp}$ faktorral jellemezhető, elegendően nagy statikus mágneses térnél a

$$\Delta H = \left| \frac{\Delta g}{g} \right| \cdot H_0$$

egyenlet értelmében az anizotrópia kimutatható. A formulában szereplő Δg a $g_{||} - g_{\perp}$ különbséget jelenti. A 8 mm-es hullámhossznál az alkalmazott tér-



6. ábra. Cu-ftalocianin ESR spektruma: (a) abszorpciós görbe, $\lambda = 8$ mm; (b) első differenciálhányados, $\lambda = 3{,}2$ cm

erősség 13 000 gauss körül van, szemben a 3,2 cm-nél alkalmazott 3300 gaussal, így 8 mm-en végzett mérésnél a nagyobb felhasadás (ΔH) miatt az anizotrópia világosan megmutatkozik, míg a 3,2 cm-en végzett kísérlet esetében csupán egy széles aszimmetrikus vonal utal az anizotrópiára. Az ábrákból az is kiderül, hogy a g-faktorok a szabad elektron g faktorától eltérő értéket mutatnak.

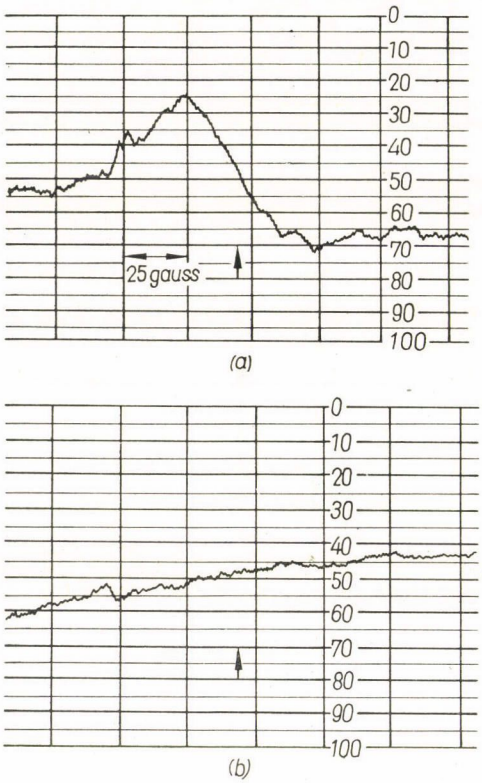
A biológiai fémkomplexeken végzett ESR mérések adataiból, mint a hiperfinom struktúra, vonalszélesség, g-faktor értéke, értékes következtetések vonhatók le a kémiai kötés jellegére, az elektronstruktúrára, valamint a fémiont körülvevő kristálytér szimmetria viszonyaira is, amelyek végsősoron a struktúrához kötött biológiai funkció megértését segítik elő.

2. *ESR biológiai enzimrendszerekben.* Még MICHAELIS tételezte fel 1932-ben, hogy a biológiai oxidáció folyamatában a tápanyagmolekulák enzimkatalizált dehidrogenálása lépcsőzetesen megy végbe:

$$AH_2 \rightarrow AH\cdot + H$$
$$AH\cdot \rightarrow A + H,$$

ahol az AH·köztitermék egy szabad gyök jellegű molekula, amely egy lepárosítatlan elektront tartalmaz. Ezt a feltevést többek között szuszceptibilitás-

mérésekkel is sikerült alátámasztania. A modern ESR spektrométerekkel valóban sikerült számos modell enzimrendszerben szabad gyökök fellépését kimutatni, azok koncentrációját megmérni, a szabad gyököt azonosítani, sőt alkalmas metodikai fogással, az ún. átáramlásos technikával, a szabad gyökök kinetikáját is tanulmányozni. Meg kell azonban jegyezni, hogy a nyert eredmények sok esetben nem egyértelműek és nem engedik meg messzemenő következtetések levonását.



7. ábra. (a) oxidált és (b) redukált laccase ESR spektruma (első differenciálhányados)

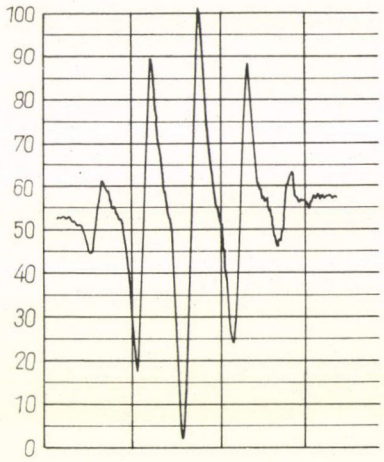
Igen részletesen vizsgálta NAKAMURA (1961) a laccase katalitikus hatását ESR-rel a hidrochinon→chinon folyamatban és a következő reakciókat tételezi fel:

$$2Cu^{2+} + \text{hidrochinon} \rightarrow 2Cu^{+} + \text{p-chinon} + 2H^{+}$$

ahol $2Cu^{2+}$, ill. $2Cu^{+}$ jelenti a laccase oxidált, ill. redukált alakját, valamint

$$2Cu^{+} + \frac{1}{2}O_2 + 2H^{+} \rightarrow 2Cu^{2+} + H_2O$$

A feltételezett reakció két szempontból is érdekes. A laccase oxidált formája kétértékű rezet tartalmaz, amely paramágneses és így jelenléte ESR-rel kimutatható, másrészt katalitikus hatása folytán a hidrochinon semichinonná oxidálódik, amely lepárosítatlan elektront tartalmaz és így koncentrációja ESR-rel meghatározható. A hidrochinon-tól az elektron a laccase kétértékű réz ionjához transzportálódik és egyértékű rézzé redukálja, amely diamágneses és így nem ad ESR spektrumot. A 7. ábra felső része mutatja a 7,1 pH-jú Kolthoff pufferben oldott 1,5 mM oxidált laccase ESR spektrumát, az alsó része, a redukált laccase spektrumát. Ez utóbbi nem ad ESR abszorpciót. A 8. ábra a semichi-

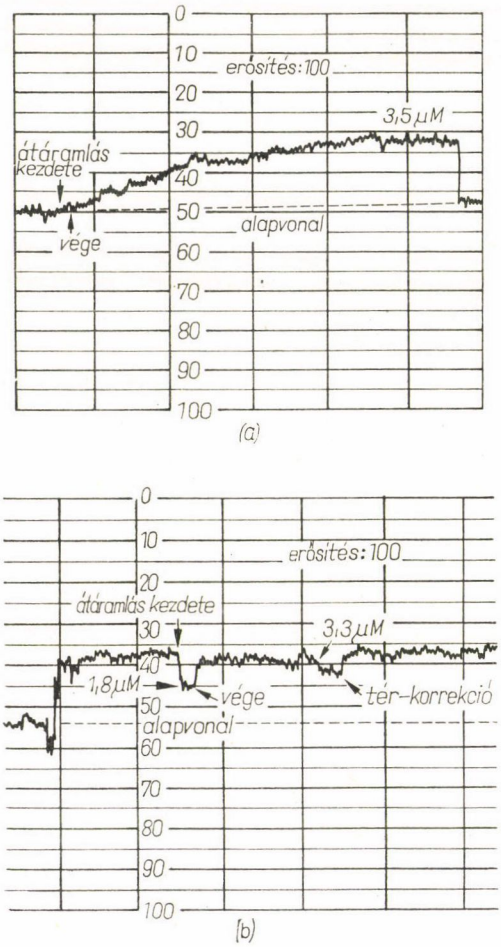


8. ábra. p-benzosemichinon ESR spektruma (első differenciálhányados)

non spektrumát mutatja, amely a reakció folyamán készült. 10 mM hidrochinon és 1 μM laccase jelenlétében 2,1 μM semichinon koncentrációt mértek. Az öt hiperfinom vonalból álló struktúra onnan származik, hogy a szabad elektron elektronfelhője egyenletesen oszlik el a benzolgyűrű felett és egyenlő kölcsönhatásban áll mindnégy proton magspinjével. A 9. ábra mutatja az átáramlásos technikával készült görbéket, melyeket úgy nyertek, hogy a mágneses teret a semichinon spektrum egyik csúcsára állították és a csúcshoz tartozó kitérés időbeli változását regisztrálták. Az ábra felső része 100 mM hidrochinon koncentrációnál készült laccase nélkül, míg az ábra alsó része 1,7 μM laccase jelenlétében. A hidrochinon autooxidációja folytán lassan semichinon képződik, mindkét esetben ugyanannyi, ami mutatja, hogy a képződött semichinon mennyiség a jelenlevő hidrochinon koncentrációjának függvénye. Az ábra a laccase katalitikus hatását világosan mutatja, mivel a stacionárius állapot enzim jelenlétében lényegesen gyorsabban alakul ki.

3. *Melanin ESR spektruma.* Még COMMONER és mtsai (1954) írták le, hogy melanint tartalmazó biológiai anyagok ESR spektrumot adnak. A spek-

trum szimmetrikus szinglett, a g-faktor a szabad elektron g-faktorával egyezik meg, a lepárosítatlan spinkoncentráció: 10^{16}— 10^{18} spin/g. A melanin egyike azon biológiai anyagoknak, amelyeken történő ESR vizsgálatok érdekes további következtetések levonását is megengedik.

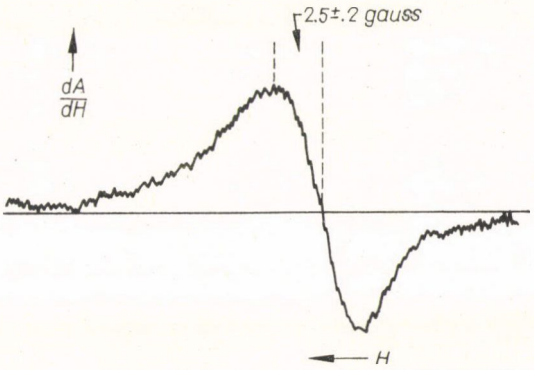


9. ábra. Semichinon radikál képződésének kinetikája

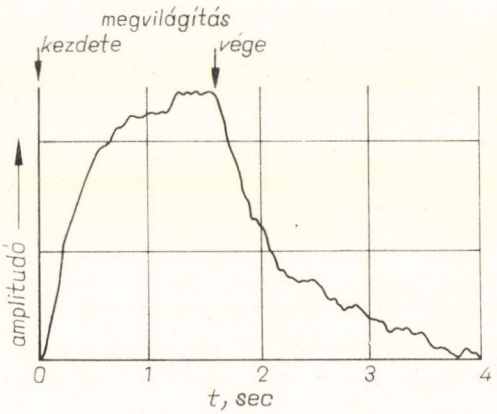
A 10. ábra a marhaszemből kivont melanin ESR spektrumát mutatja, amelyet 3,2 cm-es spektrométerrel vettek fel. A marhaszemből kivont melanint differenciál centrifugálással tisztították és 0,1 M KCl — 0,01 M foszfátban pH 7-nél szuszpendálták és 25 C°-on fénnyel világították meg (Cope, 1965). Hogy a keletkező szabad gyökök kinetikáját tanulmányozzák, a mágneses teret a csúcs helyzetének megfelelően választották meg és regisztrálták a kitérés nagy-

ságát az idő függvényében. Egy így kapott görbét mutat a 11. ábra. A görbét 100 ismételt kísérlet átlagolásából nyerték. A vizsgálatokból, amelyeket COPE és mtsai (1965) végeztek, a következő következtetéseket vonták le:

1. A szabad gyök képződés és lebomlás akkor is végbemegy, ha a melanin vizes szuszpenzióját előzetesen lefagyasztják, azaz a folyamat szilárd rendszerben is végbemegy.



10. ábra. Szem-melanin ESR spektruma (első differenciálhányados)



11. ábra. Megvilágítás hatására képződött szabad gyökök keletkezési és lebomlási görbéje

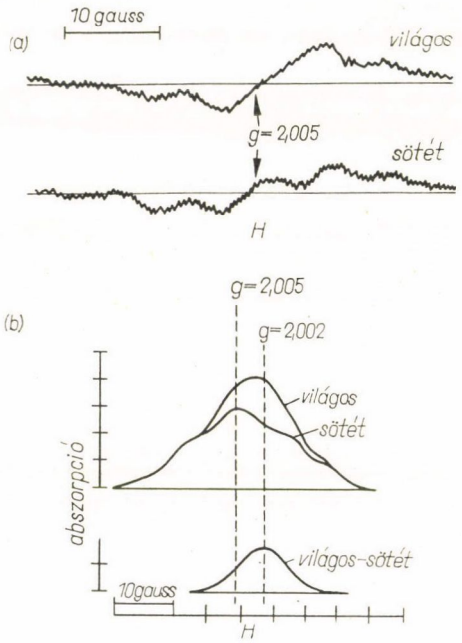
2. A reakció akkor is végbemegy, ha a szuszpenziót 15 min. keresztül forralják, úgyhogy a folyamat nem lehet enzimatikus jellegű.

3. A szabad gyökök lebomlási görbéje jól egyezik az Elovich-egyenlettel, amely szilárd félvezetők felületén végbemenő elektron transzportot írja le.

Ha mindezekhez azt is hozzávesszük, hogy a melanin organikus polimer, úgy fel kell tételeznünk, hogy a melanin szerves félvezetőként viselkedik, mint ahogy az LONGUET—HIGGINS (1960) elméletileg előre jósolta. A legalsó üres és legfelső betöltött energiaszint közötti különbség kb. 0,2 eV, tehát igen kicsi,

szemben a fehérjék esetében számított és mért néhány eV-nyi értékkel. A félvezető elképezelést támasztja alá az az eredmény is, hogy a vonalszélesség igen kicsi.

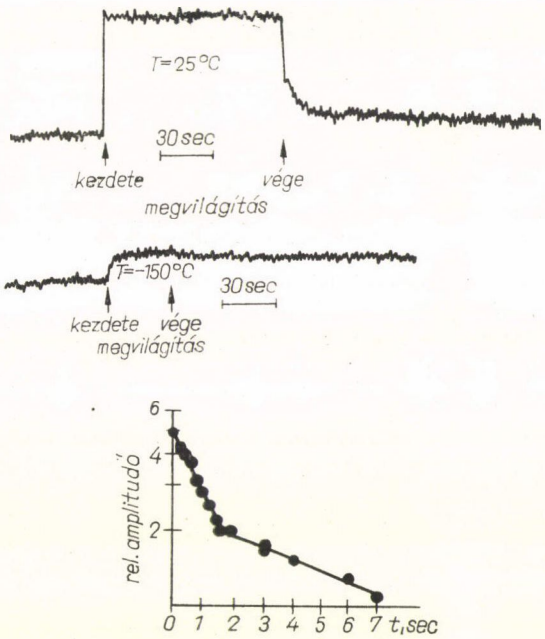
4. *Fotoszintézis.* Már COMMONER és mtsai (1954) kimutatták, hogy fotoszintetizáló rendszerekben ESR abszorpció keletkezik megvilágítás hatására, sőt megvilágítás nélkül is mutatkozik egy lényegesen gyengébb, de hiperfinom szerkezettel bíró jel. A 12. ábra *a)* része mutatja a spenót koroplaszt mintán nyert spektrumokat; felső részén megvilágítás mellett, az alsó részén a sötétben kapott jelet. Az ábra *b)* része a gépi integrálással nyert görbéket, illetve alul a



12. ábra. Spenót-kloroplaszt ESR spektruma: (a) első differenciálhányados, (b) abszorpciós görbe

két görbe különbségét mutatja (COMMONER et al., 1957). A sötétben kapott jel hiperfinom struktúra vonalainak relatív intenzitása 1 : 2 : 3 : 2 : 1, amely ekvivalens kölcsönhatásban álló két N vagy négy H magtól származhat. Az utóbbi lehetőséget D_2O-val végrehajtott kísérletekkel kizártnak valószínűsítik. Megvizsgálták a szabad gyök hozam fényintenzitástól való függését is; alacsony és közepes fényintenzitásnál arányosságot találtak a fényintenzitás és a lepárosítatlan elektronok száma között, csupán igen nagy fényintenzitásnál (60 000 lux) tapasztalták telítési jelenségek fellépését. Meghatározták a kvantumkihasználás fokát is és 0,03 lepárosítatlan spin/fénykvantumnak találták. A jelintenzitás hullámhossz függésének vizsgálata azt mutatta, hogy a jelek

legintenzívebbek a 6000—7250 Å és a 3500—4500 Å közötti hullámhossztartományban. A korábbi példákban említett módon tanulmányozták a fény hatására keletkező szabad gyökök keletkezését és lebomlását is (TOLLIN et al., 1958). Egy ilyen kísérletet és annak eredményét a 13. ábra mutatja. A kísérletet spenót kloroplaszton végezték két különböző hőmérsékleten. Míg a szabad gyökök keletkezésének időállandója 0,2 sec., s ez az érték jelentéktelenül nő meg



13. ábra. Szabad gyökök keletkezése és lebomlása spenót-kloroplasztban

alacsony hőmérsékleten, addig a lebomlás időállandója az első szakaszra 1 sec körüli, a második szakaszra több másodperc 25 C°-on, míg —140 C°-on a gyökök eltűnésének időállandója órákra nő; mindezek nem támogatják a szabad gyökök enzimatikus keletkezéséről szóló elképzelést. A kapott eredmények alapján CALVIN és mtsai, ARNOLD (1965) tettek kísérletet az ESR jel keletkezésének értelmezésére. Az általuk felállított szilárd test fizikai modell alapján levont következtetések elég jó összhangban állnak a kísérleti tapasztalatokkal.

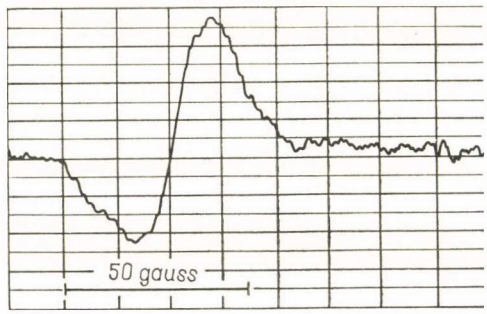
5. *Besugárzott biológiai preparátumok ESR spektruma.* Az ionizáló sugárzással besugárzott biológiai anyagok vizsgálatánál az ESR alkalmazásának lehetősége a következőkre vezethető vissza:

1. A besugárzás hatására a kötések felhasadása következtében lepárosítatlan elektronok, szabad gyökök keletkeznek, amelyek koncentrációja ESR-rel kvantitatíve mérhető.

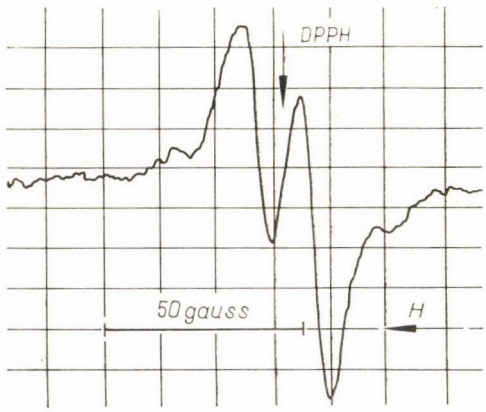
2. A besugárzással keletkező szabad gyökök viszonylag stabilisak.

3. Az ESR spektrumok számos esetben hiperfinom stuktúrát mutatnak, amelyekből a szabad gyök szerkezetére értékes következtetések vonhatók le.

4. A vizsgálatok azt mutatták, hogy mintegy 100 Mr sugárdózisig a sugárdózis nem befolyásolja a keletkező szabad gyök fajtáját, csupán a szabad



14. ábra. 80 °K-on besugárzott és mért nyúl m. psoas ESR spektruma



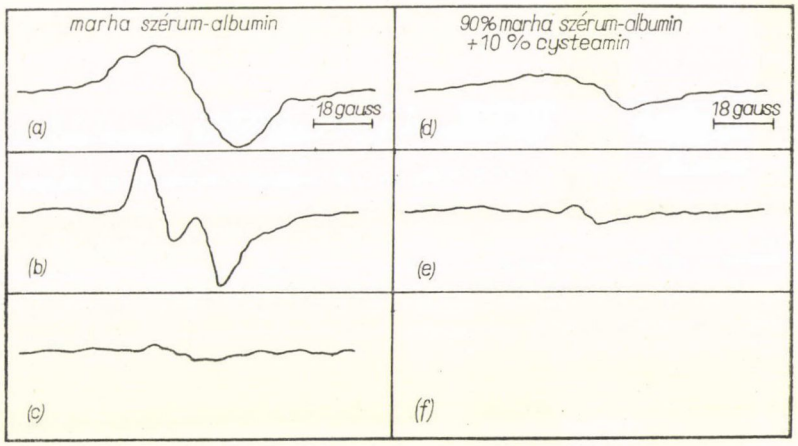
15. ábra. 80 °K-on besugárzott, szobahőmérsékleten mért nyúl m. psoas ESR spektruma

gyökök száma nő a sugárdózissal. Ez a körülmény azzal az előnnyel jár, hogy az érzékenységi okokból nagy sugárdózissal végzett kísérletek eredménye kis sugárdózisok esetére extrapolálható.

Az ESR biológiai alkalmazását tekintve, legelterjedtebben sugárbiológiai problémák megoldásánál használják; az ESR mérések csaknem felét besugárzott biológiai anyagokon végezték. Ezek áttekintése is meglehetősen nehézkes, ezért a továbbiakban csupán egy lehetséges alkalmazást emelünk ki.

A sugárvédő anyagok megkeresése a sugárbiológia egyik igen fontos problémája. Proteineken és más biológiai makromolekulákon végzett kísérletek

azt mutatták, hogy ezek spektruma két tipikus formában jelenik meg: *a)* egy dublett, mint a glycylglycinnél, vagy *b)* egy aszimmetrikus rezonancia vonal, mint a cystinnél, ez utóbbi főleg cystin vagy cystein tartalmú fehérjéknél. A 14. és 15. ábra 3 Mr X-sugárdózissal besugárzott nyúl m. psoas ESR spektrumát mutatja 80 °K-on és szobahőmérsékleten. A 80 °K-on besugárzott és mért preparátumok egy 20 gauss vonalszélességű szinglettet adtak, amely szobahőmérsékleten egy quartett struktúrába ment át. Az 1 : 3 : 3 : 1 aránynak nem megfelelő intenzitásviszony arra utal, hogy ez esetben két különböző radikál megjelenéséről van szó. Az egyik egy négy hiperfinom komponenssel rendel-



16. ábra. Szérumalbumin ESR spektruma: (a) 77° K-on, vákuumban besugárzott és mért minta, (b) szobahőmérsékleten, vákuumban besugárzott és mért minta, (c) szobahőmérsékleten, levegőben besugárzott és mért minta; (d), (e) és (f) esetben a kísérlet feltételei megegyeznek (a), (b) és (c)-vel, csak a minta összetétele más

kező szabad gyök, a másik a glycilglycinnél jelentkező 15 gaussos dublett. Ez valószínűleg ĊH-szabad gyöktől származik (Belágyi et al., 1965). A 16. ábra marha szérumalbuminon végzett hasonló kísérleteket mutat (Libby et al., 1961). A besugárzás 5 Mr X-sugárdózissal történt. A különbség a jobb oldali spektrummal szemben, mely esetben a preparátum 90% fehérjéből és 10% cysteaminból állt, szembetűnő. Az eredményt arra vezetik vissza, hogy a besugárzás folyamán a különböző helyen keletkezett lepárosítatlan elektronok a protein vezetési sávban vagy más energiaszállító mechanizmus útján a cysteinhez jutnak. Mivel az SH csoportok a fehérjemolekulában az oldalláncokon foglalnak helyet, a keletkező X—Ṡ szabad gyökök nem befolyásolják olyan lényegesen a funkciót, mintha a fehérjelánc mentén lennének lokalizálva. Azonkívül az X—Ṡ szabad gyökök helyzetüknél fogva könnyebben kerülhetnek más molekulacsoportokkal kölcsönhatásba és rekombinálódhatnak. A vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a cystein és más kéntartalmú anyagok sugárhatásvédő anyagként viselkednek.

IRODALOM

ARNOLD, W.: J. Phys. Chem. **69,** 788 (1965).
BELÁGYI, J., LASSMANN, G., DAMERAU, W.: Monatsberichte **7,** 131 (1965).
COMMONER, B., HEISE, J. J., LIPPINCOTT, B. B., NORBERG, R. E., PASSONEAU, J. V., TOWNSEND, J.: Science **126,** 57 (1957).
COMMONER, B., TOWNSEND, J., PAKE, G. E.: Nature **174,** 689 (1954).
COPE, F. W.: The 3rd Jena Symposium on Electrochemical Aspects of Molecular Biology, Jena (1965).
LASSMANN, G., THOM, H. G., NICOLAU, CL.: Bull. Ampere **10,** 179 (1961).
LIBBY, P., ORMEROD, M. G., CHARLESBY, A.: Nature **190,** 998 (1961).
LONGUET-HIGGINS, H. C.: Arch. Biochem. Biophys. **86,** 231 (1960).
MCCONNEL, H. M.: J. Chem. Phys. **25,** 709 (1956).
MICHAELIS, L.: J. Biol. Chem. **96,** 703 (1932).
NAKAMURA, T.: Blois, M. S. Free Radicals in Biological Systems. Academic Press, New York. p. 169 (1961).
PAULING, L., CORYELL, CH. D.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **22,** 159 (1936).
SCHOFFA, G.: Elektronenspinrezonanz in der Biologie. Verlag G. Braun, Karlsruhe (1964).
TOLLIN, G., SOGO, P. B., CALVIN, M.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **74,** 310 (1958).
VAN ROGGEN, A., VAN ROGGEN, L., GORDY, W.: Phys. Rev. **105,** 50 (1957).
WERTZ, J. E., VIVO, J. L.: J. Chem. Phys. **23,** 2441 (1955).
ZAVOISKY, E.: J. Phys. U. S. S. R. **9,** 211 (1945).

MIKROSPEKTROFOTOMETRIA

JOBST KÁZMÉR

POTE Kórbonctani Intézete, Pécs

Régi törekvés, hogy *egy* sejt kémiai összetételére kvantitatív adatokat kapjunk, funkcionális változásait mennyiségileg is kifejezzük. A morphologia klasszikus módszerei ennek a kívánalomnak nem tehettek eleget. De a biokémiai methodikák is csak részben hoztak megoldást. A morphologus nem tudja a struktúrát szétszedni, egészében vizsgálja; jól látja az elváltozást, de pontosan nem tudja meghatározni, mit jelent az. A biokémikus felbontja a struktúrát. Tudja milyen anyag van a kezében, de nem látja annak a helyét a struktúrán belül. — Másrészről a biokémiai methodikák sejtcsoportokkal dolgoznak. Így az egy sejtre vonatkozó sajátságokat, adatokat a sejtcsoport átlagértékeként adják meg. A biológiában azonban sokszor nem elégedhetünk meg átlagértékekkel. Az átlagérték nem ad felvilágosítást a sejtek közti egyedi differenciákra, heterogén sejtpopulatiónál pedig — poliploidiánál, mitosisnál, tumorsejteknél, vírusinfectio esetén — téves következtetéseket eredményezhet. Ezért volt igen kívánatos sejtcsoportok analízise helyett egyes sejtek kvantitatív vizsgálata.

A mikrospektrofotometria (MSF) kifejlesztése lehetővé tette, hogy egy sejtben vagy morphologiai egységben direkt vagy indirekt úton kvalitatív és kvantitatív anyagmeghatározást végezzünk.

A vizsgálatok sorát CASPERSSON (4, 5), CASPERSSON és SCHULTZ (9) fehérjeszintézissel kapcsolatos közleménye nyitotta meg. A MSF-s módszer segítségével a stockholmi iskola rövid idő alatt számos alapvető megállapítást tett. Kimutatták, hogy a gyorsan növekedő szövetek cytoplasmájában és nucleolusában olyan anyag található nagy mennyiségben, melynek UV abszorptiója a nukleinsavakra jellemző, nem azonos DNS-el és RNS-nek felel meg (8). Az óriás chromosoma euchromatikus részében a DNS albumin és globulin tipusú fehérjéhez kapcsolódik, míg a heterochromatikus részben a DNS histonproteinnel konjugált (6). E példák is mutatják, hogy MSF-nek a kifejlesztése új irányt adott a kvantitatív cytologiának és ezen belül a nucleoprotein kutatásnak. Nemcsak azért, mivel a módszer megtartott struktúra mellett is alkalmas igen kismennyiségű anyag ($3 \cdot 10^{-9}$ mg) meghatározására, hanem mert felvilágosítást ad a különböző sejtek normál és pathologiás állapotaiban a nuk-

leinsav és fehérjetartalomban mutatkozó különbségre. A korábban methodika hiányában megválaszolhatatlan kérdések, problémák ma vizsgálhatók: a DNS, RNS és fehérje periodikus változása a csírasejt kifejlődése során, a carcinogenesisben, virusinfectio vagy endocrin behatás kapcsán, hogy a vizsgálatoknak tört részét említsem csak. Másrészről, ha direkt korrelációt tételezünk fel a sejt funkcionális állapota — legyen az normál vagy kóros —, mikroszkópos képe és kémiai összetétele közt, úgy a sejt funkciójában és morphologiájában bekövetkező változás a háttérben meghúzódó, esetleg mégcsak latensen meglevő kémiai történés kifejezője lehet. Annak lehetősége tehát, hogy a fénymikroszkópos morphologiai elváltozások kialakulása előtt már változást lehet kimutatni az intracelluláris nukleinsav és fehérje kvalitásában vagy kvantitásában, megadja az MSF-nek, ennek az in situ citokémiai módszernek jelentőségét a biológiai kutatásban. Alátámasztja ezt az elmúlt 30 év alatt megjelent monográfiák és közlemények hosszú sora, melyek közül csak néhányra utalok (2, 4, 10, 22, 23, 24, 26, 33, 35, 40, 44, 45, 49).

Ismertetésem első részében az MSF módszertanával foglalkozom, míg a másodikban példákon mutatom be, hogy a módszert magunk is jó eredménnyel alkalmaztuk biológiai, struktúrkémiai problémák megoldásánál.

I.

A mikrospektrofotometria módszertana

1. *A módszer alapelve:* igen egyszerű. A spektrumtartománytól függetlenül lényegében megegyezik az abszorbciós spektrofotometriáéval. Ott a vizsgálandó oldat kvalitatív vagy kvantitatív analízisét a fényáteresztőképesség meghatározásával végezzük. A MSF-nál a monochromátor (fényforrás) és az érzékelő közé, tehát a makrospektrofotométer küvettájának helyébe mikroszkópot építünk be. Ezáltal vizuális kontroll mellett analizálhatunk mikroszkópos preparátumokat, szöveteket, sejteket fotometriásan. A MSF így végső soron kvantitatív morfológiai módszer, mely az abszorbciós fotometria törvényeinek figyelembevételével szöveti szinten anyagmeghatározást végez.

Mint általában az abszorbciós analitikai módszerek, a MSF is két feladatot oldhat meg:

1. karakterisztikus abszorbciós spektrumok segítségével ismeretlen anyag kvalitatív identifikálását: mikrospektrofotometria (MSF),

2. ismert abszorbciós spektrumnál a Lambert—Beer—Bouger-törvény alapján lehetőség van különböző anyagok mennyiségi meghatározására: szűkebb értelemben vett MSF: mikrofotometria (MF). Megemlíteném, hogy biológiai struktúrákkal kapcsolatban gyakran találkozunk a MSF és MF kifejezés helyett a histo vagy citofotometria elnevezéssel.

A MSF alkalmazási területe, különös tekintettel a hullámhosszra

A módszer kialakításánál figyelembe kell venni, hogy a mérés során a tárgy képének különböző pontjait szabadszemmel keressük ki, állítjuk be és kontrolláljuk. A vizsgálat előfeltétele ezért az objektum jellemző abszorpciója mellett a képalkotás, a rendszer jó feloldóképessége.

Az igen rövid hullámtartományban (Rtg) a különböző elemek kötésmódjuktól függetlenül erősen abszorbeálnak. A tárgyfelbontás azonban csekély. Ezért ez a hullámtartomány csak a nagyítási rendszer kifejlesztése után alkalmazható a MSF-ban.

A rövid UV-ban a molekulák abszorpciója oly nagy, hogy a metszetvastagságból kifolyólag gyakorlatilag nem lehet mérni. De a biológusok ebben a hullámtartományban nem is igen várhatnak különösebb információt. Ezzel szemben a közepes UV tartományban a biológiailag fontos makromolekulák, nukleinsavak, aromás aminosavak, fehérjék jellemző abszorpciót mutatnak. Erre alapítva dolgozta ki CASPERSSON az UV-*direkt*-MSF-s módszert.

A látható színképben a festetlen biológiai objektumnak nincs elnyelése. Ez alól kivételt csak bizonyos pigmentek (haemoglobin és származékai, chlorophyll) képeznek. Mégis a legtöbb MSF-s mérés látható fényben történt. Specifikus festések, histokémiai reakció segítségével ma már módunkban áll a substrát, a sejt építő komponensein, funkcionális csoportjain színes végtermékket kialakítani. Az ilyen festék-substrát komplex már jellemző elnyelést ad a látható fény egy bizonyos hullámhosszánál. Ebből az eredeti (színtelen) substrát viszonylagos mennyiségére következtethetünk: *indirekt* MSF.

Az infravörös tartományban a MSF-s vizsgálatoknak korlátot szab a rendszer csekély feloldóképessége (11). Ma még nem tudjuk a tárgyat, mely túl kicsi a hullámhosszhoz képest, valósan leképezni.

Speciális területe a MSF-nek a fluorescens-MSF (1, 39, 48). Míg az előbbiek alapja az anyag direkt vagy indirekt abszorpciója, addig a fluoreszcens MSF-nál az objektum primér vagy a fluoreszcens festékekkel feltüntetett sejtek, sejtkomponensek szekundér fluoreszcentiáját mérjük hosszú hullámhosszú UV gerjesztés után. Előnye, hogy az emittált fény intenzitása független az objektum alakjától és az anyageloszlástól. A fluoreszkáló anyag relatív mennyisége így egy méréssel meghatározható (nem kell az extinctiót a felületre vonatkoztatni).

Ma tehát a MSF-s vizsgálatoknál az elektromágneses spektrum 220—700 mμ közti tartománya jön szóba.

Miután a legtöbb mérés látható fényben történik, felsorolom a kívánalmakat, amit egy festési, histokémiai reakciónak eleget kell tenni, hogy MSF-n alkalmazhassuk.

1. A festék tisztasága. A kémiai analitikai módszerek alapján csak egy komponensből álljon.

2. Spektralis sajátsága: sok festéknek más oldatban és más a substratumhoz kapcsolva az abszopcios maximuma és eltérő lehet az abszorpciós görbe lefutása is.

3. A festékoldat: pH-ja, concentratioja, hőfoka, a festési idő, az alkalmazott fixálószer mind befolyásolhatja a festékkötés intenzitását. Ezért pontosan meg kell határozni a festés optimális feltételeit, reprodukálhatóságát.

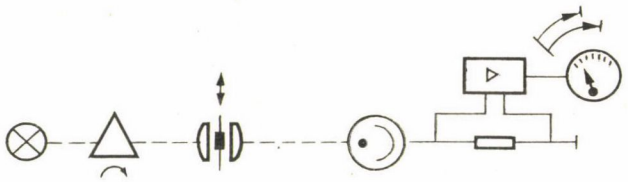
4. A Lambert—Beer—Bouger-törvény érvényessége: különböző vastag metszeteken és abszorpciós spektrumnál határozandó meg.

5. Specificitása: szelektiv-e a festékkötés egy meghatározott szöveti komponensre (pl. DNS-re).

6. Kvantitativ-e a festés: a festékfelvétel arányos legyen pl. a különböző DNS tartalmú sejtek anyagmennyiségével.

A mérőműszer felépítése, a mérés

Látható fényben egyszerűbb felépítésű készülékekkel is jó eredményeket kaphatunk. Az UV-MSF felépítése, a hullámhosszból adódóan, lényegesen bonyolultabb. Bármelyik hullámtartományban dolgozunk is, a készülék felépí-



1. ábra

tésének elve lényegében azonos. Az *egy* és *két* fénysugaras készüléktipusok a legelterjedtebbek (20). Látható fényben az egysugaras megoldás is megbízható eredményt ad, míg az UV és fluoreszcens MSF-nál a kétsugaras rendszert használják.

Az *egysugaras* szisztémánál (1. ábra) a monochromatikus fényt először a tárgylemez üres területén át vezetjük az érzékelőre (elektronsokszorozóra). A keletkező fotoáram ellenálláson feszültségesést hoz létre. A felerősített jelet mérőműszerre vezetjük és a kitérést regisztráljuk (A_2). Ezután a vizsgálandó tárgypontot visszük a fénysugár útjába és megint leolvassuk a kapott kitérést (A_1). A leolvasott értékekből a transmissio:

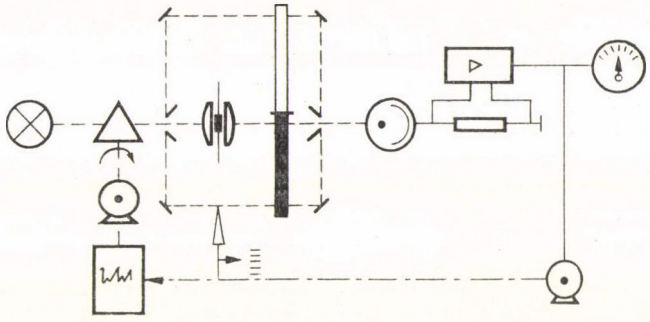
$$\frac{A_1}{A_2}, \text{ illetve } E = -\log\frac{1}{T} \text{ számítható.}$$

Az ilyen felépítésű készülék pontosságának előfeltétele a fényforrás stabilitása, valamint a megvilágítás erőssége és a fotoáram közti linearitás.

Pontosabb eredményhez vezet a kompenzációs mérési módszer, ahol a mérőműszer nullindikátor. A mérés így független a fényforrás ingadozásától és

a mérőműszer nonlinearitásától. Az összehasonlító és mérősugár kompenzálható elektromos úton vagy optikailag (ékkel, rotáló szektorral). Nálunk RAPPAY (34), BOZSIK (3) és magunk (13) alakítottunk ki egysugaras MSF-t.

A *kétsugaras* rendszernél (2. ábra) a monochromatorból kilépő fényt két azonos sugárra bontjuk. Az egyik változatlanul halad tovább (összehasonlító), a másik az objektumon át (mérő) jut felváltva az összehasonlító sugárral az érzékelőre. A mérőműszer itt is nullműszer. A két fénysugaras szisztéma előnye, hogy független a fényforrás ingadozásától. A gyakorlatban két megoldással találkoztunk: *a)* két fotocellás typus: itt mindkét fénysugár külön fotocellára esik. Hátránya, hogy a fotocellák állandói, érzékenysége, karakterisztikája



2. ábra

legtöbbször eltérő, ami mérési hibát eredményez. *b)* A váltakozó megvilágítási rendszerrel az előbbi hibáját kiküszöbölhetjük. Itt gyors frekvenciaváltozás után a két sugarat közös fotocellára visszük, ami által az I_1 és I_2 fotoáram modulálva van. A moduláció rotáló szektorral a kiegyenlítés optikai vagy elektromos úton történik. Az extinctiót fénygyengítő berendezésen vagy potenciométeren olvassuk le. Addig egyenlítünk ki, amíg a modulált fotoáramnak nincs már váltóáramú komponense. A mérésnél a tárgyat behelyezve, a mérősugár fényárama megváltozik. Ugyanakkor az erősítőbe épített fénygyengítő berendezés az összehasonlító sugár intenzitását arányosan csökkenti és a mérősugáréval teszi azonossá. Előnye, hogy külső behatások nem zavarják: a kitérés nonlinearitása, a fényforrás instabilitása, az érzékelők eltérő állandói. Pontosan 1%-nál kisebb extinctio itt sem regisztrálható.

Ma már csaknem valamennyi egy- és kétsugaras készülék elektromos úton detektálja a fényabszorpciót. Csak elektromos regisztrálás jön szóba az UV és fluorescens MSF-ben. Látható fényben azonban fotográfiás úton is detektálhatunk (48, 52). A lefényképezett, majd előhívott tárgypont feketedését densitometriásan vagy az ezüst kioldása után kémiailag határozzák meg. Újabban a negatívról speciális előhívóban kék színű nagyítás készül, és az extrahált kék festékanyag koncentrációját fotometriésan határozzák meg.

Fotográfiásan regisztrálnak a mikrospektrográfok is (48). Fényérzékeny emulziójukon rögzítjük a tárgy képét, a megfelelő abszorpciós csíkokat. A lemezek kiértékelése itt is densitometriás. Jelentősége az UV-mikrospektrográfnak van, ami eredményesen használható fluorescens spektrumok analizisében is.

A látható fényben dolgozó MSF legegyszerűbb tipusa az egysugaras LISON-fotométer (25). A mérés direkt módszerrel történik. Ez a hátránya: sötét helyiségben kell dolgozni és nagy projekció esetén a halványan festődő objektum beállítása csaknem lehetetlen. Előnye: a sejtek a projeckiós ernyőn direkt kirajzolhatók, a sejtfelület meghatározáshoz így nem kell fényképfelvételt készíteni.

POLLISTER és RIS (33) készülékénél a tárgypont helyzetét mérőblende (elektronsokszorozó blende) mögött levő, esetenként beiktatható segédtávcsövön át kontrolláljuk. A készülékkel csak ún. „plug" mérés végezhető; az egész sejtnek vagy legalább 2/3 részének a képe egyszerre jut az érzékelőre. Csak homogén objektumoknál alkalmazható.

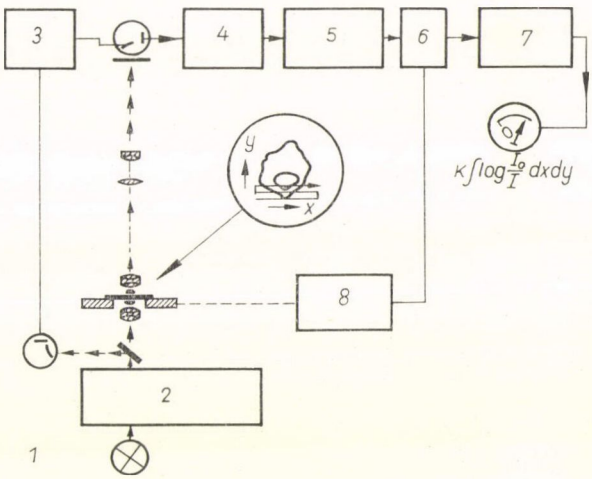
Jobb megoldás, ahol az észlelő okulár fonálkeresztjének metszéspontja a mérőblende centrumával konjugálva van (indirekt mér) (28, 29, 50). Mivel a fény zárt rendszeren jut az érzékelőre, világos helyiségben is mérhetünk. Pont és letapintó mérésre is alkalmas. A sejt méretét vagy projekció után rajzoljuk ki vagy lefényképezzük. Az objektum inhomogenitása miatt az extinctiót a tárgy 5—15 egyedi pontjában határozzuk meg úgy, hogy az asztal elmozdításával a mérendő pontok képét a fix fonálkeresztre állítjuk be. A mért extinctiók számtani középértékét fogadjuk el az objektum extinctiójának.

A biológiai anyag lényegéből következik, hogy a mérési adatok szórása nagy. Ezért igen sok pont mérését kell elvégezni (több ezer), hogy az eredményt a matematikai statisztika értelmében valószínűnek fogadhassuk el. A pontméréssel járó fáradságos munkát ma az automatikusan regisztráló készülékek másodpercek alatt elvégzik helyettünk (3. ábra, CASPERSSON után). A felület és az extinctio értékét, azok szorzatát azonnal megkapjuk, vagy a hullámhossz függvényében folyamatosan mérhetünk. A felület regisztrálását a kép letapogatásával—scannolással oldották meg. A Deeley-készülék pl. 3 mp-en belül adja egy sejtmag extinctiójának középértékét és a látható fénytartományban ma talán a legracionálisabb készülék (48). Tudomásom szerint nálunk az Országos Onkológiai Intézetnek van Deeley-MSF-e.

Az UV-MSF-k kétsugarasak, indirekt módszerrel dolgoznak (19, 21, 41, 44, 46, 51, 56). A tárgyat vagy látható fénnyel, vagy fluoreszkáló ernyőn, UV képátalakítóval állítjuk be. Kizárólag automatikusan regisztrálnak. A preparatum egyenletes és folyamatos mozgatását speciális, a mikroszkópasztalra szerelt motor végzi és az elektronsokszorozó által adott feszültségkülönbséget íróberendezés abszorpciós görbe formájában regisztrálja. Így az automatikus, letapogató—scanning-eljárás segítségével egy adott hullámhosszon, egy sejtben egy bizonyos anyag összmennyiségét határozhatjuk meg. De felvehetjük a sejt

egy bizonyos pontjának abszorpciós görbéjét is oly módon, hogy a mérendő pont fix és a monochromator hullámváltó dobja mozog folyamatosan. CASPERSSON (7) elve alapján építette meg a közelmúltban a Zeiss/Opton (NSZK) Gyár „UMSP" készülékét, ami nálunk a KOKI-ban van.

A MSF továbbfejlesztését jelentette az UV-flying-spot mikroszkóp (27). A készülékkel az ultraibolya sugárra érzékeny élő sejteket, szövettenyészeteket 6—8 órán át folyamatosan vizsgálhatjuk. Ennél a megoldásnál, az előző rendszerekkel szemben a tárgy fix, nem mozog. A tárgynak a letapogatása ponton-



3. ábra. Gyors, scanning és integráló, nagy feloldású univerzálmikrospektrofotométer (UMSP) felépítésének vázlata. 1. Xenon- vagy higanylámpa, 2. monochromator, 3. nagyfeszültségű tápegység, 4. lineáris erősítő, 5. logaritmikus műveleti erősítő, 6. kapuáramkör, 7. integrátor, 8. *x* és *y* irányú tárgyasztal mozgató egység

ként történik raszterszerűen mozgó UV sugárponttal. Az UV sugárral átvilágított felülettel szemben a televíziós technikában használt képorthicon vagy vidicon cső szolgál regisztráló gyanánt. A tárgy képének visszaalakítása zárt láncú televíziós rendszerrel történik.

A módszer lényegéből következik, hogy az UV fény a képmezőnek csak egy-egy pontját érinti és az 1″-re eső megvilágítás erőssége a raszterpontok számának növelésével egyre csökken. A normál TV szisztéma adatait figyelembe véve a tárgy folyamatos UV megvilágításával, expozíciójával szemben itt a szakaszos megvilágítás miatt a tárgy az UV sugárbehatásnak csak 1/2-milliomod részét kapja.

A mérések értékelése, számítása

Az objektum anyagtartalmának, mennyiségének abszorpció útján történő meghatározásához ismernünk kell a tárgy extinctióját és felületét. Az előbbit „plug", pont, scanning-méréssel, az utóbbit általában planimetriásan határozzák meg. Ezen adatokból a Lambert—Beer—Bouger-törvény érvényességének szem előtt tartásával (extinctio (E) egyenesen arányos az abszorbeáló molekulák koncentrációjával (c) és a rétegvastagsággal (d), vagyis $E = e_m \cdot c \cdot d$, ahol e_m a moláris extinctiós koefficiens) kiszámítható az objektum-sejtmag összes abszorbeáló anyagmennyisége (41).

Tegyük fel, hogy a v térfogatú sejt abszorbeáló össz-anyagmennyisége m, úgy $m = v \cdot c$, illetve a Lambert—Beer—Bouger-összefüggésből a c-t kifejezve és behelyettesítve

$$m = \frac{1}{e_m} \cdot \frac{v \cdot E}{d}$$

Ha vizsgálandó sejtet planparalel lemeznek tételezzük fel, melynek alapterülete A és magassága, vastagsága d, úgy

$$m = \frac{1}{e_m} \cdot A \cdot E$$

Az m kiszámításához az A és E értékét közvetlen mérhetjük. Az e_m azonban ismeretlen. Ez az a pont, amiért (elsősorban a látható fényben) az MSF a makrospektrofotometriával szemben csak megközelítő értékeket szolgáltat. Ma még nincs lehetőségünk, hogy a biológiai objektum molekuláris vagy specifikus extinctiós koefficiensét meghatározzuk. Ez fokozottan érvényes festett készítményeknél, ahol nem ismerjük pontosan a substrát festék kötési viszonyát, stöchiometriáját. Ha betartjuk azonban a festési módszerekre megadott irányelveket és reprodukálható eredményeket kapunk, úgy a kötött festék abszorpciója a substrát viszonylagos mennyiséget reprezentálhatja. Ezért festett készítményeknél az anyagmennyiséget, m-t a felület és extinctio középértékének szorzatával jellemezzük, amit a német irodalom AE (Arbeitseinheit), az angolszász AU (arbitrary unit), míg a magyar ME (munkaegység)-gel jelöl.

UV fényben a biológiai anyagok erősen abszorbeálnak. Ezért itt lehetőség van megközelítően abszolut mennyiségük meghatározására. A szöveti DNS molsúlya nem ismert. A számítások szerint a nukleinsavaknál 10% átlag foszfortartalmat véve a specifikus extinctiós koefficiens 260 mμ-nál 20 000 körül mozog. A szöveti fehérjéknél 280 mμ-nál (átlagban 3—6% tyrosin, 1—4% triptofán tartalommal) ez az érték egy nagyságrenddel kisebb. A számításnál nem szabad figyelmen kívül hagyni az aspecifikus fényelnyelést sem, ami a rövid hullámtartományban egyre nagyobb. Nagyságát a 313 mμ-nál mért abszorpcióval fejezzük ki.

A nukleinsav és fehérje extinctio középértékének kiszámításához minden sejtnek meghatározzuk 265, 280 és 313 mμ-nál az extinctioját. Ebből és a specifikus extinctios koefficiensből az alábbi képletek szerint számítható a nukleinsav és fehérje koncentráció.

$$E_{265} = K_{NS} \cdot e'_{265\,NS} + K_{feh} \cdot e'_{265\,feh}$$
$$E_{280} = K_{NS} \cdot e'_{280\,NS} + K_{feh} \cdot e'_{280\,feh}$$

ahol:

E_{265}, ill. E_{280} = a mért extinctiók
K_{NS}, K_{feh} = a nukleinsav és fehérje koncentráció,
e' = specifikus extinctiós koefficiens.

A nukleinsav összmennyiségét ezután az aspecifikus abszorpció figyelembevételével az $m = \frac{1}{e'} \cdot AE$ és a két előbbi egyenletéből nyert egyszerűsített képlet alapján számíthatjuk.

$$m_{NS} = \mu^2 (0{,}92\ E_{265} - 0{,}75\ E_{280} - 0{,}25\ E_{315}) \cdot 10^{-12}\ g.$$

Hasonló egyenlet állítható fel fehérjére is, ahol azonban az alacsony extinctiós coefficiens, másrészt az erősen változó aminosav összetétel miatt az eredmények erősen közelítők.

Az abszorpcios spektrumok ábrázolásánál az ordinátán a mért extinctiót vagy annak logaritmusát tüntetjük fel a hullámhossz függvényében.

A mérések reprodukálhatósága $\pm 1-5\%$ közt variál.

A MSF hibaforrásai

Tanulmányok, symposiumok foglalkoztak a múltban az MSF hibaforrásaival, ezért csak vázlatosan tekintjük át (29, 44, 48). A legfontosabbakat az 1. táblázat mutatja.

1. táblázat

Hibaforrások

1. *Optikai berendezésben*
   - megvilágítás: Köhler-elv
   - kondenzor n. a.
   - látótér blende
   - okulár, objektív } milyensége, n. a., Abbe-féle sinustörvény
   - fókuszhatás (mélységélesség)
   - szórt fény: Schwarzschild—Villiger-effektus
2. *Mérőberendezés saját hibája*
   - mérőblende átmérő
   - elektronsokszorozó sötétáram
   - stabilitás-reprodukálhatóság
3. *Objektumban*
   - az anyag inhomogenitása
   - minimális tárgynagyság
   - fénytörés
   - fényvisszaverődés
   - fényelhajlás
   - fényszórás
   - fixálás
   - metszetvastagság
4. *Méréstechnikai-számolási hiba*
   - a) A készülék megfelel-e a spektroszkópos követelményeknek (didym üveg)
   - b) Tükrözi-e a biológiai objektumban a mennyiségi viszonyokat (test-preparátum)

A kondenzor numerikus apertúrája alacsony, 0,2—0,3 közt legyen, mert ferde megvilágítás esetén az elméletinél magasabb abszorptiót kapunk.

A látótér blende a lehető legkisebb legyen, 30—50 μ közt. Kis blendével a szórt fényből eredő hiba lecsökkenthető. Emellett ügyelni kell, hogy az extinctio 1,0-nél ne legyen magasabb.

Általában 100× objektív nagyítást alkalmazunk, a láthatóban ma kizárólag aplanat lencséket. Az UV tartományban a kvartzlencséket tükröoptika váltotta fel, de jól alkalmazhatók az achromatok az egész spektrumban.

Míg a kondenzornál a kis numerikus apertura a követelmény (párhuzamos megvilágítás), az objektív numerikus aperturája nagy legyen. Az ilyen lencse a metszet által eltérített fény legnagyobb részét összegyűjti és a mért értékek nem lesznek túl magasak. További követelmény, hogy a tárgyból kilépő összes fénysugár a képben egyesüljön: Abbé-törvény. A mélységélesség a 0,2—0,3 numerikus aperturájú kondenzor mellett kedvező.

A Schwartzschild—Villiger-effektus: világos környezetben levő magas extinctiojú objektumok extinctiója a fényszórás következtében az elméletinél kisebb. Látható fényben ez nem vezet nagy hibához és könnyen kiiktatható, az UV-ban azonban egyik legjelentősebb hibaforrás.

A szórt fény mellett az anyag inhomogenitása okozhat nagy hibát (30). Ez függ a tárgy részecskéinek nagyságától, eloszlásától és a fotométer-blende átmérőjétől. Legkönnyebben úgy küszöbölhetjük ki, ha kis fotométer-blendével (0,5 μ) sok pontot mérünk, vagy scanning módszerrel dolgozunk. PATAU (31), POLLISTER és ORNSTEIN (32), majd VAN DUIN (48) az inhomogenitásból (és szórt fényből) eredő hiba kiiktatására két hullámhossznál mér. Mindkét hiba annál nagyobb, minél kevésbé transzparens az objektum. Ez úgy csökkenthető le (erős festékkötés esetén), ha a festék abszorpciós maximumánál kisebb hullámhossznál ($\lambda/2$) is mérünk. Az extinctiókból, megfelelő táblázat alapján következtethetünk a kötött festérek, a relatív anyagmennyiségre.

A legkisebb tárgy, amit mérhetünk a fény hullámhosszának 3—4×-e lehet. Kis részecskék esetén fényszórás lép fel, és a visszafelé haladó fény hibás abszorpciós értékhez vezet.

Az objektumban keletkező fényvisszaverődés, elhajlás, fénytörés a törésmutató függvénye. A törésmutató különbségeket optimálisan választott mediummal a minimumra csökkenthetjük (42).

Fényszórás az objektumban is fellép: nagysága a tárgy részecskéinek, a hullámhossznak és a törésmutató különbségeknek a függvénye. Mindenképp fényveszteséghez vezet, és így a tárgy abszorpciója nagyobb lesz.

Egyes fixálók anyagveszteséghez vezetnek, mások zsugorítanak, ami ugyancsak extinctio emelkedéshez vezet. Carnoy-rögzítés után fokozódik az anyag optikai és struktúrális inhomogenitása. Hődenaturáció, kémiai fixáló is megváltoztatja az anyag abszorpcióját, az egyes komponensek UV extinctiós koefficiensét.

A metszetvastagságot általában a fókuszálással határozzák meg, de pontosabb az interferenciamikroszkópos mérés (55).

Könnyen ellenőrizhetjük, hogy készülékünk megfelel-e a spektroszkópos követelményeknek. Ismert test-objektum, pl. BG 36-os a didym üveg abszorpcióját mérjük át. Ideális esetben (monochromatorral dolgozva) visszakapjuk a didym üveg jellemző abszorpciós spektrumát. A mérési eredményeket úgy is ellenőrizhetjük, ha a vizsgálandó anyagot konstans mennyiségben tartalmazó objektumot (általában bikaspermiumot) mérünk a tesztelendő készülékkel, vagy az eredményeket a kémiai meghatározások adataival vetjük össze.

A fentiekből láthatjuk, hogy a MSF hibaforrásai részben a mikroszkóp optikára, részben az objektum fizikai-optikai és kémiai tulajdonságaira vezethetők vissza. A mikroszkópos rendszernek ezért meghatározott feltételeknek kell eleget tenni, a biológiai objektumból eredő zavaró hibákat a minimumra kell redukálni, hogy megbízhatóan mérhessünk és jó eredményeket kapjunk.

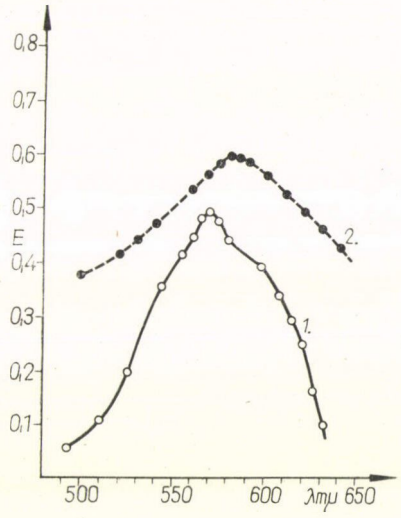
II.

Alkalmazott mikrospektrofotometria

Alig van a biológiának területe, ahol ne történt volna MSF-s vizsgálat. Kétségtelenül legtöbb a nukleinsavakkal kapcsolatos közlés és csak kisebb számban találunk a fehérjékre és a többi biológiai makromolekulára vonatkozó

adatot. Ennek oka a nukleinsavak karakterisztikus UV abszorpciója, másrészt hogy a Feulgen-reakcióval a DNS, a gallocyanin-chromolaun (GC) festéssel pedig az RNS is elektive feltüntethető és MSF-n meghatározható.

Magunk a nukleinsavak hisztokémiája és szubmikroszkópos szerkezetanalizise során jutottunk el olyan problémákhoz, melyre választ csak kvantitatív citológiai analizistől, MSF-s vizsgálattól remélhettünk. Ez bátorít fel, hogy a módszert a gyakorlatban saját kísérleti eredményeinken keresztül mutassam be.



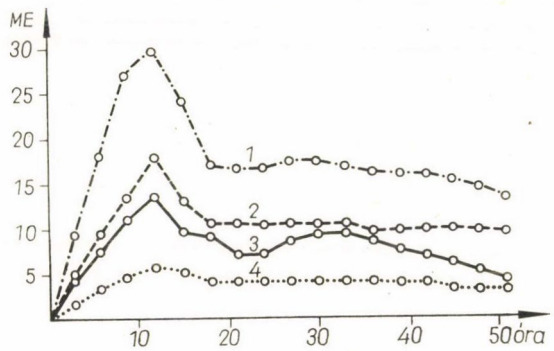
4. ábra

A Feulgen-reakció tanulmányozása során célul tűztük ki a sejtmagokban, a DNS molekulában bekövetkező mikrostruktúrális és kémiai változás vizsgálatát (12, 47). Feltételezve, hogy a sejtmagok hidrolizise során is a redukáló sajátságú apurinsav keletkezik és felelős a Feulgen—Schiff-reakció pozitivitásáért, a thymusmagok frakcionált hidrolízisét az apurinsav in vitro előállítására használt pH 1,2 HCl-el 37° C-on végeztük. A redukáló aldehid-csoportokat Schiff-festés után 570 mμ-nál, a DNS-foszfát csoportjait GC-vel 500 mμ-nál, míg a purin-pyrimidin bázisok mennyiségét UV-ben mértük mikrospektrofotometriásan. A mikrostrukturális változást polarizációs optikai módszerrel követtük.

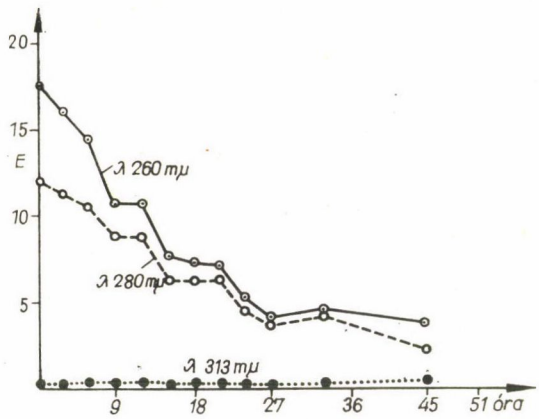
A festékek tisztaságának ellenőrzésére, másrészt abszorpciós maximumuk meghatározására először felvettük a bázikus fuchsin (4. ábra 1. görbe) és a GC (4. ábra 2. görbe) abszorpciós spektrumát, ami az irodalmival jól egyezett. A kvantitatív méréseknél a láthatóban 50, az UV-ben 10 sejt abszorpcióját határoztuk meg és átlagértéküket grafikusan, histogramokban ábrázoltuk.

A következőkben meghatároztuk különböző DNS tartalmú sejtek hidrolizis maximumát. Ez 12 óránál volt. Majd megvizsgáltuk, hogy a hidrolizismaximum festékmennyisége korrelációban áll-e a sejtek biokémiai úton meg-

határozott DNS tartalmával (53, 54) (5. ábra). Az egyezés általában jó volt. Tyúk magvas vörösvérsejtjeiben (5. ábra 4. görbe) a DNS tartalom alapján számított 9 ME helyett 5 ME-t, pisztrángnál (5. ábra 3. görbe) 15 ME helyett 13,5 ME-t, békánál (5. ábra 1. görbe) 36 ME helyett 30 ME mértünk. A diploid thymuslymphocyták (5. ábra 2. görbe) 17 ME-t adtak 18 ME helyett. A hidro-



5. ábra



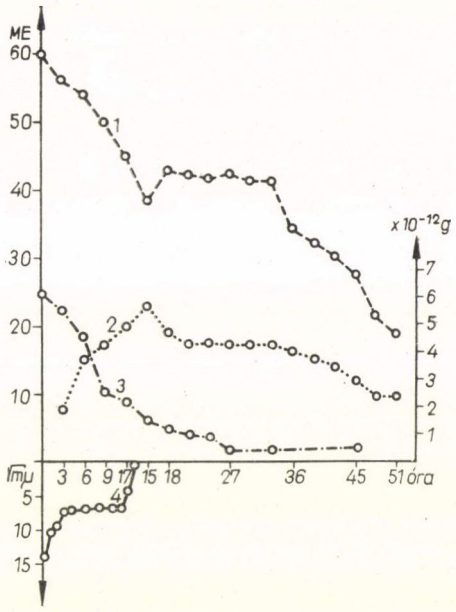
6. ábra

lizis görbék szerint tehát a különböző DNS tartalmú sejtek által kötött festék arányos a sejtek DNS tartalmával. A gyenge, pH 1,2-s sósavas Feulgen-hidrolizis tehát alkalmas a sejtmagok relatív DNS tartalmának meghatározására.

A 6. ábra a thymuslymphocyták UV abszorpciós spektrumát mutatja a hidrolizis időfüggvényében 260, 280 és 313 mμ-nál. Ezen adatokból számítottuk a korábban megadott képlet alapján, a DNS abszolut mennyiségét. A 7. ábra 3. görbéje a bázisok progresszív csökkenését mutatja a hidrolizissel; 27 óra után már nem észleltünk UV abszorpciót. A 7/1 görbe a tosfátcsoportok, a 7/2 a Schiff-reakció, a 7/4 a kettőstörés alakulását mutatja a hidrolizis

előrehaladásával. A kettőstörés görbe szerint a Schiff-reakció maximumánál (13 óra) a DNS depolimerizálódott. Erre utal, hogy a foszfátcsoportok (GC), másrészt a bázisok mennyisége (UV) itt ugyancsak lecsökkent. Ebből valószínűsítettük, hogy a Feulgen-reakcióért a struktúrálisan degradált DNS származék, depolimerizátum, az apurinsav a felelős.

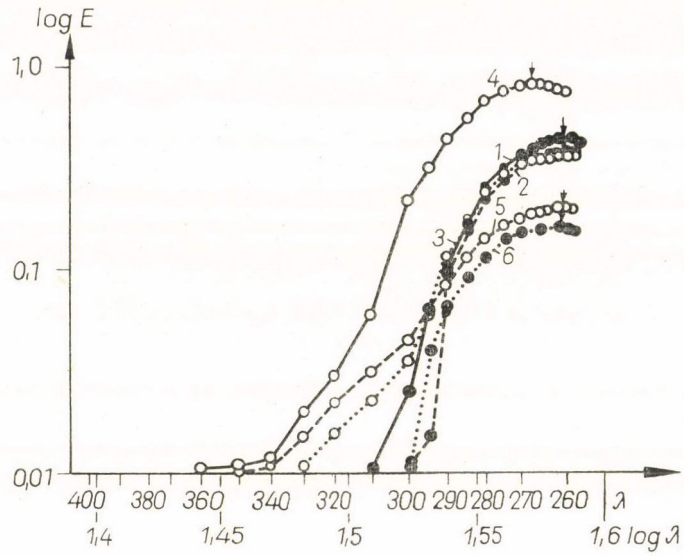
A 8. ábra fixálás, trypsin és desoxyribonuclease emésztés után mutatja a thymusmagok nukleinsavtartalmát (17). Fixálatlan, alkohol és vízgőzzel



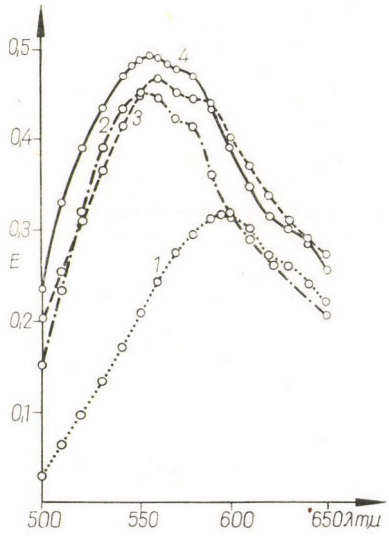
7. ábra

kezelt thymuslymphocyták UV spektruma igen hasonló (8. ábra, 1, 2, 3). Ha az előbbi magokat formalinnal utófixáljuk (8/4. görbe), alapvetően megváltozik az UV spektrum: az abszorpció 280 mμ-nál megemelkedik, az abszorpciós maximum pedig 260 mμ-ról 268-ra tolódik el. Trypsinkezelésre (8/5. görbe), vagyis fehérjeeltávolítás után az abszorpciós görbe és maximuma a kiindulásihoz közelálló értékre tér vissza. Ez arra utal, hogy a formalin elsősorban a magfehérjékkel lép reakcióba és csak másodlagosan hat ki a nukleinsav komponensre. Mind trypsin, mind az enyhe DNA-se (8/6. görbe) emésztés után nukleinsav veszteséget találtunk (csökkent abszorpcio 260 mμ-nál).

A feltételezést, hogy formalin hatására megváltozik a fehérje-nukleinsav kapcsolat a toluidinkék festékkötési vizsgálatok is valószínűsítették (16). Megváltozik nemcsak a kötött festék mennyisége, de minősége is. A színváltozást, a metakromáziát MSF-sen objektíven kimérhetjük. A fixálatlan magok 595 mμ-s maximumával szemben (9. ábra 1. görbe) formalin-fixálás után



8. ábra

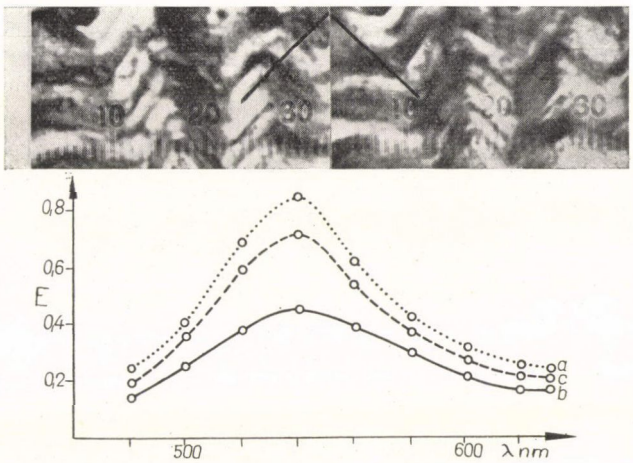


9. ábra

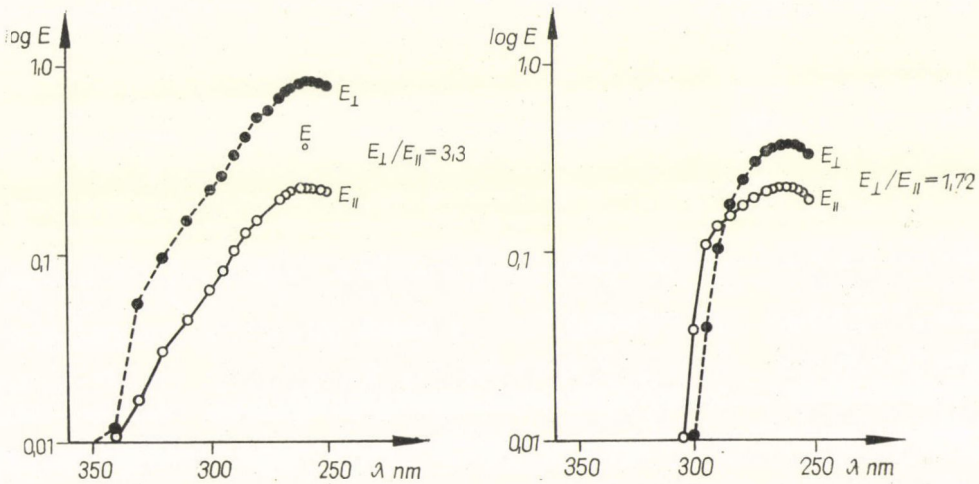
550 mμ (9. ábra 2. görbe), alkoholfixálás után (9. ábra 4. görbe) 555 mμ-nál volt az abszorpciós maximum. A magok sókezelése után (9. ábra 3. görbe) ugyancsak metachromasiás színeffektus lép fel 560 mμ-os abszorpciós maximummal.

Mikrospektrofotometriásan a biológiai struktúráknak nemcsak metachromasiáját, de orientált fényabszorpcióját, dichroismusát is meghatározhatjuk,

ha a tárgyat lineárisan polarizált fénnyel világítjuk meg (37, 38). A dichroismus előjeléből és nagyságából színes objektum esetén a festékmolekuláknak, festetlen anyagnál UV-fényben a substrat fényabszorbeáló kötéseinek orientációjára következtethetünk. A 10. képet Romhányitól vettem át (36); pH 4-s toluidin-



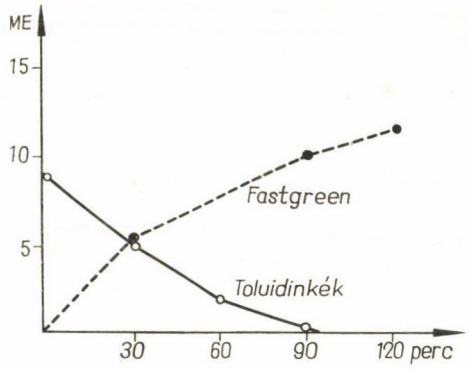
10. ábra



11. ábra

kékkel metachromasiásan festett cornea rostok felvételét mutatja 540 mμ-nál. A rostok ott sötétek, ahol lefutásuk a fény rezgéssíkjára merőleges (negatív dichroismus). A MSF-s mérések szerint a fényabszorpció lényegesen kifejezettebb, ha a fény rezgéssíkja a rosttengelyre merőleges (10/a görbe), mint paralel (10/b) helyzetben. Az a és b hányadosa adja a dichroismus nagyságát. A 10/c görbe a nem polarizált fény abszorpciója, ami megfelel az a és b középértékének.

A nukleinsavak UV dichroismusát UMSP/Opton készülékben mértük (18). A fényt Glan-prizmával polarizáltuk. A 11. ábrán a baloldali görbék DNS fonalak dichroismusát tüntetik fel. A dichroikus ratio 3,3, ami nagytisztaságú és polimer DNS-re utal. A jobboldali görbék bikaspermium adatait mutatják. Itt az alacsonyabb dichroikus ratio (1,7) mellett a fehérje deformálja az abszorpciós görbét. Feltételezhető ezért, hogy a gyűrűs aminosavak orientáltan épülnek



12. ábra

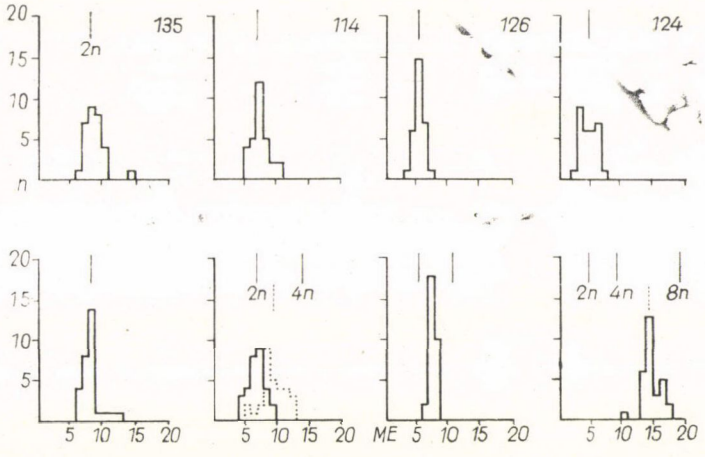
be a DNS molekula köré. Érdekes, hogy az $E_{\perp}$ görbe 285 mμ-nál keresztezi az $E_{||}$-t. Ez viszont arra utal, hogy a spermiumban a gyűrűs aminosavak orientációja eltér a DNS-étől.

A metachromasiával és dichroismussal kapcsolatos példák azt mutatják, hogy a MSF-a mikrostruktúrális kérdésekre is felvilágosítást nyújthat és ezért a szubmikroszkópos szerkezetkutatás hasznos kiegészítő módszereként tekinthető.

Végül bemutatnám, hogy egy kvalitatív histokémiai, methodikai kérdés, ha azt kvantitatív szempontból analizáljuk, mélyebb biológiai felismeréshez vezethet. A nukleoproteinek in situ alkilálására a diazometánt (DM) találtuk a legjobbnak (13). A histofotometriás vizsgálatok szerint az alkylálás előrehaladásával csökkent a magok bázikus és emelkedik savi festékkötése (12. ábra). Ebből a MSF-s adatból arra gondoltunk, hogy diazometánnal elsősorban a DNS negatív foszfátcsoportjai alkylálódnak (14). Nem volt kizárható azonban, hogy emellett a basisok is metilálódtak, amint azt később igazolni is sikerült. Az alkylált bázisok felismerése vetette fel, hogy a DM esetleg in vivo is metilálhatja a DNS-t és ezáltal megváltoztathatja a genetikus kódot. Állatkísérleteink ezt a feltevést megerősítették. Patkányban i. v. vagy i. p. adott nitrosomethylureaval (a diazometan előanyaga) különböző szervi tumorokat idéztünk elő (15). A 13. ábra ilyen indukált tumorok DNS histogramját mutatja. A Feulgen-MSF-s mérések szerint a daganatok egy részének DNS mennyisége azonos diploid a (2 n) kontorollal [felső sor], míg a szövettani-

lag éretlen tumorok DNS tartalma emelkedett, ami aneuploid chromosomaszámra utal. A MSF így hasznos felvilágosítást adhat a szöveti atipia fokára vonatkozóan is.

Befejezésként a mikrospektrofotometria perspektívájáról: a spektrum látható és UV tartományában a mai készülékek feloldás, pontosság tekintetében az elméletileg elérhetőt nyújtják. Az infravörös tartományban még nagy



13. ábra

fejlődés várható. Számos szöveti építőkő, vegyület van, melynek nem tanulmányozták még sem a kvalitatív, sem a kvantitatív optikai sajátságait. Az ultramikro módszerekben rejlő lehetőségeket még egyáltalán nem használták ki. A festési, histokémiai reakciók zömét sem alkalmazták a MSF-ban. A kvantitatív fermenthistokémia területén pedig a lehetőségek szinte beláthatatlanok.

IRODALOM

1. Bosshar, U.: Fluoreszenzmikroskopische Messung des DNS-Gehaltes von Zellkernen. Zschr. f. wiss. Mikr. u. mikr. Techn. **65,** 391—408 (1964).
2. Boyer, G., Cecilie Leuchtenberger, Ginsberg, H. S.: Cytological and Cytochemical Studies of Hela Cells Infected with Adenoviruses. J. Exp. Med. **105,** 195—216 (1957).
3. Bozsik Gy.: Adatok a korai idegsejtelváltozásokhoz kísérletes anoxyában. Kandidátusi értekezés, Budapest (1967).
4. Caspersson, T.: Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. Skand. Arch. Physiol. **73,** Suppl. 8. (1936).
5. Caspersson, T.: Methods for the Determination of the Absorption Spectra of Cell structures. J. Roy. Micr. Soc. **60,** 8 (1940).
6. Caspersson, T. O.: Cell growth and Cell Function. New York, Norton and Co. (1950).
7. Caspersson, T., Jacobsson, F., Lomakka, G.: An Automatic Scanning Device for Ultramicrospectrography. Exp. Cell. Res. **2,** 301 (1951).
8. Caspersson, T., Landstrom-Hydén, H., Aquilonius, L.: Zytoplasma-Nukleotide in eiweissproduzierenden Drüsenzellen. Chromosoma **2,** 111—131 (1941).
9. Caspersson, T., Schultz, J.: Pentosenucleotides in the Cytoplasm of Growing Tissues. Nature **143,** 602 (1939).

10. CASPERSSON, T., THORELL, B.: Der endozelluläre Eiweiss- und Nukleinsäurestoffwechsel im embryonalen Gewebe. Chromosoma **2,** 132—154 (1941).
11. FORD, M. A., PRICE, W. C., SEEDS, W. E., WILKINSON, G. R.: Double-Beam Infrared Microspectrometer J. Optical Soc. of America **48,** 249—254 (1958).
12. JOBST, K.: Polarisationsoptische Beobachtungen über die Beziehungen der Feulgenschen Reaktion zur Apurinsäure. Acta histochem. **11,** 222—229 (1961).
13. JOBST, K.: Quantitative cytophotometric determination of nuclear proteins after alkylation. Acta morph. XIII, 301—309 (1965).
14. JOBST, K.: The effects of methylation on the chemical and submicroscopic structure of tissue nuclei (DNA). Acta Biol. Hung. **16,** 113—123 (1965).
15. JOBST K., GLÁVICS I., SZOKOLICS J.: Az alkyláló N-methyl-N-nitrosomethylcarbamiddal (NMC) előidézett kísérletes patkánytumorról. Magyar Onkológia: közlés alatt (1967).
16. JOBST, K., SANDRITTER, W.: Über die Beeinflussung der Farbbindung von Toluidinblau und Gallocyaninchromolaun mit Nukleoproteiden (Cytophotometrische Untersuchungen). Acta histochem. **11,** 276—283 (1961).
17. JOBST, K., SANDRITTER, W.: Versuche zur quantitativen Erfassung von Nucleoproteiden an Thymuslymphocyten: Cytophotometrische Messungen im ultravioletten Licht. Acta histochem. **21,** 165—171 (1965).
18. JOBST, K., SANDRITTER, W.: Messungen des Dichroismus im ultravioletten Licht mit dem UMSP I. Zeiss-Mitteilungen **3,** 386—391 (1965).
19. KING, R. J. und ROE, E. M.: Optical conditions for quantitative ultraviolet microspectroscopy. J. Roy. Micr. Soc. **73,** 82 (1953).
20. KRUG, H.: Arbeitsbesprechung für Mikrophotometrie der Arbeitsgemeinschaft Morphologie in der DDR. Acta histochem. **22,** 179—208 (1965).
21. KRÜGER, H. G.: Das neue Leitz-Ultraviolett-Mikroskop. Acta histochem. **13,** 317—322 (1962).
22. LEUCHTENBERGER, C., LEUCHTENBERGER, R.: DNA in Tumors and Virus Infections. Handbuch der Histochemie, Bd. III. Ed. Graumann, W. und Neumann, K., Fischer, Stuttgart, 1—53 (1966).
23. LEUCHTENBERGER, C., LEUCHTENBERGER, R., VENDRELY, C., VENDRELY, R.: The quantitative estimation of desoxyribose nucleic acid (DNA) in isolated animal nuclei by the caspersson ultraviolet method. Exp. Cell. Res. **3,** 240 (1952).
24. LEUCHTENBERGER, C., WEIR, D. R., SCHRADER, F., LEUCHTENBERGER, R.: Decreased amounts of desoxyribose nucleic acid (DNA) in male germ cells as a possible cause of human male intertility. Acta Genetica et Statistica Medica **6,** 272—278 (1956).
25. LISON, L.: Étude et réalisation d'un photomètre à l'usage histologique. Acta Anat. **10,** 333—347 (1950).
26. MATIOLI, G., BRODY, S., THORELL, B.: Microspectrophotometric Determination of Differentially Extracted Haemoglobin in Single Erythrocytes. Acta Haematologica **28,** 73—85 (1962).
27. MONTGOMERY, P. O. B., ROBERTS, F. und BONNER, W.: The flyingspot monochromatic ultraviolet television microscope. Nature **177,** 1172 (1956).
28. NAORA, H.: Microspectrophotometry and cytochemical analysis of nucleic acids. Science **114,** 279 (1951).
29. NAORA, H.: Microspectrophotometry in visible light range (Handbuch der Histochemie, I/1, Ed. Graumann, W. und Neumann, K., Fischer, Stuttgart, 192—219 [1958].)
30. ORNSTEIN, L.: The Distributional Error in Microspectrophotometry. Lab. Invest. **2,** 250—265 (1952).
31. PATAU, K.: Absorption microphotometry of irregular-shaped objects. Chromosoma **5,** 341—362 (1952).
32. POLLISTER, A. W., ORNSTEIN, L.: Cytophotometric analysis in the visible spectrum. In R. C. Mellors „Analytical Cytology". McGraw Hill N. Y. (1955).
33. POLLISTER, A. W., RIS, H.: Nucleoprotein determination in cytological preparations. Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol., **12,** 147 (1947).
34. RAPPAY GY.: Átalakított Lison-típusú histofotométer. Morph. és Ig. Orv. Szemle, **2,** 41—45 (1962).
35. RAPPAY GY.: Citológiai mérőmódszerek. MTA Biol. Tud. Osztályközleményei **7,** 329—340 (1964/65).
36. ROMHÁNYI, G.: Über die submikroskopische strukturelle Grundlage der metachromatischen Reaktion. Asta histochem. **15,** 201—233 (1963).
37. RUCH, F.: Eine Apparatur zur Messung des Ultraviolettdichroismus von Zellstrukturen. Exp. Cell. Res. **2,** 686 (1951).

38. RUCH, F.: Birefringence and dichroism of cells and tissues. In: Physical Techniques in Biol. Res. **III,** 149 (1956).
39. RUCH, F., BOSSHARD, U.: Photometrische Bestimmung von Stoffmengen im Fluoreszenzmikroskop. Zschr. Wiss. Mikr. u. mikr. Techn. **65,** 335—341 (1963).
40. SANDRITTER, W.: Ultraviolettmikrospektrophotometrische Untersuchungen an Plattenepithel. Frankf. Z. Path. **64,** 520 (1953).
41. SANDRITTER, W.: Ultraviolettmikrospektrophotometrie. (Handbuch der Histochemie, I/1, Ed. Graumann, W. und Neumann, K., Fischer, Stuttgart, 220—338 [1958].)
42. SANDRITTER, W.: Über Einschlussmedien für die Photometrie im sichtbaren und ultravioletten Licht. Acta histochem. **9,** 192—193 (1960).
43. SANDRITTER, W.: Übersicht verschiedener Gerätetypen für die Photometrie im sichtbaren und ultravioletten Licht. Acta histochem. **9,** 135—162 (1960).
44. SANDRITTER, W.: Kolloquium über „Physikalischoptische Methoden in der Histochemie". Acta histochem. **9,** 97—168 (1960).
45. SANDRITTER W.: A kvantitatív hisztokémia problémái. MTA Biol. Csop. Közl. **IV,** 255—279 (1960).
46. SANDRITTER, W.: Ultraviolettmikrospektrophotometrie „First International Congress of Histochemistry and Cytochemistry". Pergamon Press Oxford—London—New York—Paris, pp. 33—61 (1963).
47. SANDRITTER, W., JOBST, K., RAKOW, L., BOSSELMANN, K.: Zur Kinetik der Feulgenreaktion bei verlängerter Hydrolysezeit. Histochemie **4,** 420—437 (1965).
48. SANDRITTER, W., KIEFER, G.: Methoden und Ergebnisse der Zytophotometrie und Interferenzmikroskopie. Acta histochem. Suppl. VI. (1965).
49. SANDRITTER, W., MÜLLER, D., SCHAFER, H., SCHIEMER, H. G.: Histochemie von Sputumzellen: II. Quantitative ultraviolettmikrospektrophotometrische Nucleinsäurebestimmungen. Frankf. Z. Path. **68,** 710 (1958).
50. SANDRITTER, W., SCHIEMER, G., MÜLLER, D., SCHRÖDER, H.: Aufbau und Betrieb eines einfachen Mikrospektrophotometers (Cytophotometer) für sichtbares Licht. Z. wiss. Mikr. **63,** 453—476 (1956/58).
51. SCHUBERT, W.: Beschreibung eines Cytophotometers für ultraviolettes und sichtbares Licht zur Messung von Spektralkurven. Inaugural-Dissertation. Frankfurt am Main (1961).
52. TONKELAAR, E. M., DUIN, P. VAN: Photographic colorimetry as a quantitative cytochemical method. I. Principles and practice of the method. Histochemie **4,** 1—9 (1964).
53. VENDRELY, R., KNOBLOCH-MAZEN, A., VENDRELY, C.: Données biochimiques récentes sur la relation entre acide désoxyribonucleique et protéines basiques dans le noyau. Biochem. Pharmacol. **4,** 19—28 (1960).
54. VENDRELY, R., VENDRELY, C.: Arginine and deoxyribonucleic acid content of erythrocyte nuclei and sperms of some species of fiches. Nature (Lond) **172,** 30—31 (1953).
55. WEISSBACH, S.: Das Problem der Schnittdickenbestimmung. Acta histochem. **9,** 183—197 (1960).
56. ZANOTTI, L.: Istofotometro universale per fotometria normale ed U. V., assunzione di curve die assorbimento e di fluorescenza in luce trasmessa e riflessa. Acta histochem. **11,** 239—265 (1961).

AZ ABSZORPCIÓ, OPTIKAI FORGATÁS ÉS CIRKULÁR DICHROIZMUS ALKALMAZÁSA A FEHÉRJE SZERKEZETKUTATÁSBAN

ELŐDI PÁL

MTA Biokémiai Intézete, Budapest

A spektrum ultraibolya és látható szakaszán végzett optikai vizsgálatok a fehérjék szerkezetének felderítésére irányuló munkában többféle feladat megoldását teszik lehetővé. A fehérjék szerkezetének megismeréséhez ma, a többi között, a következő kérdésekre várunk választ:

1. Milyen a különféle polipeptid láncok konformációja? Direkt és teljes választ erre a kérdésre a fehérjekristályok röntgen diffrakciós vizsgálata ad, mely a polipeptid lánc háromdimenziós szerkezetének pontos leírására alkalmas.

2. Mi szabja meg a polipeptid lánc adott szerkezetét, s e szerkezet milyen határok között változhat? Ezek a tényezők jobbára elméleti meggondolások alapján a kötési szögek és távolságok, a rotációs potenciál-barrierek, az oldallánc külcsönhatások figyelembevételével számíthatók.

3. Hogyan változik a konformáció és milyen szerkezeti elemek stabilizálnak valamilyen speciális (pl. natív) állapotot? Milyen jellemző sajátságai vannak a polipeptid láncnak oldatban, mi jellemzi a különféle szerkezeti állapotokat és ezek átmeneteit, hogyan változik a konformáció különböző hatásokra? Ezekre a kérdésekre részben az ismertetendő optikai vizsgálatok adhatnak értékes információt.

A látható és ultraibolya optikai vizsgáló módszerek a közönséges, illetőleg poláros fény és az anyag kölcsönhatása következtében észlelhető jelenségeket alkalmazzák a vizsgált anyag szerkezeti sajátságainak jellemzésére. E jelenségek két nagyobb csoportba oszthatók: *abszorpciós*, ill. *diszperziós* tulajdonságokra és az alábbi I. táblázatban foglalhatók össze (SCHELLMAN és SCHELLMAN, 1964).

I. táblázat

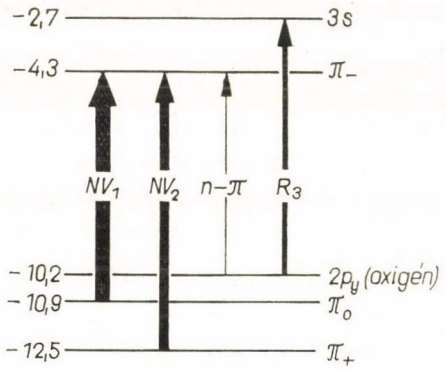
Abszorpciós és diszperziós jelenségek összefüggése
(SCHELLMAN, SCHELLMAN 1964 szerint)

Abszorpció	Diszperzió
Molekuláris extinkció (ε)	Polarizabilitás v. törésmutató (n)
Lineáris dichroizmus ($\varepsilon\parallel - \varepsilon\perp$)	Kettőstörés ($n\parallel - n\perp$)
Cirkuláris dichroizmus ($\varepsilon_j - \varepsilon_b$)	Cirkuláris kettőstörés v. optikai forgatás ($n_j - n_b$)

A táblázatban foglaltak közül csak hárommal foglalkozunk részletesebben, röviden összefoglalva először a jelenségek sajátságait, majd a felhasználásukkal elért néhány fontosabb eredményt.

a) Abszorpció

Ha fény halad át egy közegen, intenzitása tulajdonképpen két ok miatt csökkenhet. Az egyik az, hogy a fény egy része szóródás folytán irányt változtathat. Ez a jelenség nem függ össze az abszorpcióval, csak annyiban, hogy a szóródás az abszorpciós vizsgálatokban hibaforrás lehet.



1. ábra. Amid csoport (mirisztamid) elektron átmeneteinek energia diagramja (PETERSON, SIMPSON, 1957). A numerikus skála elektronvoltokat jelent. A nyilak felelnek meg az egyes átmeneteknek, vastagságuk az intenzitással arányos (l. még WETLAUFER, 1962)

Az eredeti intenzitás csökkenését okozhatja az is, hogy a sugárzó energia egy részét a közegben levő molekulák átveszik, *abszorbeálják*.

Abszorpciónak nevezzük általában a hullám, vagy korpuszkuláris sugárzás intenzitásának közegen való áthatolása következtében történő csökkenését. A látható és ultraibolya fény a molekulák elektronjaival lép kölcsönhatásba, és az elnyelt energia az elektronokat magasabb energiaszintű pályákra mozdítja ki, gerjeszti. Az elektronpályák energiaszintje és a megfelelő hullámhosszú fény energiája között a fényenergia kvantum-jellegéből adódó szoros összefüggés van s ez teszi lehetővé, hogy adott hullámhossznál észlelt elnyelésből a kérdéses elektronátmenetekre (gerjesztésre) következtessünk (1. ábra).

A fény elektromágneses természetének megfelelően a molekulákon belüli lineáris töltéselmozdulás az *elektromos dipolmomentum*, míg az ív, vagy köralakú elmozdulás a *mágneses dipolmomentum*. A közönséges spektroszkópiában az előbbi fontosabb, bár a molekulákban, a töltések komplex mozgása folytán mindkettő előfordul.

Az abszorpciós jelenségekben a következő elektronátmenetet kell figyelembe vennünk: $N \rightarrow V$ *átmenet* esetén az elektron kötő állapotból magasabb

energiaszintre jut, de a molekulát nem hagyja el, pl. egyik molekula pályáról magasabb energiájú pályára lép. Szokás ezt $\pi \rightarrow \pi^*$ átmenetnek nevezni. Ilyen pl. a benzol 250 mμ-nál mutatkozó abszorpciója.

N→Q átmenetről olyan esetben beszélünk, ha az elektron nem-kötő pályáról lép magasabb energiájú pályára a molekulán belül, tehát gerjesztés folytán atomos pályáról jut a magasabb energiájú pályára. Aceton esetében figyelhető meg 280 mμ körül ilyen jellegű, ún. $n \rightarrow \pi^*$ (lokalizált, n nonbonding pályáról delokalizált, gerjesztett π^* pályára való átmenet). Vízgőznek is van hasonló típusú átmenete, mely 170 mμ körüli abszorpcióban jelentkezik és $n \rightarrow \sigma^*$ átmenetnek nevezzük, mert lokalizált n pályáról lokalizált antibonding (σ) pályára jut a gerjesztett elektron.

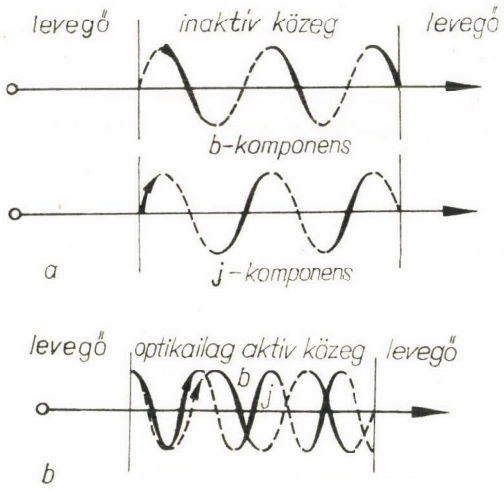
Az N→R elektrongerjesztés olyan nagy energiájú, hogy az elektron kilép a molekula tartományból pozitív töltésű iont hagyva hátra. Megfigyelhető alkali-halidek ultraibolya abszorpciója esetén. Végül megemlíthetjük a *charge-transfer komplexek* esetét, melyben az elektrongerjesztés az egyik molekulában történik s ez kölcsönhatásba jut egy másik molekulával. A két molekula egymással laza elektron donor-akceptor komplexet képez. Minthogy az elektronátmeneteket a közeg (oldószer) is befolyásolja, a közeghatás vizsgálata útján előzetesen tájékozódhatunk az átmenet jellegéről, az elektronszerkezetet illetően. Nagy molekulák esetén, ha felépítő kis molekulák között nincs kölcsönhatás, és ezek orientációja nem rendezett (tehát nincs dichroizmus), hanem statisztikus, a nagy molekula abszorpciója megfelel annak, ami a felépítő elemek abszorpciójából szuperponálódik. Kölcsönhatás és/vagy rendezettség esetében az abszorpcióban járulékos tényezőkkel kell számolnunk. A rendezetlen (denaturált) és a rendezett szerkezetű alak közötti abszorpció különbség teszi lehetővé, hogy az abszorpciós spektrum adataiból szerkezeti következtetéseket tehessünk (1. később).

b) Optikai forgatás

Míg a molekuláris abszorpció (extinkciós koefficiens) vizsgálata ún. közönséges fényben történik, az optikai forgatás vizsgálatának alapja az, hogy a vizsgált anyag (oldat) a poláros fény síkját milyen irányban és milyen mértékben forgatja el. Az optikai forgatás a szerves vegyületek közül azokra jellemző, amelyek aszimmetrikus szénatomot tartalmaznak. Ilymódon, a fénynek a molekula elektronjaira gyakorolt perturbáló hatása a molekulán belüli szimmetria viszonyoktól függ és jellemző a különféle csoportoknak a kötések körüli orientációjára. Ezek változása tükröződik az optikai forgatás változásában is, így a rotációs adatokból következtethetünk szerkezeti sajátságokra. Az összefüggés igen komplex, kielégítő elméletünk még nincs a rotációs és szerkezeti sajátságok kapcsolatának leírására. Ez az egyik oka annak, hogy a rotációs

vizsgálatok szerkezeti értelmezése, különösen makromolekulák esetében, csakis további kiegészítő adatok alapján végezhető el biztonsággal.

A jelenség kvalitatív közelítése a következő meggondolások alapján végezhető el. Fresnel feltevése alapján abból kell kiindulnunk, hogy a lineárisan (síkban) polarizált fény két koherens, egymással ellentétes irányú, cirkulárisan polarizált fénynyalábnak fogható fel (2. ábra). A két fénynyaláb optikailag inaktív (izotrop) közegben azonos sebességgel halad (2. ábra a). Anizotrop közegben a j és b sugár sebessége különböző lehet (2. ábra b) és a két komponens interferálhat egymással.



2. ábra. A lineárisan poláros fény felbontása két cirkulárisan poláros komponensre. a) inaktív (izotrop) közegben. A jelenség valójában a felső és alsó sugármenet szuperziciójával ábrázolható. A vastag vonalak a papír síkja feletti, a szaggatottak a papír síkja alatti rezgéseknek felelnek meg. b) Optikailag aktív közegben a j és b sugár között fáziskülönbség lép fel

Izotrop közegben a j és b komponens haladásának sebessége $v_j = v_b = v_2$. Ez a levegőben való haladás sebességétől, a levegő és a vizsgált anyag közötti törésmutató arányában tér el, tehát

$$v_1 : v_2 = n_1 : n_2$$

(a törésmutatóra érvényes: $N = c/v$, ahol a c sebesség vakuumban) innen

$$n_1 = c/v_1 \text{ és } n_2 = c/v_2$$

Ha a ν frekvencia (rezgésszám/sec) állandó,

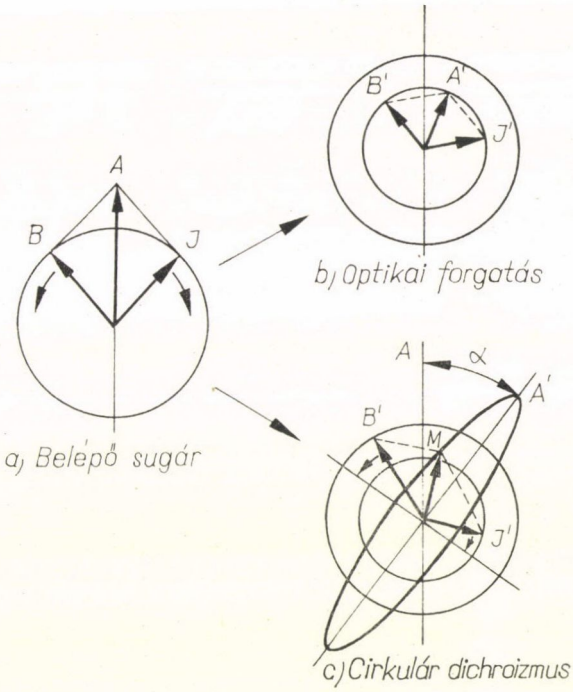
$$\nu = v/\lambda$$

Ebből következik, hogy

$$\lambda_1 : \lambda_2 = v_1 : v_2 = n_1 : n_2$$

ahol λ_1 és λ_2 a hullámhossz levegőben és a vizsgált anyagban.

Anizotrop közegben $v_j \neq v_b$ és $n_j \neq n_b$, végül $\lambda_j \neq \lambda_t$, tehát az optikailag



3. ábra. Optikailag aktív és cirkulár dichroizmust mutató anyagok hatása a síkban poláros fényre (a haladási iránnyal szemben vizsgálva). A belépő (a) lineárisan poláros fény B és J cirkulárisan poláros komponensek eredőjének fogható fel. Optikailag aktív (anizotrop) anyagban (b) a két sugár közötti fáziskülönbség következtében a B′ és J′ kilépő komponensek A' eredője *jobbra* forgat. Dichroizmus esetén (c) a B′ és J′ komponensek amellett, hogy α szöggel elforgatott eredőt adnak, különböző mértékben abszorbeálódnak is és ellipticitás alakul ki

aktív közegben két törésmutatója van a két ellentétesen cirkulár-poláros komponens szempontjából. Ez annyit jelent, hogy a két sugár nem azonos fázisban van, (2. ábra/b). A 3. ábra a terjedési iránnyal szemben ábrázolva mutatja a két cirkuláris komponens eredőit, melyek egyenes vonalra esnek, melyek kombinációjának eredménye lineárisan polarizált rezgés. Az optikai forgatást a két komponensre érvényes nem azonos törésmutató ($n_j \neq n_b$) eredményének tekinthetjük, így

$$\alpha = (1800\ l'/\lambda_0)\,(n_j - n_b)$$

ahol l' a rétegvastagság.

Az optikai forgatást tehát felfoghatjuk az n_j és n_b törésmutató következtében létrejött rezgéskülönbségnek. Pozitív a forgatás, ha $n_b > n_j$, míg negatív, ha $n_j > n_b$, A törésmutató és optikai forgatás hullámhossz-függéséről (diszperziójáról) a későbbiekben részletesebben megemlékezünk.

c) Cirkuláris dichroizmus

Az optikai forgatással való rokonságát az I. táblázat mutatja. Amíg a cirkuláris dichroizmus lényegében *abszorpciós* jelenség, mely csak azokon a frekvencia intervallumokon belül jelentkezik, ahol az abszorpció is észlelhető, az optikai forgatás *diszperziós* jelenség. Ezért az optikai forgatás a fényhullámok különböző frekvenciájú komponensei eltérő terjedési sebességének megfelelően, a közegben különböző mértékben térnek el a beesési irányhoz képest és a spektrumnak az abszorpciós sávtól távoleső szakaszán is észlelhetők.

Ha a lineárisan polarizált fény frekvenciája valamely elektron(ok) számára gerjesztő frekvenciának felel meg, az elektron alapállapotából kimozdul magasabb energiájú pályára, ami *abszorpcióban* nyilvánul meg. Közönséges abszorpció esetén a sáv intenzitása csupán az átmeneti dipol elektromos momentumától függ, cirkuláris dichroizmus esetén az intenzitás egyaránt függ az elektromos *és* mágneses momentumtól. Ilymódon megkülönböztetünk:

1. Optikailag aktív abszorpciós sávot (cirkuláris dichroizmus).
2. Optikailag nem aktív abszorpciós sávot (molekuláris extinkció).

A jelenség értelmezésére ismét abból kell kiindulni, hogy a lineárisan polarizált fényt két koherens cirkulárisan poláros komponens összegének kell felfognunk. Optikailag aktív közegen áthaladva a törésmutató különbségének megfelelően a két sugár között fáziseltolódás következik be (optikai aktivitás). Ha emellett az optikailag aktív anyagra jellemző természetes frekvenciához a fény hullámhossza közel esik, a fény abszorbeálódik. A cirkulárisan poláros komponensek egyike jobban abszorbeálódik, mint a másik. Ennek következménye az, hogy az eredetileg lineárisan polarizált fény *elliptikusan polarizálttá* válik (l. 3. ábra).

Az ellipticitást egységnyi hosszra az a szög határozza meg, melynek tangense a kisebb/nagyobb tengely aránya. A gyakorlatban a két cirkulárisan polarizált komponens extinkcióját mérik és ezt extinkció differenciává alakítják. A végeredményként kapott *moláris ellipticitás* (Θ) a jobbra és balra cirkulár-poláros fény extinkciójának különbsége az alábbiak szerint:

$$\Theta = 2{,}303 \frac{4500}{\pi} (\varepsilon_b - \varepsilon_j) = 3300 (\varepsilon_b - \varepsilon_j)$$

Ha b>j, az ellipiticitás sáv pozitív, míg j>b esetén negatív.

Optikai sajátságok felhasználása a fehérje szerkezetkutatásban

Az ismertetett optikai jelenségeket széles körben alkalmazzák makromolekulák szerkezetének vizsgálatára. Rövid összefoglalás számára az látszanék célszerűnek, hogy az eljárásokat és a módszerek alkalmazhatóságát spektrum egyes szakaszainak megfelelően tárgyaljuk.

1. *A 300—600 mμ közötti* hullámhossz tartomány a látható és közeli ultraibolya tartományt foglalja magában. Ezen a szakaszon az egyszerű fehérjéknél, melyek nem tartalmaznak 300—600 mμ között abszorbeáló nem-fehérje természetű komponenst (prosztetikus csoportot) sem abszorpciójuk, következésképpen cirkular-dichroizmus spektrumuk sincs. Éppen ezért igen alkalmas ez a spektrum szakasz forgatóképesség vizsgálatára. A specifikus optikai forgatóképességet ($[\alpha]_\lambda$) az alábbi összefüggés adja meg:

$$[\alpha]_\lambda = \frac{\alpha \cdot 100}{c \cdot l}$$

ahol α a mért forgatás fokokban, c a koncentráció g/100 ml és l a küvetta rétegvastagsága deciméterben. Az optikai forgatóképesség felhasználását a fehérje szerkezet kutatásban COHEN (1955) javasolta. Abból kell kiindulnunk, hogy valamely fehérje specifikus optikai forgatóképessége ($[\alpha]_\lambda$) két tényezőből adódik:

$$[\alpha]_\lambda = [\alpha]_0 + [\alpha]_K$$

Az $[\alpha]_0$ jelenti a fehérjét felépítő aminosavak aszimmetriás szénatomjainak jelenlétéből adódó optikai aktivitást, mely a fehérje rendezettségétől függetlenül adott és durván $[\alpha]_D \sim -100°$-nak felel meg. Az $[\alpha]_K$-t szerkezeti optikai aktivitásnak nevezhetjük és abból adódik, hogy a polipeptid lánc részben periodikusan rendezetté válhat, s ennek következtében *szerkezeti aszimmetria* alakulhat ki. Ha a rendezettség a lánc egészére kiterjed, akkor $[\alpha]_K \sim +115°$-ot érhet el. Ez annyit jelent, hogy igen durván $+1°$ forgatás 1% periodikus rendezettségének, α-hélix szerkezetnek felel meg.

A II. táblázatban látható néhány fehérje $[\alpha]_D$ értéke rendezett (nativ) és rendezetlen (denaturált) állapotban. Nagyszámú fehérje vizsgálatakor kiderült, hogy az optikai aktivitás és az α-hélix tartalom közötti összefüggés korántsem olyan egyszerű, mint ahogy az előbbiekben leírtuk. A vizsgálatokban ezért rátértek az optikai forgatás hullámhosszfüggésének (diszperziójának, a továbbiakban ORD) vizsgálatára (4. ábra).

A specifikus optikai forgatás hullámhosszfüggését, az optikailag aktív sávoktól távolabbi régiókban, a század elején DRUDE (1900) a következő összefüggéssel írta le:

$$[\alpha]_\lambda = \sum = \frac{K_i}{\lambda^2 - \lambda_i^2}$$

II. táblázat

Fehérjék specifikus optikai forgatása

Fehérje	$[\alpha]_D$	
	Natív	Denaturált
Szérum albumin, marha	−63	−108,5
Aldoláz	−28	−100
α-Chimotripszin	−66	−111,6
Mioglobin	−15	− 71
Glutaminsav dehidrogenáz	+13	—
Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz	−30	−106
β-Laktoglobulin	−30	−117
Tejsav dehidrogenáz	−36	−108
Lizozim	−45	− 85
Ribonukleáz	−72	−108,5
Tripszin	−40	(− 69)

ahol λ_i jelenti az optikailag aktív elektronátmenet hullámhosszát, K_i az optikai aktivitás mértékével arányos állandó, λ a beeső fénysugár hullámhossza. Számos esetben a diszperzió egyszerű, ilyenkor a DRUDE féle egyenlet egy tagja is kielégítően leírja a forgatás hullámhossz függését (egytagú Drude egyenlet):

$$[\alpha]_\lambda = \frac{K}{\lambda^2 - \lambda_c^2}$$

ahol K a rotációs állandó, λ_c a diszperziós állandó. Az összefüggés igen egyszerűen oldható meg grafikus úton. Két megoldás is elterjedt.

A *Yang-Doty* ábrázolás esetén $[\alpha]_\lambda$-t tüntetjük fel $\lambda^2[\alpha]$ függvényében, s az egyenes tengelymetszete adja a K-t, míg lejtése a λ_c^2-t. A *Lowry*-féle ábrázolásnál a λ^2 függvényében tüntetjük fel az $1/[\alpha]$-t. Ilyenkor a tengely metszete a λ_c^2-t, míg az egyes lejtése adja a 1/K-t. Ha a diszperszió összetett (4. ábra), az egytagú Drude-egyenlet nem kielégítő a diszperzió leírására, ilyenkor a kéttagú alakot szokás alkalmazni.

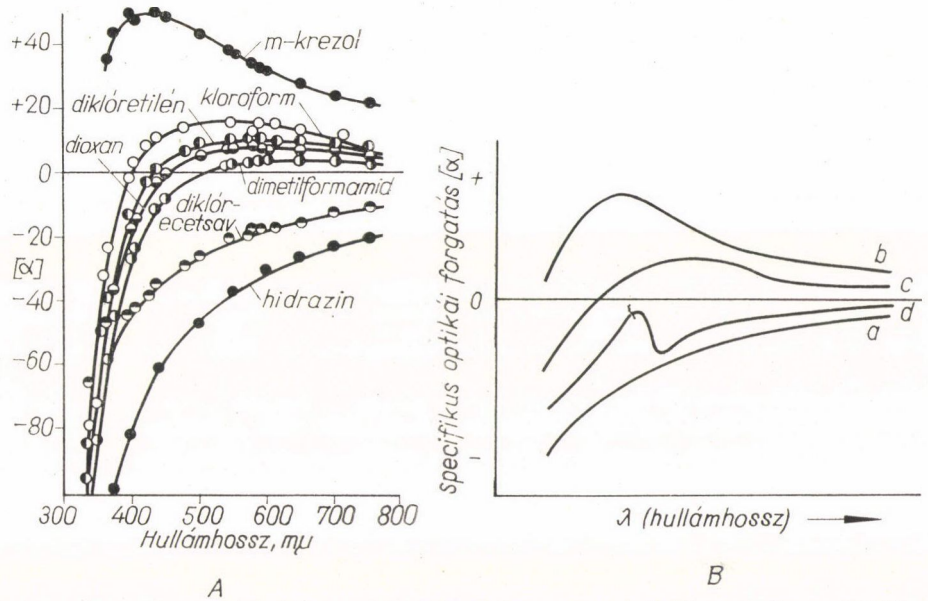
$$[\alpha]_\lambda = \frac{K_1}{\lambda^2 - \lambda_1^2} + \frac{K_2}{(\lambda^2 - \lambda_2^2)^2}$$

A fehérjék tekintélyes részének diszperziója megfelel az egytagú Drude-egyenlet által leírt összefüggésnek. A III. táblázat néhány fehérje λ_c állandóit tünteti fel. Megfigyelhető a III. táblázatban, hogy a fehérjék 3 csoportba oszthatók e tekintetben. Az elsőben a λ_c értéke aránylag nagy, 230—270 mμ s ez denaturációkor csökken kb 200 mμ-ra. A második csoportban a λ_c kicsi, $\lambda_c \sim 220$ mμ és denaturációra alig változik, míg a harmadik csoportban λ_c igen kicsi (180—210 mμ) és a denaturáció hatására nő (JIRGENSONS, 1961). A λ_c is felhasználható a hélix tartalom számítására az alábbiak szerint:

$$\% \text{ hélix} = 100(\lambda_c - 0{,}212) / 0{,}14 \quad \text{(Yang)}$$

vagy

$$\% \text{ hélix} = 100(\lambda_c^2 - 0{,}045) / 0{,}055 \quad \text{(Doty)}$$



4. ábra. Az optikai rotáció diszperziójának különböző típusai. A) YANG és DOTY (1957) vizsgálatai poli-γ-benzil glutamáttal, mely az oldószertől függően különböző típusú diszperziós görbét ad. B) A diszperziós görbék vázlatos ábrázolása a) egyszerű, b), c) összetett, d) anomális diszperzió

III. táblázat

Globuláris fehérjék λ_c értékei
(JIRGENSONS csoportosítása szerint)

Fehérje	λ_c mμ	
	Natív	Denaturált
A) Natív $\lambda_c > 230$ mμ		
Szérum albumin, marha	265	221
Alkohol dehidrogenáz	250	210
Aldoláz	278	220
α-Chimotripszin	241	218
Glutaminsav dehidrogenáz	316	—
Almasav dehidrogenáz	280	143
Pepszinogén	239	215
Ribonukleáz	233	220
B) Natív $\lambda_c \cong 210-230$ mμ		
α-Kazein	223	—
C. luteum hormon	218	216
Pepszin	216	230
C) Natív $\lambda_c < 210$ mμ		
γ-globulinok	200—217	225
Bence-Jones fehérje	180—210	218—220
Makroglobulinok	196—206	219

A Drude-féle összefüggés nem veszi figyelembe egyrészt azt, hogy a hullámhossz változásával a közeg törésmutatója is változik, ami rotációs értékét befolyásolja, másrészt nem tartlmazza azt a megfelelő egységet, melyre a forgatás vonatkoztatható. Fehérjéknél és poliaminosavak esetén a százalékos koncentráció ugyanis nem a legjobb egység, helyesebb ehelyett az úgynevezett közepes gyöksúlyra (MRW) számítani az adatokat. Ha az aminosav-összetétel ismert, az átlagos gyöksúly kiszámítható, értéke 110—115 között változik. Ismeretlen aminosav összetételű fehérje esetén az MRW = 115 értékkel számolnak. A törésmutató korrekcióját a Lorentz-faktor $\left(\frac{3}{n^2+2}\right)$ adja meg. Ezek figyelembevételével különféle poliaminosavakon nyert kísérleti tapasztalatok felhasználásával MOFFITT (1956) a korrigált gyökrotáció [m'] hullámhossz függésére a következő egyenletet írja le:

$$[m'] = \left(\frac{MRW}{100}\,\frac{3}{n^2+2}\right)[\alpha]_\lambda = \frac{a_0\lambda_0^2}{\lambda^2-\lambda_0^2} + \frac{b_0\lambda_0^4}{(\lambda^2-\lambda_0^2)^2}$$

A Moffitt-egyenlet is megoldható grafikusan úgy, hogy $[m'](\lambda^2-\lambda_0^2)$-t ábrázoljuk $1/(\lambda^2-\lambda_0^2)$ függvényében. Egyszerű diszperzió esetén egyenes vonalat kapunk, melyből a b_0-t az egyenes lejtése/λ_0^4 adja meg, míg a_0 tengely metszet/λ_0^2-ből számítható. A λ_0 értéket kísérleti adatok alapján 212 ± 5-nek, általában 212-nek adják meg. Az a_0 és b_0 rotációs állandók, melyek közül az a_0 mind az oldalláncok, mind a polipeptid váznak a rotációban való részvételéből függ, míg a b_0 gyakorlatilag *csak* a váz rendezettségével függ össze. Poliaminosavakon végzett mérések alapján, ha ezek teljesen helikálisak $b_0 \sim -630°$, ha teljesen rendezetlenek $b_0 = 0°$. Ha b_0 előjele —, jobbra forgató, ha +, balra forgató helix szerkezet van jelen.

A fentiekből valamely vizsgált fehérje hélixtartalma a Moffitt-féle b_0 állandóból a következőképpen számítható:

$$\%\ \text{hélix} = -100b_0/630$$

A IV. táblázat néhány fehérje b_0 állandóit tünteti fel natív ill. denaturált állapotban.

IV. táblázat

Natív és denaturált fehérjék $-b_0$ értékei

Fehérje	$-b_0$	
	Natív	Denaturált
Szérum albumin, marha	315	0
π-Chimotripszin	138	0
Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz	250	20
Tejsav dehidrogenáz	283	40
Glutaminsav dehidrogenáz	376	
Ovalbumin	183	0

Meg kell jegyeznünk, hogy a fentiek tisztán empirikus eredményeken alapulnak, így pl. a Moffitt-egyenletben szereplő λ_0 érték megválasztása is így történik. SHECHTER és BLOUT (1964) a távoli ultraibolya szakaszon végzett vizsgálatok alapján javasolják, hogy a poliaminosavakra jellemző, 193 és 225 mμ-nál észlelhető elektronátmenetek figyelembevételével, a valóságnak fizikai szempontból jobban megfelelő leírást kaphatunk a kéttagú Drude-egyenlet alábbi alakjának felhasználásával a specifikus gyökforgatás [R′] hullámhossza függésének leírása:

$$[R'] = \frac{A_{(\alpha,\varrho)193}\,\lambda_{193}^2}{\lambda^2 - \lambda_{193}^2} + \frac{A_{(\alpha,\varrho)225}\,\lambda_{225}^2}{\lambda^2 - \lambda_{225}^2}$$

A numerikus indexek az optikailag aktív elektronátmenetek hullámhosszát, az α ill. ϱ a helikális és rendezetlen alakot jelentik. A Shechter—Blout-féle egyenlet alkalmazhatóságának előfeltétele, hogy a vizsgált anyag csak α-hélix és rendezetlen konformációt tartalmazzon. Előnye az, hogy „oldószer érzékeny" a közeg dielektromos állandójától függenek az eredmények és ennek alapján bizonyos kölcsönhatások figyelembe vehetők. Az egyenletnek kétféle grafikus megoldása is ismert. Ábrázolhatjuk az [R′] $(\lambda^2 - \lambda_{193}^2)/\lambda_{193}^2 - t$ a $\lambda_{225}^2/(\lambda - \lambda_{225}^2)$ függvényében, így egyenes vonalat kapunk, melyből az $A(\alpha, \varrho)_{193}$ és $A(\alpha, \varrho)_{225}$ számítható. Urnes javaslata szerint célszerűbb az $[R'](\lambda^2 - \lambda_{193}^2 - -1)$-t a $(\lambda^2 - \lambda_{193}^2 - 1)/(\lambda^2/\lambda_{225}^2 - 1)$ függvényében ábrázolni, mert ez a két koefficiens, $A(\alpha, \varrho)_{193}$ és $A(\alpha,\varrho)_{225}$ független meghatározását adja. A hélix tartalom (H) a következőképpen számítható:

$$H_{193} = \frac{A_{(\alpha,\varrho)193} + 750}{36{,}5}$$

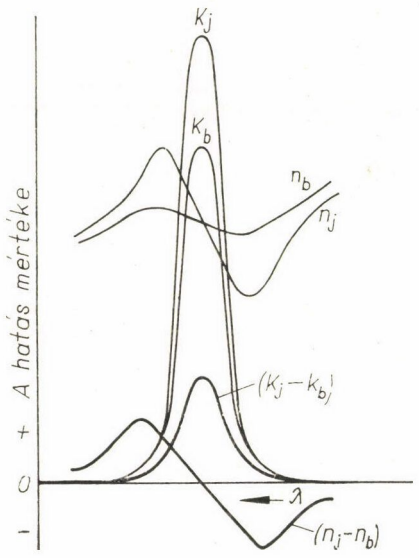
$$H_{225} = \frac{A_{(\alpha,\varrho)225} + 60}{19{,}9}$$

Mint látható, két egymástól független számítás is adódik a hélix tartalom meghatározására. Az V. táblázat a Shechter—Blout-egyenletek segítségével számított hélix tartalmat tünteti fel néhány fehérje esetében.

Eddigi meggondolásaink során a spektrumnak azzal a szakaszával foglalkoztunk, amely az optikailag aktív abszorpciós sávtól távol esik, és a diszperzió egyszerű vagy összetett, de semmiképpen nem anomális (l. 4. ábra). Ezzel az esettel a továbbiakban még foglalkozunk.

2. *250—300 mμ közötti* hullámhosszú tartományban jelentkezik a fehérjében levő aromás kromofórok — elsősorban tirozin és triptofán — abszorpciója. Ennek eredménye, hogy a rotáció diszperziója anomalissá válik, de a keletkező Cotton-effektus (l. 5. ábra) aránylag gyenge, sok esetben alig kimutatható, így itt csak az abszorpcióval foglalkozunk.

A legerősebben abszorbeáló kromofor a *triptofán* (l. 6. ábra), melynek két maximuma van ezen a szakaszon: 280 mμ-nál ($\varepsilon = 5500$) és 288 mμ-nál ($\varepsilon = 4400$) a távolabbi ultraibolyában, 220 mμ-nál igen erősen abszorbeáló sáv



5. ábra. A molekuláris abszorpció (k) és diszperzió (n) hatása az anomális diszperzió (Cotton-effektus) kialakulására. A két alsó, vastagon kihúzott görbe mutatja a kísérletileg meghatározható görbéket (HELLER, 1960)

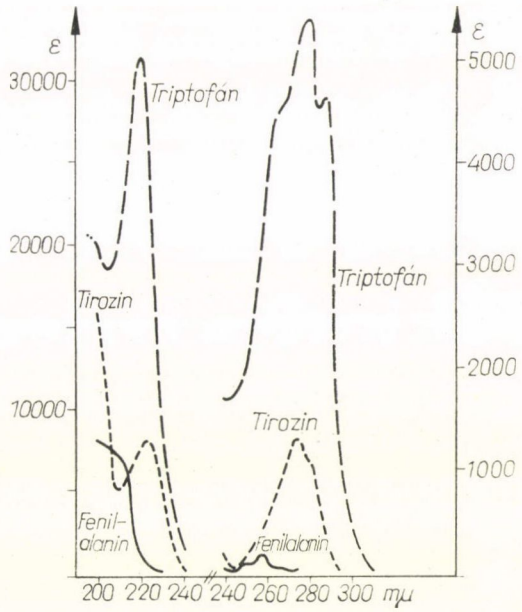
V. táblázat

Fehérjék Shechter—Blout-féle rotációs állandói és hélix tartalma

Fehérje	Rotációs állandók		% helix	
	A_{193}	A_{225}	H_{193}	H_{225}
Vízben				
Szérum albumin, marha	+1250	—1150	55	55
Ribonukleáz	+ 230	— 575	27	26
β-laktoglobulin	+ 420	— 420	32	18
Pepszinogén	+ 60	— 250	22	10
Ovalbumin	+ 500	— 521	34	23
Konalbumin	+ 397	— 486	31	21
Lizozim	+ 460	— 596	33	27
Klóretanolban				
Ovalbumin	+2000	—1340	79	83
Ribonukleáz	+1700	—1230	64	65
Szérum albumin, marha	+1600	—1095	61	58
Lizozim	+1200	— 850	50	45
Pepszin	+ 750	— 655	37	35

figyelhető meg ($\varepsilon = 32\,000$). A tirozinnak neutrális pH-n 275 mμ-nál van maximuma ($\varepsilon = 1200$), mig a távoli szakaszon 222 mμ-nál ($\varepsilon = 8000$). Lúgos pH-n, (pH>10) a tirozin fenolos hidroxilja ionizál, ami egyrészt a maximum helyét tolja el 295 mμ-ra, másrészt a moláris abszorpció értékét is megnöveli ($\varepsilon_{295}=2300$). A többi kromofór (fenilalanin, cisztein) abszorpciója a fentiekhez képest ezen a szakaszon elhanyagolható.

Szerkezetvizsgálatok céljaira az abszorpciós fotometriában az alábbi módszereket alkalmazzák:



6. ábra. Aromás kromofórok ultraibolya abszorpciója Malik adataiból (cf. WETLAUFER, 1962) lineáris léptékre átszámítva

a) *Spektrofotometriás titrálás* az ionizált és nem ionizált alakok közötti abszorpció különbségen alapul, tirozin és cisztein esetében alkalmazható. (7. ábra.) Alapul CRAMER és NEUBERGER (1943) azon megfigyelése szolgál, mely szerint bizonyos fehérjékben (pl. ovalbumin) a tirozinok ionizációja csak pH 10-nél jóval lúgosabb pH-n indul meg. Ennek két oka lehet: vagy az, hogy a fenolos hidroxil valamilyen kötésben van és ennek előzetes felszakadása szükséges az ionizáció megindulásához, vagy az, hogy a szterikus okok gátolják az ionizációt. Ilyen esetekben a tirozin a szabad alakokhoz képest *anomálisan* magas pH-n ionizál. Ilymódon a tirozinok normálisan ill. anomális ionizációja tájékoztatást adhat ezen oldalláncok lokalizációjáról. A számos fehérjével végzett spektrofotometriás titrálás tapasztalatai alapján az alábbi eseteket különböztetjük meg:

1. *Normálisan* ionizál minden tirozin (pK$\sim$10) a poli-L-tirozinban és néhány fibrilláris fehérjében mint pl. paramiozin, tropomiozin, L-meromiozin stb.

2. *Anomális* (pK$>$10) *de reverzibilis* ionizáció figyelhető meg szérumalbumin, lizozim, pepszin, stb. esetében.

3. A tirozinok *egy része normálisan*, más része anomálisan, a szerkezet felbomlását követő *demaszkirozódás* után, *irreverzibilisen* ionizál. A vizsgált fehérjék többsége ilyen, mint pl. a ribonukleáz, chimotripszinogén, miozin, B. subtilis α-amiláz, dehidrogenázok, szénsavanhidratáz, hemoglobinok, stb., végül

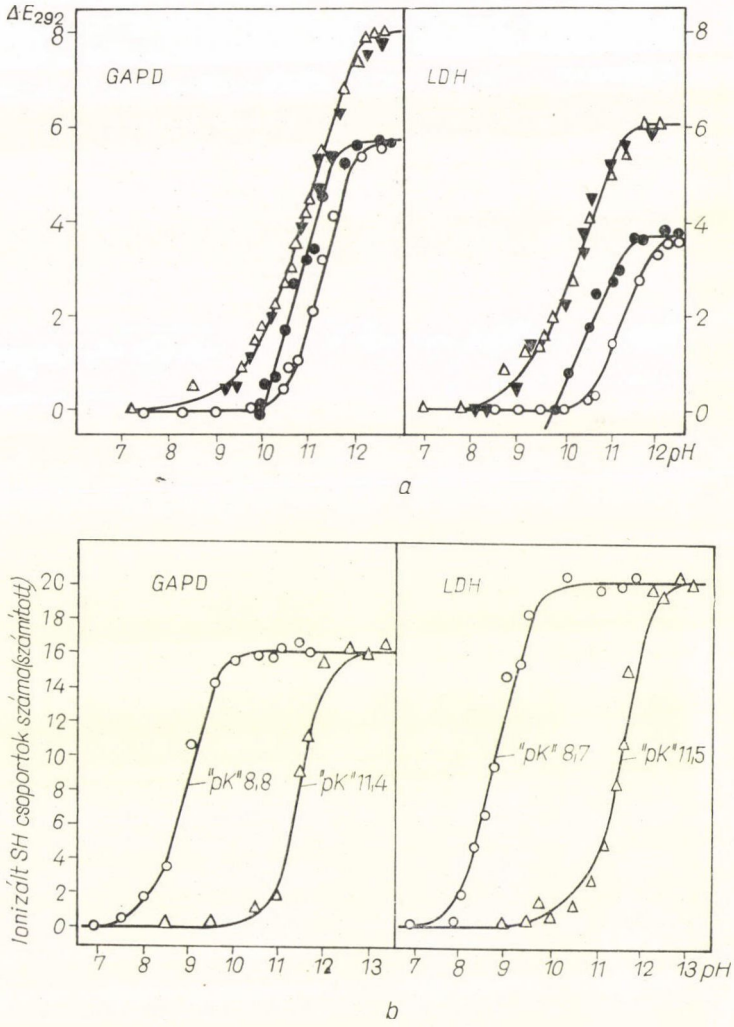
4. A tirozinok csak *teljes demaszkirozódás* (előzetes denaturáció) után ionizálnak az ovalbuminban és az aktinban.

A szulfidril csoportok ionizációja 235 mμ körüli szakaszon figyelhető meg. Minthogy ezen a spektrumszakaszon a pH változás során egyéb spektrális változások következnek be, a szulfidril csoportok ionizációjának meghatározása csak megfelelő számítások útján oldható meg (DONOVAN, 1964). Dehidrogenázoknál aránylag nagyobb különbséget észleltünk natív és denaturált állapotban végzett szulfidril titrálásoknál (7. ábra).

A spektrofotometriás vizsgálatok következő csoportja a *differencia spektrumok* tanulmányozása. Differencia spektrumot kapunk, tágabb értelemben, ha valamely fehérje különböző közegekben (vagy valamilyen reakció után) kapott spektrumait összehasonlítjuk az eredeti referencia spektrummal. Elvileg a közegben (oldószer) összetételének változása változást hozhat létre a spektrumban, függetlenül attól, hogy hatása a töltéses (ionizáló) vagy nem ionizáló csoportokra érvényesül. A közegnek az abszorpciós spektrumra gyakorolt hatását különböző szerzők különböző okokra vezetik vissza: spektrális perturbációra, törésmutató változásra, oldószerhatásra, végül konfiguráció változásra.

Differencia spektrum kialakulásához vezet minden olyan spektrális változás, melyben az abszorpciós görbe a rövidebb vagy hosszabb hullámhossz felé tolódik el anélkül, hogy az abszorpció mértéke (ε_{max}) megváltoznék (DONOVAN, mt. 1961), mint ahogy a 8. ábrán is látható. Fehérjéknél ilyen differencia spektrumot kapunk, ha pl. egy natív és denaturált fehérje oldatát hasonlítjuk össze. Kialakulására jelenleg elfogadott magyarázat a következő. A natív globuláris fehérjékben két régiót különböztethetünk meg. A külsőben helyezkednek el a poláros (és ionizáló) oldalláncok, mi a belső lényegében hidrofób oldalláncokból, alkil gyökökből, tehát gyakorlatilag szénhidrogénekből, épülnek fel. A külső az oldószer (víz) számára akadálytalanul átjárható, törésmutatója durván 1,3, míg a belső, az oldószer számára áthatolhatatlan hidrofób mag, törésmutatója az előbbinél jóval nagyobb, durván 1,6. Az abszorpció szempontjából számbajövő kromofór oldalláncok elhelyezkedhetnek mindkét régióban. Ha a globuláris fehérjék rendezett szerkezetét megszüntet-

jük, (tömény urea, savas pH, detergens stb. segítségével), megszűnik a rendezettségből adódó hidrofób mag is. Az itt elhelyezkedő kromofórok a rendezetlenné válás folytán a nagyobb törésmutatójú közegből kijutnak, és érintkezésbe

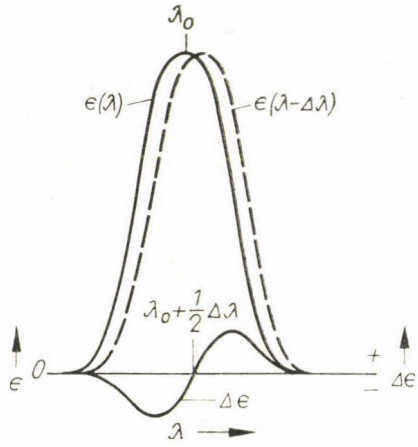


7. ábra. Dehidrogenázok spektrofotometriás titrálása. a) Tirozinok titrálása: ○ — lúgos irányba, vizes közegben, ● — visszatitrálás lúgos pH-ról; az ionizáció nem reverzibilis. ▽ és △ — titrálás és visszatitrálás 8M ureában; a titrálás reverzibilis (LIBOR és mt. 1965). b) Szulfhidril csoportok titrálása: △ — vizes közegben és ○ — tömény ureában (MÓRA, 1966; leközletlen); GAPD — gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz, LDH — tejsav dehidrogenáz

kerülnek a külső, alacsonyabb törésmutatójú közeggel. Ez a változás az eredeti spektrumot az alacsonyabb hullámhossz felé tolja el. Az eredeti és az eltolódást szenvedett spektrum között *differencia spektrum* alakul ki, mely jól tanul-

mányozható a 270—300 mμ és a 220—250 mμ közötti szakaszon. Ma már tisztázott a 270—300 mμ közötti differencia spektrum eredete. Ebben több differencia maximum figyelhető meg (9. ábra): 292—293 mμ-nál levő maximum a triptofán oldalláncok közegváltozására jellemző. 286—287 mμ között mind a triptofán, mind a tirozin perturbációjának változása jelentkezik a maximumban. Végül 280 mμ körül megjelenik egy váll vagy igen lapos maximum, mely lényegében a tirozinra jellemző.

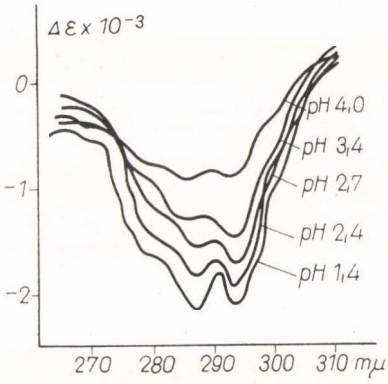
A 220—250 mμ-nál észlelhető differencia spektrumról a későbbiekben még megemlékezünk.



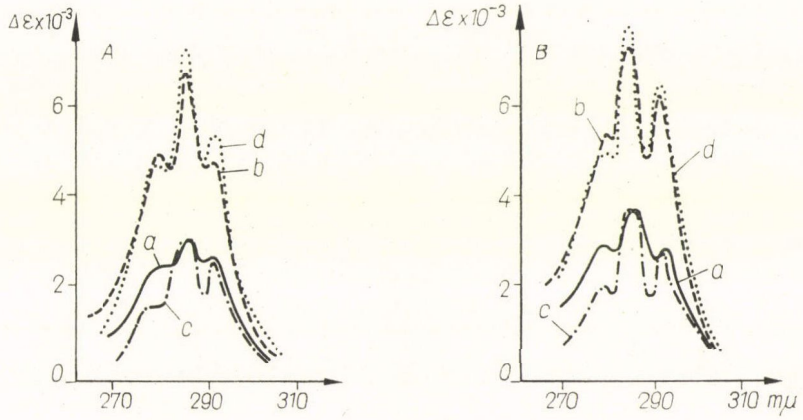
8. ábra. Differencia spektrum kialakulásának vázlatos ábrázolása DONOVAN és mt. (1961) szerint. Az eredeti ε elnyelésű $\varepsilon(\lambda)$ spektrum, melynek maximuma λ_0 a hosszabb hullámhossz felé eltolódva $\varepsilon(\lambda - \Delta\lambda)$ spektrumot ad. A két spektrum között $\Delta\varepsilon$ extinkció differencia van, és a differencia görbének $\lambda_0 + \frac{1}{2}\Delta\lambda$-nál inflexiós (cross over) pontja van

A differencia spektrumok alapján nehéz kvantitatíve megítélni, hogy hány kromofór oldallánc környezetének megváltozásából adódik az abszorpció változás. A differencia spektrum igen jó indikátora a denaturációs változásoknak. A pH függvényében vizsgálva megállapítható a szerkezetátmenet látszólagos pK-ja, a hőmérséklet függvényében a disszociációs hőről, tehát a szerkezet energetikai viszonyairól kaphatunk felvilágosítást. Az átmenetekben (denaturáció) résztvevő kromofórok számának pontos meghatározása a denaturációs differencia spektrumok alapján nem oldható meg. Az előbbiekben vázolt fehérje model ugyanis nagyon leegyszerűsített. Nehezen képzelhető el, hogy a fehérje molekulában a hidrofil és hidrofób régió egymástól élesen elkülönüljön, sokkal valószínűbb, hogy a kettő között átmeneti szakasz van, következésképpen bizonyos kromofór csoportok itt csak részlegesen temetettek, illetőleg részlegesen szabadok. A szabad és temetett kromofórok számát, az előbb említettek szem előtt tartásával, HERSKOVITS és LASKOWSKI (1961) által bevezetett *oldószerperturbációs eljárással* határozhatjuk meg. Ennek lényege az,

hogy a fehérje oldathoz szerkezeti szempontból „neutrális" anyagot adunk, amely növeli a közeg törésmutatóját. Ilyen anyagok, melyek tehát a fehérje molekulák konformációját nem befolyásolják, de a törésmutatót növelik, lehetnek polialkoholok, (pl. etilénglikoll, glicerin, glukoz, szacharoz, politilénglikoll stb.), vagy egyéb anyagok (pl. metanol, dimetiszulfoxid, D_2O stb.). Ezek az



9. ábra. Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz differencia spektrumainak kialakulása pH csökkenés hatására. Összehasonlításul neutrális fehérjeoldat szolgált



10. ábra. Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (A) és tejsav dehidrogenáz (B) perturbációs differencia spektrumai 20% etilénglikoll jelenlétében. a — natív fehérje neutrális közegben, b — fehérje 8M ureában, c és d — a natív, ill. denaturált fehérjében perturbált aromás kromofórok mennyiségének megfelelő összeállítású triptofán-triozin modell elegyek perturbációs spektrumai

anyagok (általában 20%-os koncentrációban alkalmazzák) a referencia oldatokhoz képest a kísérleti oldatok spektrumát kis mértékben a hosszabb hullámhossz felé tolják el (a D_2O kivételével). Az így kialakult perturbációs differencia spektrumból (10. ábra) önmagában még nem végezhetünk számításokat, csak úgy, ha megfelelő arányban összehasonlított modell elegy (tirozin és triptofán) perturbációjához hasonlítjuk. Az eljárás segítségével becsüljük, hogy az

aromás kromofórok közül hány a *szabad* (nativ állapotban is perturbálódnak) és hány a *temetett* (csak denaturáció után perturbálódnak).

Az eddig végzett vizsgálatokból a következők állapíthatók meg: teljesen temetettnek tekinthetők, tehát a szerkezet rendezettségének megszüntetése nélkül nem perturbálódnak azok az aromás kromofórok, melyek a hidrofób mag felszínétől legalább 5—10 Å mélységben helyezkednek el. Annak ellenére, hogy a triptofán a tirozinnál inkább hidrofób jellegűnek tekinthető, általános tapasztalat, hogy nagyjából azonos arányban temetettek ill. szabadok. A különféle fehérjékben a kromofóroknak kb. 50%-a elérhető a perturbáló ágensek számára. Valamivel kevesebb, ha a fehérje molekulasúlya nagy, valamivel több, ha a molekulasúly kicsi. Megemlíthetjük még, hogy a perturbációs spektrum kevéssé pH-függő.

A 220—250 mμ régió igen komplex mind az abszorpciós, mind a rotációs sajátságok tekintetében. Ezek eredete és szerkezeti összefüggései csak részben tisztázottak.

Az abszorpcióban ezen a szakaszon nincs maximum, viszont éles maximum figyelhető meg 232—235 mμ közötti natív és denaturált fehérje összehasonlításából származó *differencia spektrumban.* Glazer és Smith (1960, 1961) vizsgálták a 220—250 mμ között jelentkező differencia spektrumot és tapasztalták, hogy a helikális és rendezetlen poli-L-glutaminsav összehasonlításakor is kimutatható. Ebből arra következtettek, hogy az abszorpció differencia a peptid-hidrogén kötések $n \rightarrow \pi^*$ elektronátmenetének következménye, minthogy egyéb kromofór a poliglutaminsavban nem jöhet számításba. Glazer és Smith egyéb vizsgálatok alapján úgy vélték, hogy a fehérjék 220—250 mμ között megfigyelhető denaturációs differencia spektruma is a peptid-abszorpció változására vezethető vissza. A fenti megfigyeléstől függetlenül a 232—235 mμ közötti differencia maximum több tényezőből adódhat:

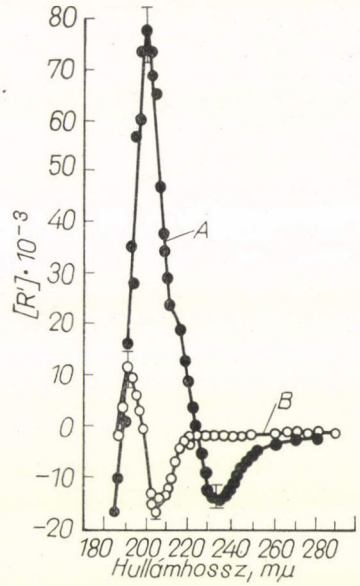
1. konformációváltozás hatása a peptidkötés abszorpciójára,

2. környezet változásának hatása a peptid kötések abszorpciójára, hasonlóan ahhoz, amit az aromás kromofóroknak 270—300 mμ közötti abszorpciójával kapcsolatban az előbbiekben említettünk.

3. Az aromás kromofórok spektrális eltolódásának érvényesülése a rövidebb hullámhossznál, mely a 270—300 mμ közötti szakaszon végbemenő változásokkal párhuzamos.

A közelmúltban több laboratóriumban végzett vizsgálatok (Edsall, mt. 1966, Martin, Bhatnagar, 1966) és saját vizsgálataink (Móra, Előди, 1968, előkészületben) a 3. pontban említett lehetőséget támasztják alá. Eszerint a 232—235 mμ körül jelentkező differencia maximum a 286—293 mμ-nál észlelhetővel gyakorlatilag párhuzamosan alakul ki, tehát az aromás kromofórok környezetváltozásának tulajdonítható. Ezek közül is a triptofán oldalláncok azok, melyek a változás nagyobb részéért felelősek. Ehhez képest az ilyen esetben számítható peptid-abszorpció változás elhanyagolható.

Az optikai rotáció diszperziója (ORD) a 220—250 mμ közötti szakaszon anomálissá válik és negatív Cotton-effektus figyelhető meg. SIMMONS és mt. (1961) tapasztalták először fibrilláris fehérjék és poliglutaminsav (helikális) ORD görbéin, melyeknek minimuma 232 mμ körül van. Az ORD görbe egyszerűvé válik, ha Cotton-effektus eltűnik, (ha a fehérjék rendezettsége megszűnik) (l. 11. ábra). A 232 mμ minimumnál a teljesen helikális ill. a teljesen rendezetlen alak specifikus optikai forgatásának differenciája — 11 000°, így 1% helix tartalom-



11. ábra. Poli-α-L-glutaminsav ultraibolya rotációs diszperziójának anomális szakasza. A — helikális alak vízben, pH 4,3; B — rendezetlen alak, Na-só pH 7,1 (BLOUT, 1963)

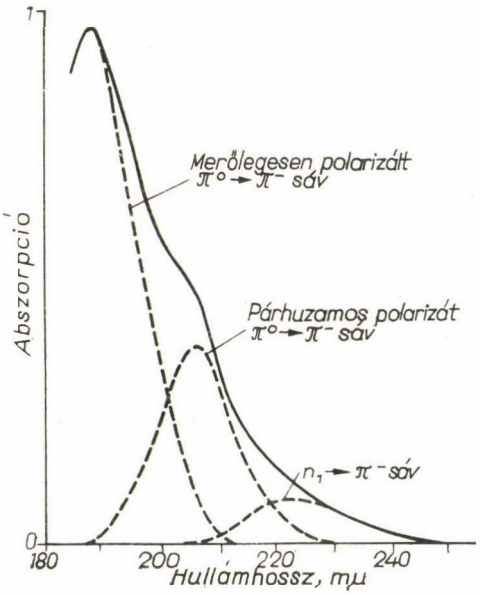
nak kb. —110° felel meg. Jobbra forgató helix esetén a Cotton-effektus negatív, balra forgató esetén (poli-β-benzil-L-aszpartát) pedig pozitív.

A fehérjékben és poliaminosavakban a 220—250 mμ közötti szakaszon jelentős negatív elipticitás sáv figyelhető meg a cirkuláris dichroizmus görbéken, mely a hullámhossz csökkenésével pozitív sávvá alakul (13. ábra). Ezek értelmezéséről a következő pontban emlékezünk meg.

A távoli ultraibolya szakasz, mely még vizes oldatban vizsgálható, gyakorlatilag a spektrum *190—220 mμ* közötti része. A mérések itt már különböző nehézségekbe ütköznek, és a különféle hibaforrások szerepe is igen jelentékennyé válik. A méréseket az oxigén jelenléte is zavarja már, tehát célszerű nitrogén atmoszférában dolgozni. Gondosan ellenőrizni kell, mennyiben befolyásolják az eredményeket a szórt fény, a fényszórás, a fluorescencia stb. A konformáció vizsgálata szempontjából kétségtelenül ez a spektrum legérdekesebb szakasza, mert ide esik a peptid kötések abszorpciója, s mindhárom tárgyalt

optikai jelenség ebben a hullámhosszban tartományban nagymértékben konformáció érzékeny.

A peptid (amid csoport) igen intenzív abszorpciós sávot mutat 190 mμ körül, mely $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronátmeneteknek felel meg ($\varepsilon_{max} = 7100$). Nagyobb hullámhossznál (215—225 mμ) igen gyenge, $n \rightarrow \pi^*$ átmeneteknek megfelelő sáv is megfigyelhető ($\varepsilon_{max} = 100$). PETERSON és SIMPSON (1957) modell vegyületeken (vacuumban) alacsonyabb hullámhossznál is vizsgálták az amid

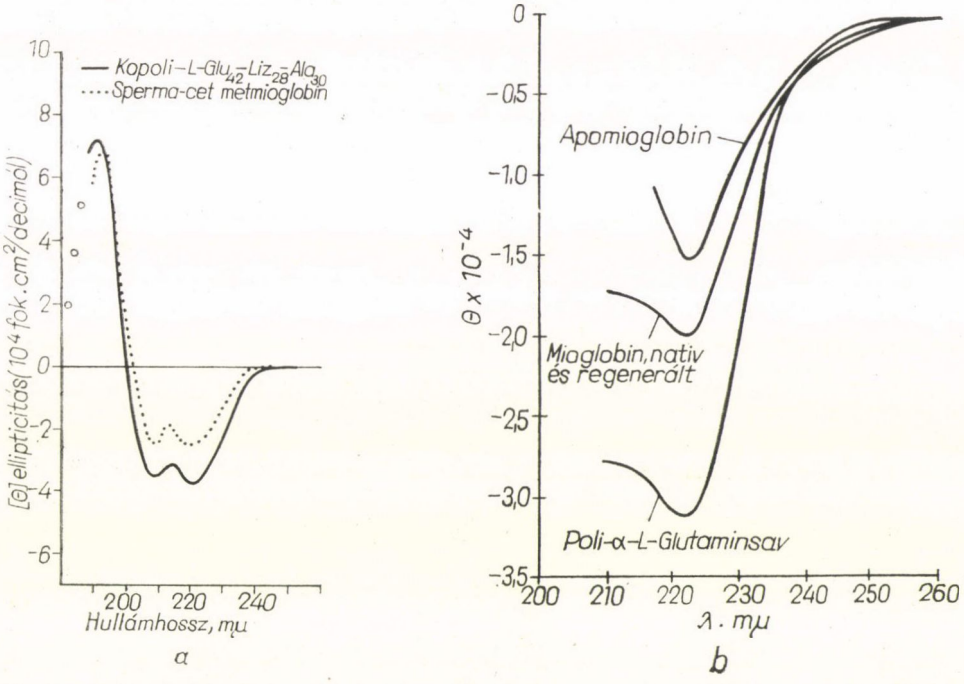


12. ábra. Polipeptidek távoli ultraibolya abszorpciójában résztvevő elektronátmenetek felbontása az abszorpció alapján (HOLZWART, DOTY, 1965)

abszorpciós sávokat. Az egyes abszorpciós sávok közel esnek egymáshoz és némileg fedik egymást (HOLZWART és DOTY 1965). A különféle optikai vizsgálatok adatainak összevetése alapján a 12. ábrán látható módon bontja fel az egyes elektronátmeneteknek megfelelően az abszorpciós maximumokat.

Az optikai forgatás diszperziójában ezen a szakaszon folytatódik a Cotton-effektus, melynek minimuma 230 mμ körül helyezkedik el. L—poliaminosavak (pl. poli-α-L-glutaminsav) ORD görbéje 225 mμ körül metszi az abszcisszát (0° forgatás), ezt követőleg pozitívvá válik és kb. 198 mμ-nál levő maximummal igen erős pozitív forgatás figyelhető meg, amely élesen csökken és 193 mμ-nál ismét metszi az abszcisszát. Ilyen Cotton-effektus csak akkor figyelhető meg, ha a poliaminosav helikális. Rendezetlen alakban az extremum értékek jelentékenyen csökkennek és helyzetük is megváltozik (11. ábra). Fehérjék ORD görbéi a fentiekkel sok hasonlóságot mutatnak, de a 200 mμ alatti vizsgálatok nehézségekbe ütköznek az igen jelentős abszorpció miatt.

A kopoli-L-glutaminsav-lizin-alaninin cirkuláris dichroizmus görbéje látható a mioglobinéval összehasonlítva a 13a ábrán. Mindkettő 223 és 205 mμ körül erős negatív, 190 mμ körül erős pozitív dichroizmus sávot mutat. (HOLZWART, DOTY, 1965, BEYCHOK 1966). Mioglobin esetében az ellipticitás mértéke összefüggést mutat a fehérje állapotával (13b. ábra) a hem csoport eltávolítására kissé, urea jelenlétében jelentékenyen csökken (BRESLOW, mt. 1965). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a fehérje szerkezet és a dichroizmus spektrumok között szoros összefüggés van. Ez a módszer valójában csak nap-



13. ábra. Poliaminosavak és mioglobin cirkulár dichroizmus spektrumai. a — kopoli-α-L-(glutaminsav)$_{42}$-(lizin)$_{28}$-(alanin)$_{30}$ és spermacet mioglobin (HOLZWART, DOTY, 1965), b — poli-α-L-glutaminsav, apomioglobin, natív és apomioglobinból regenerált mioglobin cirkulár dichroizmus spektrumai (BRESLOW és mt., 1965)

jainkban alakul ki, mert csak a közelmúltban sikerült olyan készüléket konstruálni, mely kellő érzékenységű és a rövid hullámhossz tartományban is kielégítően működik.

*

E rövid ismertetés eleve nem tarthatott számot a teljesség igényére, sőt még vázlatként tekintve is igen hézagos. Célja mindössze az volt, hogy a lehetőségek keretein belül a legújabban elterjedt optikai módszerekről adjon némi képet. Nem kétséges, hogy e módszerekkel igen hasznos felvilágosításokat kaphatunk a fehérjék szerkezetéről, de még inkább e szerkezet változásáról s a

változások körülményeiről. Ezek az információk rendkívül hasznosak, különösen a szerkezetfenntartó erők megismerésére, a funkcióval összefüggő szerkezetváltozások tanulmányozására és a hasonló, a kutatások előterében álló problémák megoldására. Az érdeklődők számára annyiban kívánunk további segítséget nyújtani, hogy az irodalom jegyzékben megemlítettünk néhány korszerű, alapvető munkát, melyek további tájékoztatást és részletesebb felvilágosítást adnak a fent tárgyalt kérdésekről.

IRODALOM

A) *Abszorpció és általános problémák*

DONOVAN, J. W.: Biochemistry **3,** 823 (1964).
DONOVAN, J. W., LASKOWSKI, M. JR., SCHERAGA, H. A.: J. Am. Chem. Soc. **83,** 2686 (1961).
EDSALL, J. T.: in Ramachandran, G. N. (szerkesztő) Aspects of Protein Structure, Academic Press, London—New York, p. 179 (1963).
EDSALL, J. T., MEHTA, S., MYERS, D. V., ARMSTRONG, J. MCD.: Biochem. Z. **345,** 9 (1966).
ELŐDI P.: A globuláris fehérjék térszerkezet vizsgálatának problémái és eredményei, Akadémiai Kiadó, Budapest (1966).
GLAZER, A. N., SMITH, E. L.: J. Biol. Chem. **235,** PC 43 (1960).
GLAZER, A. N., SMITH, E. L.: J. Biol. Chem. **236,** 2942 (1961).
HERSKOVITS, T. T., LASKOWSKI, M. JR.: J. Biol. Chem. **237,** 2481, 3418 (1962).
LÁNG L.: Abszorpciós színképelemzés, Veszprémi Vegyipari Egyetem, Szakmérnöki jegyzet (1965).
LASKOWSKI, M. JR.: Federation Proc. **25,** 20 (1966).
LAZURKINA, YU. C.: Fizicseszkie Metodü Isszledovanija Belkov i Nukleinovüh Kiszlot, Izd. Nauka, Moszkva, III. fejezet (1967).
LIBOR, S., ELŐDI, P., NAGY, Z.: Biochim. Biophys. Acta **110,** 484 (1965).
MARTIN, C. J., BHATNAGAR, G. M.: Biochemistry **5,** 1230 (1966).
PETERSON, D. L., SIMPSON, W. T.: J. Am. Chem. Soc. **79,** 2375 (1957).
SCHERAGA, H. A.: Protein Structure, Academic Press, New York (1961).
TANFORD, C.: Physical Chemistry of Macromolecules, John Wiley and Sons, Inc. New York (1962).
TIMASHEFF, S., GORBUNOFF, M. F.: An. Rew Biochem. **36,** 13 (1967).
WETLAUFER, D. B.: Advances Proteinchem. **17,** 303 (1962).

B) *Optikai forgatás*

BLOUT, E. R.: in Ramachandran, G. N. (szerkesztő) Aspects of Protein Structure, Academic Press, London—New York, p. 241 (1963).
COHEN, C.: Nature **175,** 129 (1955).
DJERASSI, C.: Optical Rotatory Dispersion, McGraw-Hill Co. New York (1960).
DRUDE, P.: Lehrbuch der Optik, Hirzel, Leipzig (1900).
FASMAN, G. D.: in Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (szerkesztők) Methods of Enzymology, Academic Press, New York, Vol. **6,** p. 928 (1963).
HARRINGTON, W. F., SEGAL, D. M.: An. Rew. Biochem. **35,** 599 (1966).
HELLER, W.: in Weissberger, A. (szerkesztő) Physical Methods in Organic Chemistry, Interscience Publ. Inc. New York, Vol. I. Part III. p. 2147 (1960).
URNES, P. J., DOTY, P.: Advances Proteinchem. **16,** 401 (1961).
TORCHINSKY, Yu. M., Uspehi Biol. Chim. **8** 61 (1967)
YANG, J. T.: Tetrahedron **13,** 143 (1961).
YANG, J. T., DOTY, P.: J. Am. Chem. Soc. **79,** 761 (1957).

C) *Cirkuláris dichroizmus*

BEYCHOK, S.: Science **154,** 1288 (1966).
BRESLOW, E., BEYCHOK, S., HARDMAN, K., GURD, F. R. N.: J. Biol. Chem. **240,** 304 (1965).
CRABBÉ, P.: Optical Rotatory Dispersion and Circular dichroism in Organic Chemistry, Holden Day, San Francisco, London, Amsterdam (1965).
HOLZWART, G., DOTY, P.: J. Am. Chem. Soc. **87,** 218 (1965).
VELLUZ, L., LEGRAND, M., GROSJEAN, M.: Optical Circular Dichroism, Vlg. Chemie, Weinheim. (1965).

SZEDIMENTÁCIÓS ANALITIKAI MÓDSZEREK

CZUPPON ALFRÉD

MTA Kémiai Szerkezeti Kutató, Budapest

Bevezetés

A polimer molekulák, mivel igen nagyszámú elemi egységből, illetve atomból vannak felépítve, bonyolult térbeli szerkezetűek. Ezért vizsgálatuk csak viszonylag bonyolult technikai és matematikai apparátussal rendelkező módszerekkel történhet. A vizsgálatok jelentős részét polimer oldatokon célszerű végrehajtani, mivel a legtöbb vizsgálati módszer, termodinamikai szempontból, végtelen higításra történő extrapolációt kíván meg, s azzal az előnnyel jár együtt, hogy az ily módon kapott adatok a vizsgált polimer egyedi molekuláira vonatkozó átlagos jellemzőket szolgáltatja. A számos lehetséges metodika közül ebben a rövid összefoglalóban az ultracentrifugával nyerhető információk lehetőségeire kívánunk rámutatni.

Polimer oldatok termodinamikai viselkedését az alábbi tényezők szabják meg:

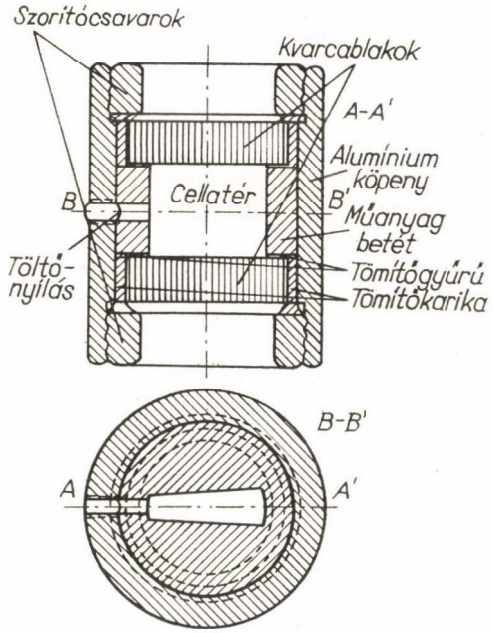
1. Az oldott polimer molekulasúlya, illetve ennek átlagértékei,
2. Az oldott polimer molekulák konfigurációja és ennek méretei,
3. A kizárt térfogat effektus, az inter- és intramolekuláris kölcsönhatások.

Mivel figyelmünket elsősorban a természetes eredetű polimerek (fehérjék, nukleinsavak, stb.) tanulmányozására fordítjuk és ezek jó része vizes oldatokban vizsgálható, első közelítésben a 3. pontban megemlített kölcsönhatások részletes taglalásától eltekinthetünk. Az összefoglaló az alábbi kérdéseket kívánja érinteni:

1. A szedimentációs kísérletek apparatív feltételei. Ultracentrifugák.
2. A szedimentáció sebesség mérés alapjai:
   a) Monodiszperz rendszerek,
   b) Polidiszperz rendszerek,
3. A szedimentáció egyensúly elmélete:
   a) Rövidoszlopos szedimentáció egyensúlymérések,
   b) Szedimentáció egyensúly sűrűséggradiensben.
4. Közelítő szedimentáció egyensúly. Archibald módszer.

1. A szedimentációs kísérletek apparatív feltételei

Az ultracentrifugás kísérletek alapját az a merev testek forgómozgására vonatkozó fizikai törvény adja meg, hogy adott szögsebességgel történő, rögzített tengely körüli forgás esetén, a forgástengelytől kifelé ható erőhatás, az ún. centrifugális erő lép fel. Ennek a fizikai ténynek a felhasználása előnyöket rejteget magában, a gravitációs erőtérben történő ülepítéssel szemben, mivel



1. ábra

a forgó rész (rotor) anyagának és méreteinek megfelelő megválasztásával a fellépő erő nagyságát viszonylag tág határok között, változtatni tudjuk. A manapság használatos készülékekkel a gravitációs erőtérnek mintegy $3 \cdot 10^5$-szeresét érhetjük el.

A mérőberendezés legfontosabb része a rotor és meghajtómű egység. A rotor furataiban foglalnak helyet a vizsgálandó oldatot tartalmazó mérő- és táracella, illetve esetenként a mérőcellák.

A mérőcellák speciálisan vannak kiképezve, mint azt az 1. ábra is bemutatja. Az ún. szektor alak azt a célt szolgálja, hogy a centrifugális térerő hatására elmozduló részecskék ne ütközzenek a cella falába és ezáltal konvekciómentes anyagáramlás jöjjön létre.

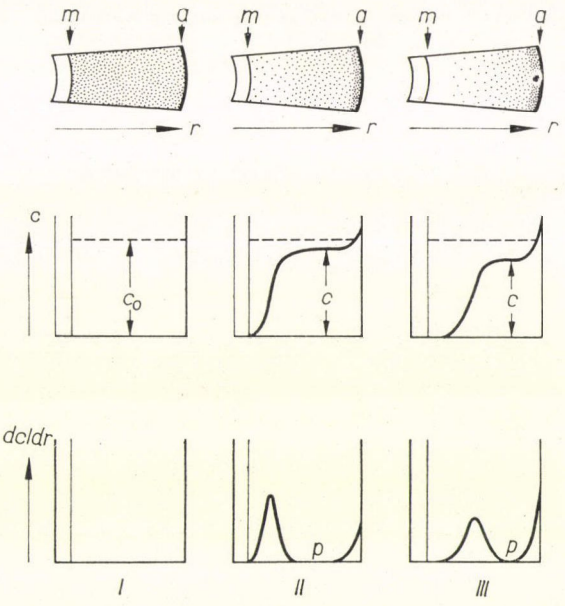
A készülék másik fontos részét képezik a különböző optikai rendszerek (Schlieren, interferencia, abszorpciós optikai rendszerek), melyek a mérőcellában lejátszódó folyamatok megfigyelésére szolgálnak.

A készülékhez különböző vákuumszivattyú rendszerek, hűtő, illetve fűtőberendezések is hozzátartoznak.

Az ultracentrifugák felépítését és technikai adatait a szerző egy korábban már megjelent közleménye (1) részletesen tárgyalja.

2. A szedimentáció sebesség mérés alapjai

Vizsgáljunk egy rendszert, polimer oldatot, vagy szuszpenziót, melyre centrifugális erő hat. Azt tapasztaljuk, hogy adott centrifugális erő hatására



2. ábra

az oldatban levő molekulák, illetve szuszpendált részecskék egy része leülepszik. A molekulák mozgásának jellemzésére azt a tényt használhatjuk fel, hogy az ülepedés sebessége állandó. Ezt a jelenséget csak úgy tudjuk fizikailag megmagyarázni, hogy a centrifugálás következtében fellépő centrifugális erőn kívül még egy, a centrifugális erővel azonos nagyságú, de ellentétes irányú, másik erőt is feltételezünk, nevezetesen az oldott molekula és oldószer közötti belső súrlódást.

Igen erős centrifugális erőterekben (10^5-szeres g-nél, g = 981 cm · sec $^{-2}$) az ülepítés folyamán az oldat és oldószer között egy határréteg alakul ki. 2. ábra. Ez a határréteg koncentráció-, vagy ami ezzel egyenértékű, törésmutató gradienssel jellemezhető, és ennek a helyzetét tudjuk különböző optikai rend-

szereink segítségével adott időpontokban megfigyelni, vagy fotóeljárással rögzíteni.

Az ülepedést befolyásoló jellemzők közötti kvantitatív összefüggést az alábbi módon kaphatjuk meg. Az anyag mólnyi mennyiségére ható centrifugális erő Archimedes törvényének figyelembevételével:

$$M(1 - v \cdot \varrho)\,\omega^2 x \tag{2.1}$$

Az ezzel azonos nagyságú, de ellentétes irányú súrlódási erő pedig

$$f_s \frac{dx}{dt} \tag{2.2}$$

vel egyenlő.

A két egyenletben szereplő betűk jelentése a következő: M a molekulasúly, v az oldott anyag parciális fajlagos térfogata, ϱ az oldószer sűrűsége, ω a forgó-rendszer szögsebessége, x a forgástengelytől mért távolság, f_s a moláris súrlódási együttható, dx/dt a centrifugális erő hatására azzal párhuzamosan, vagy ellentétes irányban (flotáció) elmozduló molekulák sebessége. Az ülepedő molekulák mozgásegyenlete tehát végeredményben

$$s = \frac{M(1 - v \cdot \varrho)}{f_s} = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 \cdot x} \tag{2.3}$$

alakú. Ennek az egyenletnek a baloldalán tüntettük fel azokat a paramétereket, amelyek az adott rendszert jellemzik. Ezt a kifejezést *szedimentációs állandó*nak nevezzük és s-el jelöljük. s tehát a határréteg egységnyi idő és egységnyi térerősség hatása alatt bekövetkező vándorlási sebességét adja meg. Egysége az 1 *Svedberg* $= 10^{-13}$ *sec* CGS-rendszerben.

A szedimentációs állandó korrekciói. A polimer molekulák szedimentáció sebességét a kísérleti feltételek igen erősen befolyásolják. A befolyásoló tényezők között elsősorban a kísérlet hőmérséklete játszik döntő szerepet, mivel a hőmérséklet befolyással van az oldószer viszkozitására, sűrűségére és az oldott anyag parciális fajlagos térfogatára. A kísérleti adatok összehasonlítási lehetőségét ugyanazon polimerre vonatkozóan úgy érik el, hogy a kísérleteket konvencionálisan 25 C°-on hajtják végre. Az oldószerek különbözőségéből eredő eltéréseket úgy küszöbölik ki, hogy a méréseket egységesen víz oldószerre vonatkoztatják. Az átszámításhoz szükséges egyenlet SVEDBERG és PEDERSEN összefoglaló monográfiájában (2) található meg.

Töltések befolyása a szedimentációs állandóra. Fehérjék és más biológiai eredetű polimerek szedimentációjánál figyelembe kell venni, hogy a vizsgált polimer molekulák gyakran töltésekkel is rendelkeznek. A fellépő hatás szerint kétféle töltéseffektust különböztethetünk meg.

1. primer
2. szekunder } töltéseffektus

A továbbiakban a jelentős és gyakrabban fellépő primer töltéseffektussal foglalkozunk. A mérések szerint ugyanis a szekunder töltéseffektus meglehetősen kicsi és általában elhanyagolható.

A valóditól eltérő szedimentációs állandót várhatunk akkor, ha a szedimentáló polimer molekulák töltéssel rendelkeznek. Ebben az esetben ugyanis az ionok és ellentétesen töltött ionpárjaik nemcsak töltés, hanem molekulasúly szempontjából is különbözőek. A centrifugális erőtér hatására a magasabb molekulasúlyúak gyorsabban, az alacsonyabb molekulasúlyúak pedig lassabban fognak mozogni. Szétválásuk következtében a mérőcellában potenciálgradiens jön létre. A következmény: a lassan szedimentáló ionok gyorsulnak, a gyorsan haladók pedig fékeződnek. A kérdéses ionok szedimentáció sebességét tehát azok szedimentációs és elektroforetikus mozgásának összege szabja meg. A jelenség mélyreható vizsgálata (3) azt mutatja, hogy 0,2 mól NaCl vagy KCl elektrolit hozzáadása a vizsgált polimer oldathoz, elegendő az említett töltéseffektus kiküszöbölésére.

A szedimentációs állandó koncentrációfüggése. A tapasztalatok szerint különböző koncentrációkban meghatározott szedimentációs állandók szisztematikus eltérést, csökkenést mutatnak a koncentráció növelésével. Gömbalakú polimerek híg oldataiban mért szedimentációs állandók koncentráció függésére BURGERS (4) a

$$\frac{1}{s_c} = \frac{1}{s_0}[1 + k_s \cdot c] \tag{2.4}$$

egyenletet kapta, ahol s_c a c-koncentrációjú oldatban mért szedimentációs állandó, s_0 a o-koncentrációhoz tartozó szedimentációs állandó, c a koncentráció és k_s egy molekulasúlytól független állandó, melynek értéke 6,875, ha a koncentráció térfogatszázalékban van megadva. BECKMANN és ROSENBERG (5), valamint NEWMAN és EIRICH (6) hasonló alakú összefüggést adtak meg fonalalakú molekulákra. Az általuk levezetett képletben szereplő k_s faktor azonban függ a molekulasúlytól.

Anyagi jellemzőként csak a zéró koncentrációra extrapolált szedimentációs állandók fogadhatók el.

A hidrosztatikus nyomás hatása a szedimentációs állandóra. Az ultracentrifuga mérőcellájában fellépő centrifugális térerő következtében igen nagy hidrosztatikus nyomás lép fel, amit pontos mérések esetében figyelembe kell vennünk. Ennek a zavaró tényezőnek a vizsgálatával MOSIMANN és SIGNER (7), OTH és DESREUX (8) és ELIAS (9) foglalkozott részletesebben. Az említett szerzők vizsgálatai szerint vizes oldatok esetében a hidrosztatikus nyomás korrekció elhanyagolása kb. 5%-nyi hibát okoz, vagyis a cella aljánál, a forgás-

tengelytől távolabbi részen, mért szedimentációs állandó 5%-al kisebb. Ez az eltérés csak igen precíz mérések esetében figyelhető meg és veendő korrekcióba. Szerves oldószerek esetében sokkal nagyobb jelentősége van ennek a korrekciónak, értéke 40—50% is lehet.

A Svedberg egyenlet. A (2.3) egyenlet alapján, per definitionem, a szedimentációs állandó a következő a rendszerre jellemző állandókat tartalmazó kifejezéssel egyenlő

$$s = \frac{M(1 - v \cdot \varrho)}{f_s} \tag{2.5}$$

Ebből a vizsgált anyag molekulasúlyát meg tudjuk határozni a következő átalakítással: Tudjuk, hogy Einstein egyenlete

$$f_D = \frac{R \cdot T}{D} \tag{2.6}$$

érvényes híg oldatokra, ahol R a gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, D a diffúziós állandó, f_D a polimer molekulák moláris súrlódási együtthatója transzlációs diffúzió esetén. Ha feltesszük, hogy azonos hőmérsékleten, azonos oldószerben végtelen higítás esetében a szedimentációs súrlódási együttható f_s megegyezik a diffúziós súrlódási együtthatóval f_D, akkor (2.5) egyenlet

$$M = \frac{R \cdot T}{(1 - v \cdot \varrho)} \cdot \frac{s_0}{D_0} \tag{2.7}$$

alakban írható. Ezzel a feltevéssel élhetünk, mert kísérletek igazolják (10) hogy $f_s/f_D \approx 1$, a maximális eltérés kisebb 1%-nál. (2.7) egyenletet nevezik *Svedberg egyenletnek.*

A Svedberg egyenlet tehát lehetővé teszi a polimerek egyik legjellemzőbb tulajdonságának a molekulasúlynak meghatározását szedimentáció sebesség mérés alapján, ha azt transzlációs diffúzió méréssel egészítjük ki. Az egyenlőség általános érvényű, mivel levezetésénél az oldott molekulák alakjára vonatkozóan semmiféle feltevéssel nem kellett számolnunk.

A molekulák mérete és alakja. A szedimentáció sebesség mérés nemcsak az oldott polimerek molekulasúlyának, hanem az alak ismeretében, a molekulák méretének meghatározását is lehetővé teszi.

Gömbalakú molekulák súrlódási együtthatója zéró koncentrációra vonatkozóan kifejezhető a Stokes-féle formula segítségével:

$$f_0 = 6\pi\eta r$$

ahol η a közeg viszkozitása és r a részecske sugara. A szedimentáció feltételi egyenletének (2.3) egyenlet módosításával és a Stokes-formula felhasználásával

kapott súrlódási együttható kombinációjával a molekula sugarára a következő kifejezés adódik

$$r = \left[\frac{9}{2} \cdot \frac{\eta \cdot s}{\varrho - \varrho_0}\right]^{1/2} \tag{2.8}$$

Az egyenletben ϱ a polimer, ϱ_0 pedig az oldószer sűrűségét jelenti. A többi betű jelentése már ismert. A (2.8) összefüggés alapján tehát szedimentációs állandó mérésével meghatározható a gömbalakú részecske, illetve molekula sugara, ha a molekula alakjára nagy valószínűséggel más módon következtethetünk.

Nem gömbalakú, hanem attól eltérő, különböző forgási ellipszoid alakú molekulák esetében a *formafaktor* segítségével kaphatunk felvilágosítást a molekula alakjáról és méretéről. Ismert tény, hogy azonos molekulasúlyú, de különböző alakú molekulák súrlódási együtthatója más és más. Mégpedig minél nyújtottabb a molekula, annál nagyobb a súrlódási együtthatója. Ha egy molekula súrlódási együtthatóját (f) elosztjuk az azonos molekulasúlyú gömbalakú molekula súrlódási együtthatójával, (f_0), akkor az így kapott hányados éppen a formafaktor (f/f_0). A formafaktor értéke a szedimentációs állandó és molekulasúly, a szedimentációs állandó és diffúziós állandó, a diffúziós állandó és molekulasúly, valamint a viszkozitás és molekulasúly adatok kombinációival viszonylag egyszerűen fejezhető ki. A formafaktorból azután a különböző típusú forgási ellipszoidokra a tengelyarányok kiszámíthatók (11).

A formafaktor csak $f/f_0 = 1$ esetén ad határozott felvilágosítást a molekula alakjáról. $f/f_0 \neq 1$ esetében a szerkezeti aszimmetrián kívül számításba kell vennünk a molekulák szolvatációját is. Egy hidratált aszimmetrikus molekula formafaktora ONCLAY (12) szerint kétféle formafaktor szorzatával adható meg, ahol az egyik tényező a hidratációtól, a másik az aszimmetriától függ

$$\left(\frac{f}{f_0}\right)_{\text{megfigyelt}} = \left(\frac{f}{f_0}\right)_{\text{hidr}} \cdot \left(\frac{f}{f_0}\right)_{\text{aszim}} \tag{2.9}$$

Annak meghatározása, hogy a hidratáció és az aszimmetria faktora mekkora külön-külön, csak más módszer segítségével lehetséges.

A teljesség kedvéért ki kell térnünk flexibilis lineáris polimerek méretének meghatározására is. FLORY (13) elméletet dolgozott ki lineáris polimerek hidrodinamikai viselkedésének leírására. Elmélete, statisztikai módszerek alkalmazásával, az ekvivalens hidrodinamikai gömb modellre épül. A valódi molekulákat, melyek flexibilitásuk következtében gombolyag alakot vesznek fel oldott állapotban, egy tömör gömbbel helyettesíti úgy, hogy hidrodinamikai szempontból a reális molekulák jellemzőivel rendelkezzenek. A hidrodinamikai súrlódási együttható és a láncmolekula méretjellemzője között, FLORY elmélete szerint, az

$$f_0 = P \cdot \eta \cdot \langle r^2 \rangle^{1/2} \tag{2.10}$$

reláció áll fenn. Itt f_0 a flexibilis lineáris polimer molekula súrlódási együtthatója, η az oldószer viszkozitása, $\langle r^2 \rangle^{1/2}$ a molekula közepes hossza (= a végcsoportok négyzetes átlag távolsága). P polimertől és oldószertől független állandó és értéke 5,11. Ma már ismeretes, hogy FLORYnak P állandóra vonatkozó megállapítása csak első közelítésben érvényes (14).

A FLORY elméletet deoxiribonukleinsavakra PEACOCKE és SCHACHMAN (15), valamint DOTY és RICE (16) alkalmazták eredményesen.

Az eddigi tárgyalásaink során hallgatólagosan feltételeztük, hogy a szóbanforgó polimer oldat csupa azonos kémiai felépítésű azonos molekulasúlyú molekulákat tartalmaz. Biológiai objektumok esetében ez a feltétel a legtöbbször teljesül. Az ettől a feltételtől eltérő rendszereket két nagy csoportba sorolhatjuk. Az egyik csoportot azok a rendszerek képezik, melyekben csak néhány különböző molekulasúlyú polimer fajta található és ezek molekulasúly különbsége feltétlenül nagyobb, mint az ultracentrifuga feloldóképessége. A másik csoportot azok a rendszerek képezik, melyekben a polimerek molekulasúlya egy minimális értéktől egy maximális molekulasúly értékig folytonosan változik. Az előbbi rendszert paucidiszperz, az utóbbit pedig polidiszperz rendszerként szokták emlegetni.

Pauci- vagy polidiszperz rendszerek esetében a már tárgyalt összefüggéseinkből csak átlagértékeket kaphatunk. Például a Svedberg egyenlet alkalmazásával különböző molekulasúly átlagokat számíthatunk ki, attól függően, hogy a szedimentációs és diffúziós állandók értékeire a szokásosan használt szám-, súly- vagy z-átlagokat használjuk fel.

Polidiszperz rendszerek esetében az átlagértékek megadása nem kielégítő, mivel számos eloszlás típus konstruálható úgy, hogy azonos átlagértékkel rendelkezzék. Bár a szedimentáció sebesség mérés által szolgáltatott koncentráció gradiens görbe a szedimentációs állandó eloszlás függvénytől csak egy állandóban különbözik, ebből a molekulasúly eloszlás függvény konkrét alakját csak bonyolult matematikai függvénytranszformációkon keresztül kaphatjuk meg. A szedimentáló polimer diffúziós sajátságainak és a szedimentációs állandó koncentrációfüggésének figyelembevétele még tovább növeli a számítás nehézségeit, ezzel együtt a számítás hibáit.

A polidiszperzitás meghatározásának elvi és gyakorlati kérdéseivel részletesen foglalkozik a szerző összefoglaló közleményében (17).

3. A szedimentáció egyensúly elmélete

Szedimentáció egyensúlyról akkor beszélünk, ha a centrifugális erő hatására létrejött anyagáramot a kialakult koncentráció gradiens következtében fellépő diffúziós anyagáram kompenzálja.

A mérőcella bármely infinitezimális vastagságú rétegében az anyagáram

$$I = I_{szed} + I_{diff} \tag{3.1}$$

alakban írható. A szedimentációs anyagáram

$$I_{szed} = c \cdot \omega^2 \cdot x \cdot s \tag{3.2}$$

összefüggéssel fejezhető ki, ahol c az oldott anyag koncentrációja, ω a rotor szögsebessége, x a kiszemelt síknak a forgástengelytől mért távolsága és s a szedimentációs állandó. A diffúziós anyagáramot pedig Fick I. törvényével adhatjuk meg:

$$I_{diff} = -D\frac{\partial c}{\partial x} \tag{3.3}$$

Itt D az oldott polimer diffúziós állandója és $\partial c/\partial x$ a forgástengelytől x távolságban levő helyen a koncentráció gradiens. Az ultracentrifuga szektoralakú cellájában végbemenő folyamatra vonatkozó kontinuitási egyenlet segítségével, behelyettesítve ebbe (3.2) és (3.3) egyenleteket, eljuthatunk az ultracentrifugás vizsgálatok alapegyenletéhez, a *Lamm-féle differenciálegyenlet*hez (18):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\frac{\partial}{x\partial x}\left[s \cdot \omega^2 \cdot x^2 \cdot c - Dx\left(\frac{\partial c}{\partial x}\right)\right] \tag{3.4}$$

(3.4) egyenletben $\partial c/\partial t$ a koncentráció időbeli megváltozását jelenti a cella elemi térfogatában.

A Lamm-féle differenciálegyenlet szedimentáció egyensúly esetében

$$0 = s\omega^2 x^2 \cdot c - D\frac{\partial c}{\partial x}x \tag{3.5}$$

alakot ölti, mivel ekkor a feltételeknek megfelelően

$$\frac{\partial c}{\partial t} = 0$$

(3.5) egyenlet átrendezésével és (2.7) egyenletből s_0/D_0 értékének behelyettesítésével eljutunk a molekulasúly meghatározásához szükséges egyenlethez:

$$M = \frac{R \cdot T}{(1 - v \cdot \varrho)} \cdot \frac{\dfrac{dc}{dx}}{x \cdot c} \tag{3.6}$$

Az egyenletben szereplő betűk jelentése ismert. Ha tehát a mérőcella bármely x helyén szedimentáció egyensúlyban, a koncentráció és a koncentráció gradiens értéke ismert (3.6) egyenlet alapján a polimer minta molekulasúlyát könnyen ki tudjuk számítani. Megbízható módon két helyen tudjuk mérni a szükséges adatokat: a folyadékoszlop meniszkuszánál és a mérőcella aljánál.

Rövidoszlopos szedimentáció egyensúly mérés. A szedimentációs egyensúly mérési módszernek feltétlenül előnye az, hogy a transzport folyamatok elméletileg egzaktan tisztázottak és a polimereknél sokszor tapasztalt asszociációs jelenségek, melyek a transzlációs diffúziós méréseket illuzórikusokká tehetik, itt nem jutnak szerephez. Hátránya viszont a módszernek az, hogy az egyensúly beállásához szükséges idő tíz órától száz óra nagyságrendű időtartamot is igényelhet. Talán éppen ez volt az oka, hogy a módszert hosszú időn keresztül nem alkalmazták. Hogy újabban ismét előtérbe került, az bizonyos módosításoknak köszönhető. VAN HOLDE és BALDWIN (19) ugyanis részletesen elemezték, hogy milyen adatoktól függ a szedimentáció egyensúly eléréséhez szükséges időtartam. Analízisük szerint a valódi molekulasúlynak egyensúlyi kísérletből ε hibával történő meghatározásához szükséges idő $t(\varepsilon)$ a következő egyenletből adódik:

$$t(\varepsilon) = \left[\frac{(r_a - r_m)^2}{D\pi^2 U(\alpha)}\right] \ln\left\{\frac{\pi^2 \cdot \varepsilon \cdot U^2(\alpha)}{4\left[1+\cos h\left(\frac{1}{2\alpha}\right)\right]}\right\} \tag{3.7}$$

ahol

$$U(\alpha) = \frac{1 + 4\pi^2\alpha^2}{4\pi^2 \cdot \alpha^2}$$

$$\alpha = \frac{2RT}{(1 - v \cdot \varrho) M\omega^2(r_a^2 - r_m^2)}$$

és D a polimer diffúziós állandója, r_m a folyadékoszlop meniszkuszának és r_a a cella aljának távolsága a forgástengelytől mérve. Mint az összefüggésekből kiolvasható, az egyensúly eléréséhez szükséges időt lényegében a mérőcellában levő folyadékoszlop hossza szabja meg. VAN HOLDE és BALDWIN (19) és YPHANTIS (20) sikerrel alkalmaztak 3—1 mm-es folyadékoszlopokat. Ilyen rövid folyadékoszlopok használata esetén a szedimentáció egyensúly beállásához szükséges idő mintegy a századrészére csökken. Így már néhány óra alatt meghatározható adott esetben a polimer molekulasúlya. Különösen előnyös a módszer alkalmazása nem túl széles molekulasúly eloszlással rendelkező polimerek esetében. Széles molekulasúly eloszlás esetén gyakran a molekulasúlyt csak becsülni lehet. Viszonylag nagy molekulasúlyú minták vizsgálatánál az egyensúly beállásához szükséges idő ismét növekszik a diffúziós állandó jelentős csökkenése miatt.

Érdemes kihangsúlyozni a módszerrel kapcsolatban, hogy ugyanazon kísérleti berendezéssel különböző fordulatszámok alkalmazásával a cukor és a vírusok nagyságrendjébe eső molekulasúlyok meghatározása lehetséges.

A manapság használatos ultracentrifugákat speciális mérőcellákkal látják el, melyekben egyszerre négy különböző koncentrációjú oldat vizsgálata végezhető el azonos kísérleti feltételek mellett, igen rövid idő alatt.

Szedimentáció egyensúly sűrűség-gradiensben. A vizsgált makromolekulákról eddig mindig feltettük, hogy azonos kémiai szerkezetűek s legfeljebb a molekulát felépítő elemi egységek (monomerek) számában, a molekulasúlyokban van különbség. Gyakran felvetődik azonban az a kérdés, vajon az oldott polimer szerkezetileg egységes-e? Különös jelentősége van ennek a kérdésnek különböző eredetű deoxiribonukleinsavakkal vagy kopolimerekkel kapcsolatban. Ha ugyanis azonos típusú molekulák egymástól eltérő térbeli szerkezetűek, akkor ez feltétlenül megmutatkozik az oldott polimer molekulák parciális fajlagos térfogatában. A sűrűséggradiensben végrehajtott szedimentáció egyensúly mérés a molekulasúlyon és molekulasúly eloszláson kívül erre a kérdésre is felvilágosítást nyújt.

A módszer lényegében egy sajátos szedimentáció egyensúly mérés, amikor a makromolekulákat nagysűrűségű, kismolekulasúlyú anyag (CsCl, CsBr, Cs_2SO_4, stb.) közepes koncentrációjú oldatában, mint oldószerben, centrifugáljuk. A centrifugális erő hatására az oldószerben sűrűség-gradiens jön létre. Ha létezik egy olyan sűrűségű pont a gradiensben, mely az oldott polimer parciális fajlagos térfogatának reciprokával egyenlő, azaz fennáll a

$$\varrho = \frac{1}{v_{\text{polimer}}}$$

egyenlőség, a polimer molekulák e pont körül egy vékony rétegben gyűlnek össze. A molekulák eloszlása, mint látni fogjuk egy Gauss-szerű függvénnyel írható le az alábbiak szerint: Egyensúlyban érvényes a már ismert

$$c \cdot s \cdot \omega^2 \cdot x = D \frac{\mathrm{d}c}{\mathrm{d}x}$$

egyenlet. Akkor

$$\frac{s}{D} = \frac{1}{\omega^2 \cdot x} \cdot \frac{\mathrm{d}c}{c} \cdot \frac{1}{x} = \frac{1}{\omega^2 x} \frac{\mathrm{d}\ln c}{\mathrm{d}(x - x_0)} \tag{3.8}$$

ha x_0-al jelöljük azt a helyet, ahol a polimer koncentrációja maximális a gradiensben. Behelyettesítve s/D értékét a Svedberg egyenletből, kapjuk

$$M = \frac{R \cdot T \dfrac{\mathrm{d}\ln c}{\mathrm{d}(x - x_0)}}{\omega^2 x(1 - v \cdot \varrho)} \tag{3.9a}$$

vagy

$$\frac{\mathrm{d}\ln c}{\mathrm{d}(x-x_0)} = \frac{M\omega^2 \cdot x \cdot (1 - v \cdot \varrho)}{RT} \tag{3.9b}$$

Ha a sűrűségváltozást a polimer rétegben

$$\varrho = \frac{1}{v_0} + \left(\frac{\mathrm{d}\varrho}{\mathrm{d}x}\right)(x - x_0) \tag{3.10}$$

egyenlettel írhatjuk le, ahol

$$\frac{1}{v_0} = \varrho_0$$

az oldószer sűrűsége, x x_0-hoz közeli, de attól különböző távolságokat jelent a forgástengelyhez viszonyítva és $\mathrm{d}\varrho/\mathrm{d}x$ a sűrűség-gradiens. (3.10) egyenletet behelyettesítve (3.9b) egyenletbe

$$\frac{\mathrm{d}\ln c}{\mathrm{d}(x-x_0)} = -\frac{M\omega^2 x \cdot v_0 \left(\frac{\mathrm{d}\varrho}{\mathrm{d}x}\right)(x - x_0)}{RT} \tag{3.11}$$

vagy kissé átrendezve

$$\frac{\mathrm{d}\ln c}{\mathrm{d}(x-x_0)} = -\frac{M\omega^2 x_0 \left(\frac{\mathrm{d}\varrho}{\mathrm{d}x}\right)_{x_0}(x - x_0)}{\varrho_0 RT} \tag{3.12}$$

amely integrálás után

$$\ln\frac{c}{c_0} = -\frac{1}{2}\frac{M\omega^2 x_0 \left(\frac{\mathrm{d}\varrho}{\mathrm{d}x}\right)_{x_0}(x - x_0)^2}{\varrho_0 RT} \tag{3.13}$$

egyenletet adja.

$$\sigma^2 = \frac{RT\varrho_0}{M\omega^2 x_0 \left(\frac{\mathrm{d}\varrho}{\mathrm{d}x}\right)_{x_0}} \tag{3.14}$$

egyszerűsítést felhasználva a polimer koncentrációjának változását végül

$$c = c_0 \exp\left[\frac{(x - x_0)^2}{2\sigma^2}\right] \tag{3.15}$$

függvény írja le. Ez Gauss-szerű függvény, ahol c_0 a polimer maximális koncentrációja a rétegben x_0 helynél és σ a görbe szórása.

(3.14) egyenlet alapján meghatározhatjuk az oldott polimer molekulasúlyát. A különböző parciális fajlagos térfogattal rendelkező molekulák pedig különböző helyeken jelentkeznek a forgástengelytől mérve, így ezek számát is egyértelműen leolvashatjuk az ultracentrifugás képből.

A sűrűség-gradiensben végzett szedimentáció egyensúly mérések bevezetése MESELSON, STAHL és VINOGRAD nevéhez kapcsolódik (21).

4. *Közelítő szedimentáció egyensúly. Archibald módszer.* Mint a 3. fejezetben rámutattunk, különféle módon kísérelték meg a kutatók lerövidíteni a szedimentáció eléréséhez szükséges időtartamot. ARCHIBALD (22) felismerte, hogy a szedimentáció egyensúly feltételei az ultracentrifuga cellájának két síkjában mindig teljesülnek függetlenül attól, hogy közel vagy távol vagyunk-e az egyensúlyi állapottól. E szóbanforgó két sík a folyadékoszlop meniszkusza és a cella alja. A molekulasúly meghatározására szolgáló összefüggés lényegében a szedimentáció egyensúly mérésre vonatkozó egyenlettel azonos. A molekulasúly meghatározása az ARCHIBALD módszernél is néhány órára tehető csupán. A módszer részletes tárgyalása ELIAS kitűnő kézikönyvében (23) megtalálható.

IRODALOM

1. CZUPPON, A. és GUBA F.: Mérés és Automatika, **7**, 339 (1959).
2. SVEDBERG, T. und PEDERSEN, K. O.: Die Ultrazentrifuge. Összefoglaló monográfia. Dresden—Leipzig: Th. Steinkopff 1940.
3. PEDERSEN, K. O.: J. Phys. Chem., **62**, 1282 (1958).
4. BURGERS, J. M.: Proc. Akad. Amsterdam, **44**, 1045, 1177 (1941); **45**, 9, 125 (1942).
5. BECKMANN, C. O. and ROSENBERG, J.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **45**, 209 (1945).
6. NEWMANN, S. and EIRICH, F.: J. Colloid Sci., **5/6**, 5444 (1950).
7. MOSIMANN, H. and SIGNER, R.: Helv. Chim. Acta, **27**, 1123 (1944).
8. OTH, J. and DESREUX, V.: Bull. soc. chim. Belges, **63**, 133 (1954).
9. ELIAS, H. G.: Makromol. Chem., **29**, 30 (1959).
10. KINELL, P. O. and RANBY, B. G.: Advances of Colloid Science III, p. 182. Interscience, N. Y. 1950.
11. *a)* HERZOG, O., ILLIG, R. und KUDAR, H.: Z. physik. Chem., **167A**, 329 (1933).
    b) PERRIN, F.: Phys. et Radium, **7**, 1 (1936).
12. ONCLEY, J. L. and SIMHA, R.: Science, **92**, 132 (1948).
13. FLORY, P. J. and KRIGBAUM, W. R.: J. Chem. Phys., **18**, 1086 (1950).
14. STOCKMAYER, W. H. and ALBRECHT, A. C.: J. Polymer Sci., **32**, 215 (1958).
15. PEACOCKE, A. R. and SCHACHMAN, H. K.: Biochim. et Biophys. Acta, **15**, 198 (1954).
16. RICE, S. A. and DOTY, P.: J. Am. Chem. Soc., **79**, 3937 (1957).
17. CZUPPON, A. és GUBA F.: Mérés és Automatika, **4/5**, 100 (1959).
18. LAMM, O.: Arkiv Mat. Astron. Fysik, **21B**, No. 2 (1929).
19. VAN HOLDE, K. E. and BALDWIN, R. L.: J. Phys. Chem., **62**, 734 (1958).
20. YPHANTIS, D. A.: Ann. N. Y. Acad. Sci., **88**, 586 (1960).
21. MESELSON, M., STAHL, F. W. and VINOGRAD, J.: Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), **43**, 581 (1957).
22. ARCHIBALD, W. J.: J. Phys. and Colloid Chem., **51**, 1204 (1947).
23. ELIAS, H. G.: Ultrazentrifugen-Methoden, Beckman Instruments GmbH München, 1962.

PREPARATÍV SZEDIMENTÁCIÓS MÓDSZEREK

GAÁL ÖDÖN

BOTE Orvosi-Vegytani Intézete, Budapest

A modern laboratóriumi módszerek között nagyon nagy számban találunk olyanokat, amelyek előadásom címe alapján annak tárgyát képezhetnék. Gondolok itt elsősorban az adszorbensek előkészítésében gyakran alkalmazott egyszerű ülepítésekre, vagy az oldhatatlan anyagok, csapadékok ülepítéssel történő eltávolítására. Előadásomban azonban csak azokról a módszerekről szeretnék beszélni, amelyek különböző mértékben ülepedő részecskék egymástól való elválasztására nyújtanak lehetőséget, gyakran nagy teljesítményű ultracentrifugák felhasználásával.

A ma már nagyszámú preparatív centrifugálási eljárás rendszerezésére több szempontot kell figyelembe venni. A preparatív módszereket éppen úgy, mint az analitikai szedimentációs eljárásokat, két nagy csoportra lehet osztani.

Alkalmazhatjuk az ülepedési sebesség különbségen alapuló eljárásokat, vagy centrifugálhatunk az ülepedési egyensúly eléréséig. Az első esetben, ha a megadott időnél hosszabb ideig centrifugálunk, akkor a szuszpendált részecskékből egyre több ülepedik ki és elérhetjük a teljes kiülepedést, míg a második esetben az ülepedési egyensúly elérése után további centrifugálás nem okoz változást, ugyanis az egyensúly azt jelenti, hogy a részecske és a körülötte levő közeg sűrűsége azonos, ezért az ilyen típusú centrifugálást izopiknikusnak is nevezik. Feloszthatjuk a centrifugálási módszereket az alkalmazott közeg alapján is. Az egyszerűbb centrifugálásoknál a közeg teljesen homogén, nincs sűrűségkülönbség a centrifuga csövön belül. Bizonyos esetekben jobb elválasztást lehet kapni akkor, hogy ha a közeg sűrűségét a cső tetejétől az aljáig fokozatosan növeljük. Ez esetben sűrűség grádiens centrifugálásról beszélünk. Az alkalmazott grádiens lehet szakaszos, vagy folyamatos; ez utóbbi készítési módját tekintve lehet előre elkészített, vagy kialakíthatjuk ülepítés közben a centrifugálással.

Az elválasztandó anyag felvitele kétféleképpen történhet; vagy egyszerűen beleöntjük a centrifuga csőbe, vagy egy folyadékkal töltött centrifugacsőben a folyadék oszlopra — amelyben esetleg sűrűség gradienst alakítottunk ki — rétegezzük rá a kiindulási szuszpenciót. Az utóbbi eljárás esetében beszélünk zóna centrifugálásról.

Az előbbiekben vázolt felosztás alapja CORBETT-től (1) származik. Természetesen a fenti három szempont szerint mindegyik módszer osztályozható, így a fenti centrifugálási módok kombinációja is előfordulhat.

Mielőtt rátérünk a centrifugában történő ülepedés kvantitatív tárgyalására, nézzük meg, hogy a ható erők milyen elmozdulásra kényszerítik a szuszpendált részecskéket.

A centrifugákban alkalmazott rotorok egyik típusa a kilengő-poharas rotor. Ezekben a rotorokban három vagy hat pohár van, melyekbe egy-egy — természetesen megfelelő pontossággal kitárázott — centrifugacsövet helyezünk. Míg a csövek az asztalon levő rotorban vannak, addig a tengelyük függőleges, de a centrifugális erő hatására annak irányába fognak beállni, így a centrifugális erő hatására a részecskék a centrifugacső hossztengelyével párhuzamosan fognak elmozdulni és megfelelő idő után a cső alján gyűlnek össze. Hasonló a helyzet azoknál az új típusú rotoroknál is, melyeket speciálisan zóna-centrifugálás céljára dolgoztak ki az elmúlt években ANDERSON és munkatársai (2). Ezekre a későbbiekben még visszatérek.

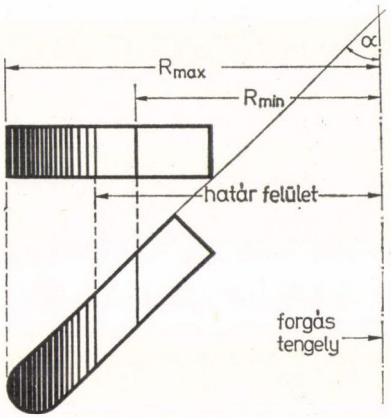
Más a helyzet azonban azokban a rotorokban — szögrotorok vagy szögfejek — amelyekben a centrifugacső tengelye a forgástengellyel egy állandó — 90°-nál kisebb — szöget zár be. A részecskék elmozdulása természetesen itt is a centrifugális erő irányában történik. Ez az irány azonban nem esik egybe a centrifugacső tengelyével, így a részecskék a centrifugacső oldalsó falához jutnak, itt koncentrációjuk megnő. Tekintettel arra, hogy a centrifugális erő irányában elmozdulásuk gátolt, kényszermozgást fognak végezni a csőnek a forgástengelytől távolabb eső fala mentén. Mivel a részecskék koncentrációja itt nagyobb, így a fal mellett levő réteg sűrűsége is nagyobb, ennek következtében egy vékony folyadékréteg fog a cső alja felé áramolni addig, míg a cső alján ki nem ülepednek belőle a részecskék, ekkor ugyanis sűrűsége kisebb lesz és a centrifuga tengelyéhez közelebb eső fal mentén áramolni fog felfelé. Ez a mozgás viszont egy visszakeverést eredményez, azaz az ülepedés ellen dolgozik. A szögfejekben uralkodó viszonyokat nagyon részletesen taglalják PICKELS (3) és GIEBLER (4) munkái, valamint az egyes centrifugák használati utasításai. Tapasztalat szerint a centrifugacsőben eredetileg a forgástengelytől r_1 távolságban elhelyezkedő részecske r_2 távolságra ugyanannyi, vagy csak kicsit rövidebb idő alatt jut el szögfejben, mint lengő-poharas rotorban, egyébként azonos körülmények között, így a kvantitatív viszonyok tárgyalásánál nem kell különbséget tenni a kétféle típusú rotor között (L. 1. ábra).

Meg kell említenem, hogy a részecskék diffúziója is rontja az ülepedés hatásfokát. Ha viszonylag nagy részecskékről van szó, akkor a diffúziót első megközelítésben figyelmen kívül hagyhatjuk, tekintettel arra, hogy ezek a részecskék lényegesen gyorsabban ülepszenek, mint amilyen sebességgel a diffúziós mozgásuk történik.

A kvantitatív tárgyalásnál az ülepedési állandó definiáló egyenletéből

kell kiindulni, ha ki akarjuk számítani, hogy egy s ülepedési állandójú részecske adott ω szögsebesség mellett mennyi idő alatt jut el a forgástengelytől mért r_1 távolságról r_2 távolságra:

$$s = \frac{1}{\omega^2 r} \frac{dr}{dt} \tag{1}$$



1. ábra Kilengő-poharas és szögrotorokban történő ülepedés folyamatának vázlatos összehasonlítása

egyenlet átrendezésével és r_1, r_2 határok közötti integrálásával

$$\int_{t_1}^{t_2} s \, dt = \frac{1}{\omega^2} \int_{r_1}^{r_2} \frac{dr}{r} \tag{2}$$

megkapjuk a keresett időt:

$$t = t_2 - t_1 = \frac{1}{s} \frac{\ln r_2 - \ln r_1}{\omega^2} \tag{3}$$

A teljes kiülepítéshez szükséges időt (T_s) úgy kapjuk ebből, hogy a cső aljától legtávolabb levő részecskének a cső aljáig történő ülepedésének idejét vesszük figyelembe, azaz az r_2 és r_1 értékek helyébe a legnagyobb, ill. a legkisebb sugár értékét (R_{max} és R_{min}) helyettesítjük:

$$T_s = \frac{1}{s} \frac{\ln R_{max} \ln R_{min}}{\omega^2} \tag{4}$$

A gyakorlatban nem a szögsebességet, hanem a percenkénti fordulatszámot (n) szokták a centrifugák sebességének jellemzésére megadni. A kettő közötti összefüggés:

$$\omega = \frac{2\pi}{60} n \tag{5}$$

alapján a teljes kiülepítéshez szükséges időt a fordulatszám segítségével így írhatjuk:

$$T_s = \frac{1}{s} \left(\frac{60}{2\pi} \right)^2 \frac{\ln R_{max} - \ln R_{min}}{n^2} \tag{6}$$

Ebből a képletből számolva az időt másodpercekben fogjuk megkapni.

Azokban a centrifugákban, ahol a centrifugacsöveket légmentesen folyadékkal kell megtölteni és lezárni, R_{max} és R_{min} értékek csak a rotor, illetőleg a belehelyezhető csövek méreteitől függenek, így a fordulatszám függvényében az

$$\frac{\ln R_{max} - \ln R_{min}}{n^2} \tag{7}$$

értékek táblázatosan megadhatók. Tekintettel arra, hogy az ülepedési idő kifejezésében csak ez a tört veszi figyelembe a centrifuga adatait, célszerű volt definiálni az ún. „performance index"-et (teljesítmény index), amely definíciószerűen a fenti érték reciproka, azaz:

$$P_i = \frac{n^2}{\ln R_{max} - \ln R_{min}} \tag{8}$$

A teljes kiülepítéshez szükséges időt a P_i érték ismeretében a

$$T_s = \frac{1}{s} \left(\frac{60}{2\pi} \right)^2 \frac{1}{P_i} \tag{9}$$

képlettel kaphatjuk meg.

Abban az esetben, ha nem ismeretes a részecskék ülepedési állandója, kiszámíthatjuk a részecskék és a közeg adataiból:

$$s = \frac{(\sigma - \varrho) d^2}{18 \eta} \tag{10}$$

ahol: σ a részecske sűrűsége, d a gömbalakú részecske átmérője, ϱ a közeg sűrűsége, η a közeg viszkozitása.

A fenti adatok birtokában a teljes kiülepedés ideje percekben:

$$T_s = \frac{18 \eta}{d^2 (\sigma - \varrho)} \frac{60}{4\pi^2} \cdot \frac{1}{P_i} \tag{11}$$

Az eddigiekben ideális körülményeket feltételezve tárgyaltuk az ülepedés folyamatát, most szeretnék rámutatni néhány, sok esetben nagyon fontos tényezőre, amelyek befolyásolják az ülepedést.

A közeg viszkozitásának és sűrűségének növekedése természetesen gátolja az ülepedést. Abban az esetben, ha az ülepedési állandóval számolunk — amelyet 20 C°-os víz sűrűségének és viszkozitásának megfelelő közegre adnak meg — a következő képlet segítségével vehetjük figyelembe a közeg eltérő viszkozitását és sűrűségét:

$$S_{20,w} = S_{obs} \frac{\eta(1 - \bar{v}\varrho_{20,w})}{\eta_{20,w}(1 - \bar{v}\varrho)} \tag{12}$$

Ahol az $S_{20,w}$ az ülepedési állandó 20 C°-os vízben, az S_{obs} az η viszkozitású és ϱ sűrűségű közegben megfigyelhető ülepedési állandó, mindkettő Svedberg egységekben kifejezve $\eta_{20,w}$ és $\varrho_{20,w}$ a víz viszkozitása és sűrűsége 20 C°-on $\bar{v}$ a partikula specifikus térfogata.

A képlet híg oldatokra vonatkozik, de néhány %-os oldat esetében is jó közelítést ad.

A (11) képletben szereplő d átmérő csak gömbalakú partikulák jellemzésére használható. Nem gömbalakú részecskék esetén, ha az átlagos átmérővel számolunk, akkor a tapasztalat szerint hosszabb az ülepedési idő a számítottnál, mégpedig ha a legnagyobb és legkisebb átmérő aránya 3 : 1, akkor 1,1-szerese a számítottnak, 5 : 1 aránynál 1,25-tel, 10 : 1 aránynál 1,5-tel, 20 : 1 aránynál pedig 2-vel kell szoroznunk az átlagos átmérővel számolt ülepedési időt.

Mint a bevezetőben már említettem, a centrifugákban az ülepedés velejárójaként kialakul egy áramlás. Az ott említett okon kívül a konvekció és az ezzel együttjáró visszakeveredés oka lehet még hőmérséklet ingadozás és sebesség ingadozás is. A hőmérséklet változás a rétegek sűrűségének megváltoztatása miatt zavar, míg a centrifugálás közben bekövetkező fordulatszám változás azért zavaró, mert a csövekben levő folyadék tehetetlensége miatt, igyekszik megtartani az előző sebességét, ami keveredést okoz. Ezen hibaforrások kiküszöbölésére a modern centrifugák tervezői különösen nagy gondot fordítanak a hőmérséklet és fordulatszám jó kontrollálására, valamint a megfelelő fékezési módszerek kidolgozására.

A visszakeverés veszélye különösen akkor nagy, ha nagy a csövek átmérője és lassú a részecskék ülepedése. A centrifugák tervezői igyekeznek éppen ezért úgy elhelyezni a csöveket, és olyan cső-átmérőket alkalmazni, amelyeknél a zavaró hatások minimálisra csökkenthetők, azonban még így sem lehet elérni azt, hogy az ideális esetre számolt ülepedési idő alatt a részecskék kiülepítése teljesen bekövetkezzen. Jól konstruált centrifugáknál is csak a 66—75% ül ki a számított időn belül és a maradék kicentrifugálásához lényegesen hosszabb idő szükséges, sőt — a visszakeverés veszélye miatt — egyszerű centrifugálásnál elvileg csak nagyon hosszú idő alatt ülepíthetnénk ki minden részecskét.

A következőkben néhány, a laboratóriumi munkában gyakran előforduló feladatot szeretnék bemutatni.

Az irodalomban található módszereknél megadják, hogy milyen ülepítési

idővel, milyen fordulatszám mellett, melyik centrifuga ill. rotor alkalmazásával végezték el az ülepítést. Kérdés, hogyan lehet ugyanolyan mértékű ülepítést elérni más centrifugában, vagy más rotorban? Szeretném felhívni a figyelmet arra, hogy a közepes centrifugális gyorsulás megadása nem elegendő, hiszen ebből nem számolhatunk, ugyanis azonos közepes centrifugális erő esetén egészen más az ülepedés azokban a csövekben, amelyek a forgástengellyel más szöget zárnak be, de azokban is, amelyek azonos szögben helyezkednek el, de hosszúságuk vagy a bennük levő folyadék rétegvastagsága különböző. A számításnál a (11)-ből indulhatunk ki, azonos közeg és partikula esetén az ülepedési idő csak a R értéktől függ és azzal fordítva arányos, így

$$\frac{T_{s_1}}{T_{s_2}} = \frac{P_{i_2}}{P_{i_1}} \text{ vagy } T_{s_1} P_{i_1} = T_{s_2} P_{i_2} \tag{13}$$

ahol az 1 és 2 indexek az egyes centrifugálásokra vonatkoznak.

A biokémiai preparatív szedimentációs módszereknél a leggyakrabban többféle partikula egymástól való elválasztása a cél. Pl. egy sejtből készült hemogenizátumból egymás után különböző fordulatszámú centrifugálással elválaszthatjuk a sejtmagokat, mitochondriumokat, mikroszomákat. Az ilyen centrifugálási módszert nevezzük differenciál centrifugálásnak.

A (6) képlet alapján az egyes partikulák szedimentációs konstansainak ismeretében kiszámíthatjuk a kiülepítésükhöz szükséges időt, sőt azt is, hogy milyen mértékben szennyeződnek át az egyes frakciók. Példaként egy egyszerűsített számítást szeretnék bemutatni a mitochondriumok és ribaszomák elválasztására. Az előbbiek ülepedési állandója megközelítőleg $4 \cdot 10^4$ S, míg a riboszómáké 70 S.

Ha ezen komponenseket tartalmazó oldatot Spinco gyártmányú centrifugák N° 30 rotorjában 10 000 ford/perc fordulatszámmal centrifugáljuk, akkor a $P_i = 1{,}4 \cdot 10^8$. (Mivel ennek a rotornak a csöveit légmentesen kell zárni az $R_{\min}$ és $R_{\max}$, és így a P_i is táblázatban megtalálható.)

A megfelelő értékeket helyettesítve a (9) képletbe:

$$T_s = \frac{1}{1{,}4 \cdot 10^8} \cdot \frac{1}{4 \cdot 10^4 \cdot 10^{-13}} \cdot \frac{60}{(2\pi)^2} = 2 \text{ perc}$$

adódik a mitochondriumok teljes kiülepítésére számolt elméleti időnek.

Természetesen ezen idő alatt a 70 S ülepedési állandójú részecskék is ülepszenek, és azon partikulák, amelyek az ezen idő és fordulatszám által meghatározott ülepedési útnál közelebb vannak a cső aljához, kiülepszenek. Ezt a távolságot a (6) képletből számolhatjuk ki annak ismeretében, hogy az említett rotornál az $R_{\max} = 10{,}5$ cm, és az idő 2′ fordulatszám pedig 10 000 ford/perc.

$$2 = \frac{\ln 10{,}5 - \ln R_{\min}}{10\,000^2} \cdot \frac{1}{70 \cdot 10^{-13}} \cdot \frac{60}{(2\pi)^2}$$

Ebből $R_{min} = 10$ cm, azaz azok a riboszomák fognak az adott körülmények között kiülepedni, melyek 0,5 cm-re vannak a cső aljától. A cső geometriai adatai és a partikulák koncentrációja alapján az átszennyezést kiszámíthatjuk. Hangsúlyoznom kell, hogy ez a számolás nagymértékben egyszerűsített. Pl. nem vettük figyelembe azt, hogy a közeg nem víz, hanem közel izotóniás szaharóz, hiszen épp a mitochondriumok preparálásához erre feltétlenül szükség van. Az eddigekből következik, hogy differenciál centrifugálással elvileg is csak a legkisebb ülepedési állandójú partikulákat tudjuk tisztán kinyerni, de ezeket sem teljes mennyiségükben. A kiülepített frakciók ismételt szuszpendálása és kiülepítése alkalmas azok tisztítására.

A (9) módot ad arra is, hogy kiszámítsuk a szedimentációs konstansot. Tekintettel arra, hogy a zavaró hatások miatt a számítható teljes kiülepedést jelentő idő alatt nem ülepednek ki a partikulák, így csak egy közelítő értéket kapunk. Pontosabbá tehető a számítás akkor, ha csak részleges kiülepítést alkalmazunk, és ennek megfelelő R_{min} és R_{max} értékkel számolunk. Az így kapott érték is azonban csak tájékoztató jellegűnek tekinthető.

A differenciál centrifugálás fenti ismertetéséből láttuk, hogy tisztán csak a legkisebb szedimentációs állandójú részecskéket tudjuk izolálni. Az egyes frakciók átszennyeződésének veszélye minden olyan esetben fennáll, amikor az elválasztandó anyagot egyenletes eloszlásban visszük be a centrifugacsőbe. Mindegyik komponens elvileg tisztán kapható abban az esetben, ha zónacentrifugálást végzünk, azaz az elválasztandó anyagot egy folyadékoszlop tetejére rétegezzük és így kezdjük az ülepítést. Erre a célra azonban nem használhatunk szögfejeket, mert ebben az esetben az ülepedő zóna a konvekció miatt összekeveredne. Tekintettel arra, hogy feltétlenül szükséges az egyes rétegek keveredésének megakadályozása, célszerű sűrűség gradienst létesíteni a folyadékoszlopon belül. A sűrűség gradiens létrehozásához leggyakrabban szaharózt szoktak alkalmazni. Ennek a módszernek az elméletével Britten és Roberts (5), valamint Martin és Ames (6) foglalkoztak.

A folyamatos gradiensek közül a lineáris gradiens az, amelyet legtöbbször alkalmaznak. Ennek elkészítése úgy történhet, hogy két egyforma átmérőjű, egymással alul összekötött csőből álló keverőedény egyik szárába a kisebb sűrűségű (pl. 5, vagy 15%-os szaharóz) oldatot teszünk megfelelő mennyiségben, míg a másik csőbe, ahol egy keverővel biztosítjuk a két oldatnak a gyors és egyenletes keveredését, a nagyobb sűrűségű (pl. 20 vagy 30%-os szaharóz) oldat kerül. Ebből a csőből egy kifolyó csövön keresztül csurgatjuk a centrifugacső belső falára az oldatot. Ezzel elérhetjük, hogy a cső alján 20 vagy 30% a szaharóz koncentráció, míg a tetején 5, ill. 15%, és a cső aljától mért távolság függvényében lineárisan változik a fenti határok között. A centrifugálás végén a cső alját kilyukasztjuk és a kicsöpögő oldatból frakciókat szedünk, majd az egyes frakciókat analizáljuk. Természetesen ezek a műveletek automatizálhatók.

Az ülepedés vizsgálatára MARTIN és AMES (6) számításait szeretném ismertetni, akik a már ismert alapegyenletekből (1) és (12) indulnak ki és különböző fehérjék ülepedésének időbeli lefolyását vizsgálták szaharóz gradiensben.

Az indexeket célszerűen megváltoztatva, ezen egyenleteket így írhatjuk fel:

$$s_{T,m} = \frac{dr}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 r} \tag{14}$$

ill.

$$s_{20,w} = s_{T,m} \frac{\eta_{T,m}(\sigma_p - \varrho_{20,w})}{\eta_{20,w}(\sigma_p - \varrho_{T,m})} . \tag{15}$$

A T index a hőmérsékletre, m a partikulát körülvevő közegre (mediumra), p fehérjére, w vízre vonatkozik, a 20 pedig a 20 C°-on mért adatokat jelöli. A többi jelölés már ismert. A (14) és (15) egyesítésével:

$$s_{20,w} = \frac{1}{\omega^2 r} \frac{\eta_{T,m}(\sigma_p - \varrho_{20,w})}{\eta_{20,w}(\sigma_p - \varrho_{w,m})} \frac{dr}{dt} . \tag{16}$$

Az egyenlet átrendezésével:

$$\omega^2 s_{20,w}\, dt = \frac{\sigma_p - \varrho_{20,w}}{\eta_{20,w}} \frac{\eta_{T,m}}{\sigma_p - \varrho_{T,m}} \frac{1}{r} dr \tag{17}$$

kapott formában $\frac{\sigma_p - \varrho_{20,w}}{\eta_{20,w}}$ állandó érték, és minden fehérjére azonos, tekintettel arra, hogy a fehérjék specifikus térfogata jó megközelítéssel 0,725-nek vehető. A közeg viszkozitása és sűrűsége forgástengelytől mért távolság függvényében változik.

A (17) baloldala könnyen integrálható:

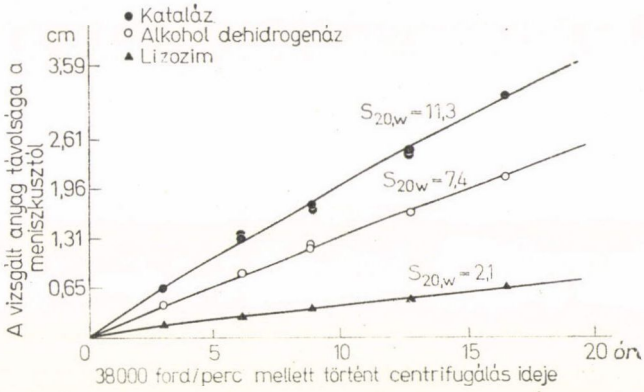
$$\int_0^t s_{20,w}\, \omega^2\, dt = s_{20,w}\, \omega^2 t \tag{18}$$

A jobboldal numerikusan integrálható trapezoid közelítéssel:

$$\int_0^{r_{i+1}} F(r)\, dr = \sum_0^{r_{i+1}} F(r_i)\,(r_{i+1} - r_i) + \frac{1}{2} \sum_0^{r_{i+1}} [F(r_{i+1}) - F(r_i)]\,[r_{i+1} - r_i] \tag{19}$$

$$\text{az} \quad F(r) = \frac{\eta_{T,m}(r_i)}{\sigma_p - \varrho_{T,m}(r_i)} \cdot \frac{1}{r_i} \tag{20}$$

értékek számíthatók a szaharóz sűrűségét és viszkozitását megadó táblázatok segítségével, így az ülepedés időgörbéjét ábrázolhatjuk. Ha a számítást a Spinco centrifuga SW—39L jelzésű lengőpoharas rotorjára végezzük el, 5—20%-os szaharóz gradiens esetében azt kapjuk, hogy az ülepedés egyenletes sebességgel történik. Ennek oka — szemléletesen szólva — az, hogy ebben a rotorban az R_{min} éppen fele az R_{max} értéknek, így a centrifugális erő éppen kétszer akkora a cső alján, mint a tetején, viszont a 20%-os szaharózban azonos centrifugális erő esetén adott részecske fele akkora sebességgel ülepszik, mint ugyanaz a részecske 5%-os szaharózban.



2. ábra Beckman Spinco centrifuga SW-39 jelzésű kilengő-poharas rotorban történő ülepedés időbeli lefolyása különböző fehérjék esetében, Martin és Ames (6) adatai szerint. Az ábrán látható mért adatok potosan igazolják a szerzők számításának helyességét

Martin és Ames (6) számításait, kísérleteik meggyőzően igazolták (l. 2. ábra) Mivel az SW—39L rotorban 5—20% lineáris szaharóz gradiens esetén az ülepedés a centrifugálási idővel egyenesen arányos, a különböző szedimentációs konstansú anyagok meniszkuszból mért távolságának aránya azonos lesz a szedimentációs konstansaik arányával, ha specifikus térfogatuk azonos. Ezért ez a módszer felhasználható ülepedési állandó meghatározására, ha a meghatározandó anyaggal együtt ugyanabban a gradiensben egy ismert ülepedési állandójú anyagot is centrifugálunk.
Ekkor:

$$S_{20,w}\ \text{ismeretlen} = \frac{\text{ismeretlen anyag távolsága a meniszkusztól}}{\text{ismert anyag távolsága meniszkusztól}} \cdot S_{20,w}\ \text{ismert}$$

Ennek a módszernek a munkaigénye nagyobb, mint az analitikai ultracentrifugával történő szedimentációs konstans meghatározásnak, és a pontossága sem éri el az analitikai ultracentrifugával nyert érték pontosságát, mégis sok esetben előnyös. Az analitikai ultracentrifugában ugyanis optikai tulajdon-

ságaik alapján vizsgáljuk az anyagokat, így egy sokféle fehérjét tartalmazó nyers enzim készítményből nem határozhatjuk meg az enzim fehérje szedimentációs konstansát, míg a gradiens centrifugálással, ahol aktivitásméréssel követhetjük a kérdéses enzim útját, a szedimentációs konstans meghatározható.

A gradiens centrifugálás a molekuláris biológiai kutatásban úgyszólván mindennapi, alapvető módszerré vált az utóbbi években. Az előbb már tárgyalt példán kívül csak néhányat szeretnék felsorolni, így a riboszómák és poliszómák egymástól való elválasztását, riboszóma alegységek izolálását, riboszomális ribonukleinsavak elválasztását, messenger RNS izolálását és mitochondriumok tisztítását.

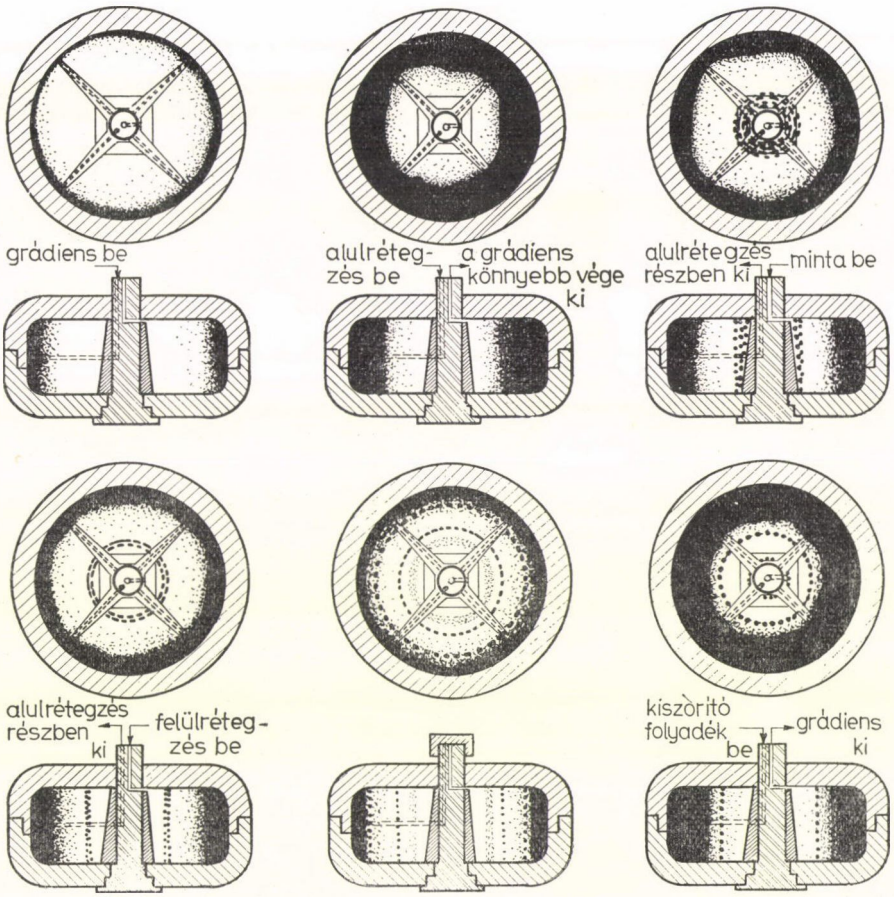
A gradiens centrifugálás vázolt módszerének nagy hátránya, hogy egyszerre csak kis mennyiségeket lehet elválasztani. Pl. a Spinco SW—39L jelzésű rotorjában egyidejűleg 3 × 0,5 — 1 mg anyagot választhatunk el. Bizonyos mértékig növelhető a kapacitás nagyobb térfogatú csövek alkalmazásával, vagy három helyett hat lengőpohár alkalmazásával.

Sokkal nagyobb kapacitású gradienseket lehet készíteni ANDERSON és munkatársai (2) által 1955—1966 között kifejlesztett zóna centrifugálásra kiképezett rotorokban. Ezek belül négy részre osztott hengerek, különböző térfogattal (pl. 650 ml vagy 1670 ml). Különleges érdekességük, hogy forgás közben tölthetők és üríthetők. A velük végzett munka fázisai a következők:

Az üres rotort behelyezzük a centrifugába és egy alacsony fordulatszámig felgyorsítjuk, ezután forgás közben rétegezzük be a megfelelő grádienst, amely az előbbiekben ismertetett módon készül. A gradienst úgy vezetjük be, hogy a forgó rotor belső falához előbb a kisebb fajsúlyú részét visszük be a gradiensnek. A gradiens elkészülte után egy, a legnagyobb sűrűségű részénél is nagyobb sűrűségű oldatot rétegezünk a rotor külső széléhez, ezzel a gradiens könnyebb részét kinyomjuk a rotorból. A következőkben a gradiens belső felére visszük be a mintát és ezzel kiszorítjuk az előbb bevitt nagy sűrűségű folyadék egy részét. A minta után egy kis sűrűségű réteget viszünk be a rotor tengelyéhez. Ezen műveletek után a minta egy keskeny henger palást formájában van a rotorban. Ezután következik a tulajdonképpeni centrifugálás. A megfelelő fordulatszám mellett a szükséges ideig centrifugálunk, majd ismét lelassítjuk a rotort és egy nagy sűrűségű oldatot nyomunk a rotor külső széléhez, aminek következtében a tengelynél benyúló csövön át az egyes zónákat egymás után kapjuk meg. A kifolyó folyadékot frakció-kollektorra, és ha van, automata regisztráló fotométerre vihetjük, amely segítségével a zónák helyét és azokban levő anyag koncentrációját megkapjuk. Az itt leírt műveleteket szemlélteti a 3. ábra, míg a 4. ábrán egy ilyen tipusú rotorban végzett centrifugálás eredményét láthatjuk.

Bizonyos esetekben nem folyamatos gradienst is alkalmaznak, ezeknek legnagyobb előnye, hogy az anyagokat koncentráltabban kapjuk meg, az egyes rétegek határfelületén, ha jól választottuk meg a körülményeket.

Néhány szóban szeretnék még az egyensúlyi, azaz izopiknikus centrifugálásról is beszélni. Mint a bevezetőben említettem, az izopiknikus centrifugálás végén mindegyik részecske abban a rétegben helyezkedik el, amelynek sűrűsége megegyezik a saját sűrűségével.

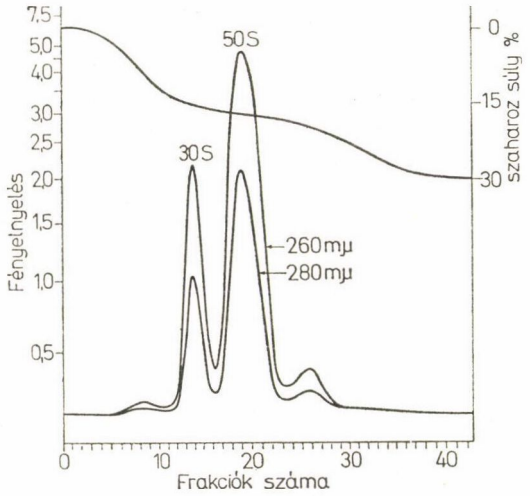


3. ábra Anderson és munkatársai által kidolgozott rotorok működésének vázlata (2)

Abban az esetben, ha az anyagunkat belekeverjük egy oldatba és az egyensúly eléréséig centrifugáljuk, csak egy frakciót kaphatunk tisztán, nevezetesen azt, amelyiknek a sűrűsége az illető közegben éppen akkora, mint a közegé; az ennél nagyobb sűrűségű részecskék a cső aljára ülepednek ki, a kisebb sűrűségűek pedig a meniszkusznál gyűltek össze.

Több frakciót is jól el lehet választani, ha grádiens centrifugálást végzünk. Ebben az esetben mindegy, hogy az anyagot hogyan visszük be a grádiensbe. Felrétegezhetjük a folyadékoszlop tetejére, vagy belekeverhetjük a grádiens

készítésekor a grádiens valamelyik, vagy mindkét komponensébe. Nem feltétlenül kell előre elkészített grádienst használni. Cézium klorid esetén pl. centrifugálás közben is kialakul a grádiens. Erről, az analitikai módszerekről szóló előadásban, nagyon szép és mélyreható ismertetést hallottunk, amelyhez elvileg újat nem tudok hozzátenni, csak arra szeretném felhívni a figyelmet, hogy ez a módszer preparatív centrifugákkal is kivitelezhető. A preparatív centrifugákban azonban az egyensúly beállásához hosszabb idő kell, mivel a csövek térfogata nagyobb. Gyorsítani lehet az eljárást, ha nem töltjük meg teljesen a csöveket a cézium klorid oldattal. Ebben az esetben, hogy centrifugálás során



1. ábra E. coli riboszóma alegységek elválasztása szaharóz sűrűség grádiens alkalmazásával Anderson szerint (2). Az egyes frakciók térfogata 40 ml

a csőre nehezedő nyomás ne szakítsa el a centrifugacsövet, valamilyen vízzel nem elegyedő, víznél kisebb fajsúlyú folyadékot, pl. paraffin olajat kell a cézium klorid oldat fölé rétegezni. Centrifugálás után ugyanúgy, mint más gradiens centrifugálásnál, kilyukasztjuk a csövet és analizáljuk a frakciókat.

Előadásomból bizonyára sok érdeklődésre számottartó módszer maradt ki, de talán ezzel a rövid ismertetéssel is sikerült megmutatnom, hogy a preparatív szedimentációs módszerek sokoldalú segítséget nyújtanak a modern laboratóriumi munkához.

IRODALOM

1. Corbett, J. R.: MSE Publication (1966).
2. Anderson, N. G.: Science **154,** 103 (1966).
3. Pickels, E. G. J.: Gen. Physol. **26,** 341 (1943).
4. Giebler, P. Z.: Naturforschung **13b,** 238 (1958).
5. Britten, R. J., Roberts, R. B.: Science **131,** 32 (1960).
6. Martin, R. G., Ames, B. N.: J. Biol. Chem. **236,** 1372 (1961).

NUKLEINSAV HIBRIDIZÁCIÓ

VENETIANER PÁL

BOTE Orvosi-Vegytani Intézete, Budapest

A messenger-RNS fogalma JACOB és MONOD (1) alapvető jelentőségű dolgozata nyomán terjedt el általánosan a biológiában. Az az elképzelés azonban, hogy a DNS kettősspirálisban kódolt genetikai információt valamilyen RNS adja tovább a fehérjeszintézis helyére, ha bizonytalan formában is, de már régebben „a levegőben volt". Ennek az RNS-nek bázisszekvenciája feltételezés szerint azonos lett volna a DNS-évél (illetve annak egy láncával). Ilyen ribonukleinsav létének lehetőségére mutatott rá ASTRACHAN és VOLKIN (2) kísérlete, amelyben megfigyelték, hogy fágfertőzés során a baktériumban egy olyan új RNS keletkezik, amelynek bázisösszetétele megegyezik a fág DNS bázisösszetételével. A teljes bázisszekvencia azonossága direkt elemzéssel még ma sem bizonyítható. Egy rendkívül elegáns és egyszerű új módszer — a nukleinsav hibridizáció — lehetővé tette, hogy teljes sorrendmeghatározás nélkül is bizonyítható legyen a két nukleinsavlánc komplementaritása.

Kiindulópontul az a megfigyelés szolgált (3, 4), hogy ha hődenaturáció után DNS molekulák oldatát magas ionerősségű sóoldatban lassan lehűtik, akkor a denaturáció során felszakadt hidrogénhídkötések helyreállnak, újraképződik az eredeti kettősspirálú DNS. Ez a folyamat szigorúan specifikus, csak komplementer DNS láncok képesek kettősspirál képzésére. Mivel RICH (5) már korábban kimutatta szintetikus polinukleotidokkal RNS—DNS kettősspirálok képződésének lehetőségét, SPIEGELMANN és HALL (6) arra gondoltak, hogy a fenti technika (angolul: „annealing") alkalmazásával DNS—RNS hibrid képződése kimutatható lenne, ha a kísérleti elegy tartalmazna olyan RNS-t, amelynek bázisszekvenciája homológ valamely DNS-sel. A hibridmolekula kimutatása céljából fágfertőzés után keletkezett ^{32}P-jelölt RNS-t tricium-mal jelölt fág DNS-sel kevertek össze és elvégezték a fenti reakciót (melegítés, lassú hűtés magas sókoncentrációjú oldatban). Ezután sűrűséggradiens ultracentrifugálással frakcionálták a reakcióelegyet és kimutattak egy RNS és DNS között ülepedő komponenst, amely mindkét radioaktív izotópot tartalmazta, tehát feltehetően azonos volt a keresett hibridmolekulával. Nem homológ DNS alkalmazásával ilyen hibridet nem kaptak. Ez a sikeres kísérlet igazolta, hogy a fágfertőzés után gyorsan keletkező RNS frakció valóban a fág DNS egyik

láncának komplementerje (pontosabban: azt hogy csak az egyik és nem mindkét DNS lánc komplementerje keletkezik, csak később sikerült igazolni, (7). A felhasznált technika tehát alkalmasnak bizonyult ilyen természetű problémák vizsgálatára, bár e kezdeti formájában még igen sok hiányossága volt, melyeket a metodika továbbfejlesztésével fokozatosan sikerült kiküszöbölni.

Igen kis mennyiségű hibrid megbízható kimutatását lehetetlenné tette az ún. „zaj", vagyis az aspecifikus adszorpció révén keletkezett látszólagos kötődés. Ennek kiküszöbölésére YANKOVSKY és SPIEGELMAN (8) bevezették a ribonukleáz kezelést. Ismert volt ugyanis, hogy a ribonukleáz csak szabad RNS-t bont, a valódi DNS—RNS hibrid az enzimnek ellent áll (9).

A rendkívül nehézkes és hosszadalmas gradiens-centrifugálást HAYASHI és SPIEGELMANN (10) a jóval gyorsabb MAK (metil-albumin-kovaföld) oszlopkromatográfiával helyettesítették. Még tovább egyszerűsítette a módszert a membránfilter-technika bevezetése. NYGAARD és HALL (11) kimutatták, hogy nitrocellulóz membránon a DNS—RNS hibrid megkötődik, ezzel szemben a szabad RNS áthalad. Így a hibrid elválasztása és kimutatása rendkívül gyorsan és megbízhatóan megoldható.

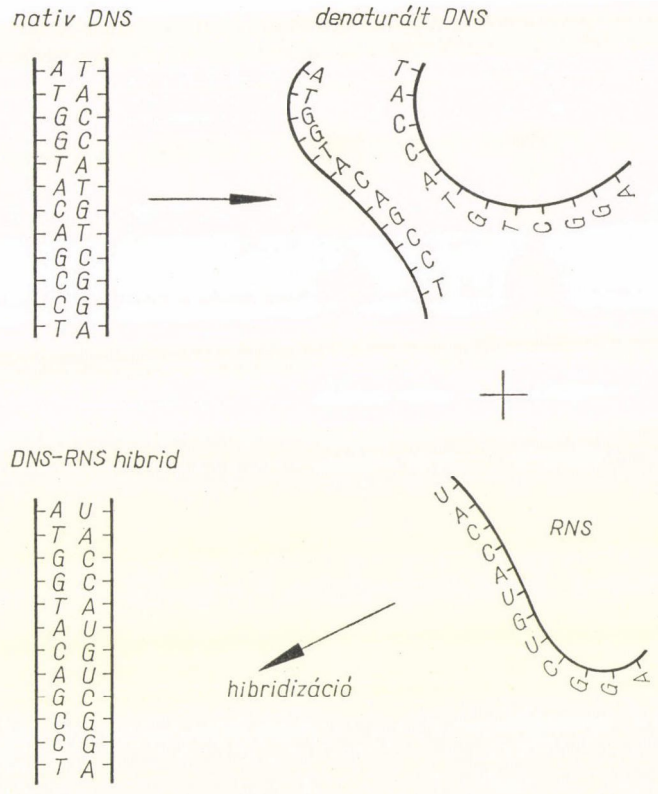
Az eredeti hibridizációs módszer legnagyobb hiányossága az volt, hogy a lehűtés során a reakcióelegyben természetesen nem csak RNS—DNS hibrid, hanem DNS—DNS kettősspirál is képződik, vagyis a DNS renaturációja kompetitíve gátolja a hibrid képződési reakciót. Ez a kompetíció csökkenti a hatásfokot és nehezíti a kvantitatív értékelést. A renaturáció lehetőségét BAUTZ és HALL (12) úgy küszöbölték ki, hogy a denaturált DNS-t kémiailag kötötték nitrocellulózhoz és a hibridizációt ilyen nitrocellulózzal töltött kromatográfiás oszlopon végezték. BOLTON és MCCARTHY (13) kimutatták, hogy a kémiai kötésre nincs is szükség, egyszerű mechanikai rögzítés valamely gélstruktúrához (pl. agar) megakadályozza a DNS renaturációját.

Az eddig felsorolt módszertani újítások valamennyi előnyét egyesíti a GILLESPIE és SPIEGELMAN által 1965-ben leírt technika, amely ma általánosan elterjedt, és amelyet a következőkben részletesen ismertetek (14).

A módszer lényege, hogy a denaturált DNS-t nitrocellulóz membránfilterre adszorbeáltatják és a hibridizációs reakciót a filteren végzik, majd ribonukleáz emésztéssel és mosással eltávolítják a nem-hibridizált RNS-t.

1. *DNS felvitele és fixálása:* A felhasznált DNS-sel szembeni alapkövetelmény: tiszta legyen és teljesen denaturált. A molekula integritása nem lényeges, DNS töredékek éppen úgy alkalmasak hibridizációra, mint a teljes molekula. Különösen fontos, hogy a preparátum ne tartalmazzon RNS-t, ribonukleázt és bázikus fehérjéket. Legveszélyesebb szennyezés a ribonukleáz, ennek ellenőrzésére feltétlenül külön gondos kontrollra van szükség. A denaturálás vagy hőkezeléssel, vagy lúggal végezhető, ellenőrizni a hyperchrom effektussal lehet (a denaturált DNS optikai sűrűsége 20—30%-kal magasabb a natívénál). A denaturált DNS-t magas sókoncentrációjú pufferben oldva viszik fel a fil-

terre. Ilyen természetű kísérletek leírásában gyakran látni az SSC puffer jelölést. Ez a rövidítés (saline-sodium citrate) 0,15 M NaCl—0,015 M Nátrium-citrát (pH 7) elegyet jelent. A DNS felvitelét ennél töményebb — 6 × SSC — oldatban végzik, lassú szűréssel. Ilyen körülmények között a denaturált DNS gyakorlatilag teljes egészében fennmarad a szűrőn, erről meg lehet győződni a felvitt oldat illetve a szűrlet optikai sűrűségének mérésével. Minthogy ez az



1. ábra. A hibridizáció sematikus ábrázolása

ellenőrzés igen alacsony DNS koncentrációnál nem alkalmazható, ezenkívül a hibridizációs reakció közben a DNS egy része leoldódhat, célszerű olyan ellenőrzési módszer használata, amellyel a reakció után mérhető a filteren levő DNS mennyisége. Erre legalkalmasabb — ha erre lehetőség van — olyan izotóppal jelölt DNS használata, amelynek radiokaktivitását meg lehet mérni az RNS jelölésére használt izotóp mellett is (pl. ^{32}P—RNS és ^{3}H—DNS használata). Mivel a DNS in vivo jelölése néha igen nehéz (pl magasabbrendű állatok vagy növények esetében), kidolgoztak olyan in vitro jelölési eljárást, amellyel a tiszta DNS kémiailag metilálható jelzett CH_3-al, anélkül, hogy hibridizálhatósága változna (15).

Filterként bármely nitrocellulóz membrán alkalmas, amely kereskedelmi forgalomban kapható; a szerzők eredeti dolgozatukban a Schleicher—Schuell B—6 filtert ajánlják. Egy 25 mm átmérőjű filterre maximálisan kb 150 μg DNS vihető fel; alsó határt csak az izotópmérési módszerek hatásfoka, illetve a használt RNS specifikus radioaktivitása szab. A DNS adszorpciója után a filtereket előbb szobahőmérsékleten (minimum 4 órát), majd melegen (80 C° vákuumban 2 órát) szárítják. Ez a „sütés" fixálja a DNS-t.

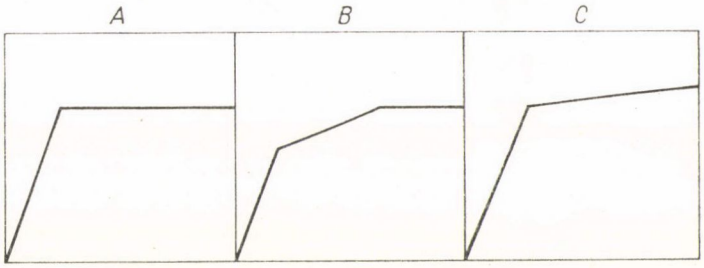
2. *Hibridizáció:* A reakció heterogén rendszerben folyik. A DNS-t hordozó filtert zárt edényben inkubálják a vizsgálandó RNS-t tartalmazó 2 × SSC oldatban. Az RNS természetesen radioaktív. Minél kisebb mennyiségben várható hibridképződés, annál magasabb specifikus aktivitással kell az RNS-nek rendelkeznie ahhoz, hogy a hibrid kimutatható legyen. A tisztasági követelmény: a preparátum ne tartalmazzon RNázt, DNázt, DNS-t. Használat előtt célszerű felmelegíteni és tiszta membránfilteren átszűrni az RNS-t és lúggal vagy RN-ázzal egy külön mintában ellenőrizni, hogy radioaktivitása valóban RNS-ben van-e. Ha lehetséges, akkor az RNS-t mindig feleslegben alkalmazzák a DNS-hez képest. Különböző mennyiségű RNS-t hibridizálva azonos mennyiségű DNS-sel a képződött hibrid mennyisége eleinte arányos az RNS koncentrációval. Egy bizonyos értéken túl azonban a hibridképződés nem nő, hiába növeljük az RNS mennyiségét. Ez a telítési koncentráció, az itt mért hibridizációból (az RNS specifikus radioaktivitásának ismeretében) számítható, hogy az adott DNS hány százaléka képes hibridet képezni az RNS-sel. A telítésnél kisebb RNS koncentráció alkalmazása esetén ilyen kvantitatív következtetéseket a kísérleti adatokból nem lehet levonni, a szaturációs görbe felvétele tehát feltétlenül szükséges.

Szükséges tájékozódó előkísérletekben megmérni a hibridizáció optimális időtartamát és hőmérsékletét. Minél hosszabb hibridről van szó, annál magasabb hőmérsékletre és inkubációs időkre van szükség. Az irodalomban ezek az értékek 45—70 C° (leggyakrabban 66 C°), illetőleg 4—24 óra (leggyakrabban 16 óra) között változnak. Túl magas hőmérséklet, illetve túl hosszú inkubáció a hibrid bomlása miatt meghamisíthatja az eredményeket. Igen rövid szekvenciák komplementaritása csak alacsonyabb hőmérsékleten mutatható ki.

A hibridizációs elegy térfogata nem túlságosan lényeges, általában 0,2—5 ml között mozoghat. A magas sókoncentráció (2 × SSC, néha 6 × SSC) esszenciális. Egyes szerzők ajánlják, hogy nátriumdodecilszulfát (0,5%) vagy fenol (1%) legyen jelen a hibridizációs elegyben az esetleg jelenlevő RNáz hatás kiküszöbölésére.

3. *Mosás, mérés:* A hibridizáció után a filtereket tartalmazó edényeket lassan le kell hűteni, ezután a filterek kiemelhetők. Az aspecifikus módon (tehát nem hibridként) kötött radioaktív RNS-nek a filterről való eltávolításához igen alapos mosás szükséges. Mosásra természetesen csak magas sókoncentrációjú puffer használható (2 × SSC), mert alacsony ionerősség mellett a hibrid

disszociálna. Az aspecifikus kötődés teljes kiküszöbölése a legalaposabb mosással sem lehetséges. Feltétlenül szükséges egy ribonukleázos kezelés beiktatása. E célból a mosott filtereket 2 × SSC oldatban egy órán át inkubálják 30 C°-on 50 μg/ml DNáz-mentes ribonukleázzal. Az emésztés után a filtereket újból gondosan mossák. Ilymódon elérhető, hogy az ún. „zaj" értéke ne haladja meg a bevitt radioaktivitás 0,003%-át. Az, hogy a „zaj" még így sem teljesen nulla, valószínűleg a használt RNS preparátumok szennyezettségére vezethető vissza, értékét minden kísérletben korrekcióba kell venni. Ez legcélszerűbben úgy történhet, hogy a hibridizációs elegyek a DNS-filter mellett tartalmazzanak egy üres filtert. Az ezen megkötött, el nem távolítható radioaktivitás adja a „zajt", melynek értéke a mért értékekből levonandó.



2. ábra. Elméleti telítési görbék. A) Tiszta, homogén RNS. B) Két, közel azonos mennyiségben jelenlevő, de különböző RNS. C) Egyetlen RNS, amely kis mennyiségű szennyezést tartalmaz. A görbéken a hibridizált RNS mennyiségét ábrázoltuk a kísérleti elegy RNS koncentrációjának függvényeként

A mosások után a filtereket szárítják (80 C°) és radioaktivitásukat meghatározzák. Ennek kivitele már radioaktivitásmérési probléma; ennek tárgyalása meghaladná jelen előadás kereteit.

A metodika részletes ismertetése után a következőkben alkalmazásának néhány lehetőségére szeretném felhívni a figyelmet.

A legegyszerűbb kérdés, amelyre hibridizációs technikával lehet válaszolni az, amelyet a bevezetőben említettem — tehát, hogy egy adott RNS molekulának megfelelő szekvencia megtalálható-e a kérdéses DNS-ben. Más szavakkal: A DNS kódolja-e a szóbanforgó RNS-t. Telítési görbe felvétele ennél jóval többet is elárul. A telítésnél elért hibridizáció mértékéből kiszámítható, hogy a DNS milyen hosszú szakasza kódolja a kérdéses RNS-t. Ha ismert az RNS molekula mérete, ebből kiszámítható, hogy az adott RNS-t kódoló szekvencia hány példányban van jelen a genomban. Ilyen vizsgálatok bizonyították, hogy a riboszóma RNS-t és a transzfer RNS-t a kromoszóma DNS kódolja. Meghatározták a megfelelő génszakaszok hosszát és multiplicitását (16, 17, 18) is. Kimutatták, hogy magasabb rendűekben a kromoszóma ún. „nucleolar organizer" régiója hordozza a riboszóma RNS szintéziséhez szüksé-

ges információt, *Drosophilák*nál genomonként mintegy 1500 másolatban. (19). Ilyen természetű kísérletek elvégzésének elengedhetetlen feltétele az RNS homogenitása, mert csak tiszta RNS ad szabályos telítési görbét, platóval. Megfordítva: ha a telítési görbe szabálytalan, ebből következtetni lehet az RNS inhomogenitására. Pl.: ha a görbe felszálló része két különböző meredekségű szakaszból áll, ez azt jelenti, hogy az RNS két különböző molekulafajta keveréke. A két komponens aránya a görbéből meghatározható. Ha a görbe nem tetőzik szabályosan, hanem állandóan emelkedik, arra következtethetünk, hogy az RNS kis mennyiségben szennyezett másfajta (pl. messenger) RNS molekulákkal. Gyakran felmerül a kérdés, hogy két különböző forrásból izolált RNS molekula azonos-e, illetve milyen fokú azonosság van közöttük (szekvenciáik kb. hány százalékban azonosak). Ilyen típusú problémák megoldására alkalmasak a különböző kompeticiós tesztek. Ha két RNS molekula teljesen különböző, akkor egymás hibridizációjára semmiféle befolyással nincsenek. Tehát ha az egyik RNS-t a szokásos módon hibridizáljuk, a telítési szint ugyanaz marad akkor is, ha a másik szóbanforgó RNS jelöletlen („hideg") molekulái is jelen vannak a hibridizáló elegyben (bármilyen nagy is a „hideg" RNS koncentrációja). Ezzel szemben ha a két RNS azonos, akkor a „hideg" molekulák koncentrációjának növekedésével a hibridizáció csökken — elvileg nulláig. Ha a két RNS között részleges hasonlóság van, akkor a „hideg" RNS koncentrációjának növelésével a hibridizáció mértéke egy bizonyos értékig csökken, majd állandó marad. Ennek az új hibridizációs szintnek a viszonya a „hideg" RNS távollétében mért telítési értékhez, megadja a két vizsgált RNS közötti homológia számszerű mértékét.

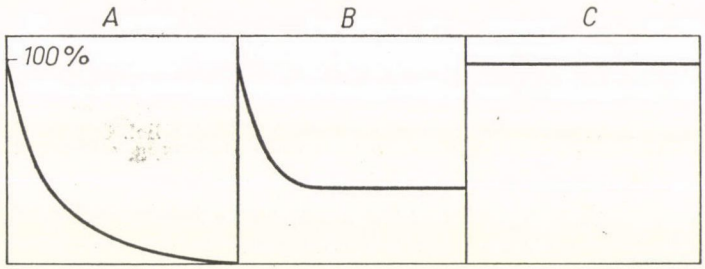
Kompetíciós vizsgálatokkal lehetett eldönteni például, hogy a kétfajta riboszóma RNS nem azonos (20). Pontosan meg lehet állapítani különböző fajok riboszóma RNS-ei közötti rokonság fokát (21). Kellő óvatossággal és kritikával alkalmazva kompetíciós vizsgálatok olyankor is használhatók, amikor az RNS heterogenitása miatt az egyszerű telítési vizsgálatok nem adnak eredményt, tehát messenger RNS problémáknál. Az alapvető óvatossági követelmény: ha telítési szint alatt dolgozva nem találunk kompetíciót, az önmagában semmit sem bizonyít. A kompetíció megléte viszont természetesen akkor is homológiát jelent, ha nem volt teljes a telítés.

Igen sok kompetíciós vizsgálatot végeztek például kétéltűek és tengeri sünök egyedfejlődésének korai szakaszában az összes RNS-sel, annak eldöntésére, hogy mikor jelennek meg az ontogenezis során — és milyen mennyiségben — új messengerek, amelyek korábban nem voltak jelen. (22, 23).

Mint korábban már többször hangsúlyoztam, messenger RNS-sekkel az inhomogenitás és a telítési koncentráció elérésének nehézsége miatt a hibridizációs kísérletek értékelése sokkal bizonytalanabb, mint a nagy mennyiségben és tisztán előállítható stabil RNS-típusokkal. Ennek ellenére egyes speciális esetekben értékelhetők az ilyen kísérletek is.

A vizsgált messenger-RNS-nek megfelelő gént nem tartalmazó (deléciós mutáns) DNS segítségével izoláltak először BAUTZ és HALL messenger-RNS-t. (12). Hasonló mutánsok felhasználásával sikerült bebizonyítani, hogy egyes bakteriális operonok policisztronos messengereket termelnek, és ilyen messengerek bioszintézisének kinetikáját tanulmányozni (24, 25).

A kísérleti technika variálása számos lehetőséget kínál a speciális alkalmazásokra. Ezek közül csak néhányra szeretnék utalni. A hibridizációs elegybe kísérlet után új filtert lehet tenni. Ezt többször ismételve bizonyos RNS-eket teljesen eltávolíthatunk az oldatból („kimerítő hibridizálás"). Egy hibridizációs elegybe több filtert tehetünk, esetleg különböző DNS fajtákkal. Hibridizáció és mérés után ugyanaz a filter újra hibridizálható egy másik (és más izotóppal



3. ábra. Elméleti kompetíciós görbék. A) Teljes kompetíció (a két vizsgált preparátum azonos). B) Részleges kompetíció (a két vizsgált preparátum részben azonos). C) Nincs kompetíció (a két vizsgált preparátum teljesen különböző). Kompetíciós kísérletekben az egyik vizsgált RNS radioaktív, ez mindig konstans, telítés feletti koncentrációban van jelen. A másik, nem jelölt RNS koncentrációja változik. Abszcissza: a „hideg" RNS mennyisége. Ordináta: a hibridizált radioaktív RNS a telítési érték százalékában kifejezve

jelölt) RNS-sel. A filtereket több részre lehet vágni és különböző további kísérletekben használni. A lehetőségek szinte korlátlanok.

Különös szellemessége és eleganciája miatt befejezésül még egy példát szeretnék említeni. A vizsgálat célja az volt, hogy megtudják: a lambda colifág messenger RNS-e a kettősspirálú fág DNS melyik láncán szintetizálódik. SZYBALSKI és munkatársai (26) a fágfertőzés különböző stádiumaiban keletkező fág-messengereket hibridizálták a teljes fág DNS-hez. Ezután a hibridizált (tehát biztosan fág-messenger) RNS-t leoldották a filterekről (alacsony ionerősséggel) és ezt a frakciót hibridizálták újra. Ekkor azonban már nem a teljes fág DNS-t használták. A DNS két láncát kettéválasztották és külön filterekre vitték fel a két láncot Az előkísérletben izolált messenger frakciókat kettéosztották és külön kísérletekben nézték meg, hogy ezek a frakciók milyen arányban hibridizálnak az egyik illetve a másik DNS szállal. Az eredmények azt bizonyították, hogy az úgynevezett „korai" messengerek más DNS szálon szintetizálódnak, mint a „későiek".

Ezek a példák természetesen csak kiragadottak és korántsem ölelik fel mindazokat a területeket, ahol a hibridizációt sikerrel alkalmazták. Annyit azonban talán sikerült bizonyítani velük, hogy a technika rendkívüli egyszerűsége, és viszonylagos olcsósága ellenére, megfelelő óvatossággal alkalmazva igen pontos választ tud adni olyan molekuláris biológiai problémákra, amelyek más úton nem megközelíthetők.

IRODALOM

1. Jacob, F. és Monod, J.: J. Mol. Biol. **3,** 318 (1961).
2. Astrachan, L. és Volkin, E.: Virology **2,** 149 (1956).
3. Marmur, J. és Lane, D.: Proc. Nat. Acad. Sci. US. **46,** 453 (1960).
4. Doty, P., Marmur, J., Eigner, J. és Schildkraut, C. L.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **46,** 461 (1960).
5. Rich, A.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **46,** 1044 (1960).
6. Hall, B. D. és Spiegelman, S.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **47,** 137 (1961).
7. Hayashi, M., Hayashi, M. N. és Spiegelman, S.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **50,** 664 (1963).
8. Yankovsky, S. A. és Spiegelman, S.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **48,** 1069 (1962).
9. Schildkraut, C. L., Marmur, J., Fresco, J. és Doty, P.: J. Biol. Chem. **236,** PC4 (1961).
10. Hayashi, M., Hayashi, M. N. és Spiegelman, S.: Biophys. J. **5,** 231 (1965).
11. Nygaard, A. P. és Hall, B. D.: Biochem. Biophys. Res. Comm. **12,** 98 (1963).
12. Bautz, E. K. F. és Hall, B. D.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **48,** 400 (1962).
13. Bolton, E. T. és McCarthy, B. J.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **48,** 1390 (1962).
14. Gillespie, D. és Spiegelman, S.: J. Mol. Biol. **12,** 829 (1965).
15. Spiegelman, S.: személyes közlés.
16. Yankovsky, S. A. és Spiegelman, S.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **48,** 1466 (1962).
17. Goodman, H. M. és Rich, A.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **48,** 2101 (1962).
18. Giacomoni, D. és Spiegelman, S.: Science **138,** 1328 (1962).
19. Ritossa, F. M. és Spiegelman, S.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **53,** 737 (1965).
20. Yankovsky, S. A. és Spiegelman, S.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **49,** 538 (1963).
21. Yankovsky, S. A.: személyes közlés.
22. Glisin, V. R., Glisin, M. V. és Doty, P.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **56,** 285 (1966).
23. Brown, D. B. és Gurdon, J. B.: J. Mol. Biol. **19,** 399 (1966).
24. Imamoto, F., Morikawa, N. és Sato, K.: J. Mol. Biol. **13,** 169 (1965).
25. Venetianer, P., Berberich, M. A. és Goldberger, R. F.: sajtó alatt (1968).
26. Taylor, K., Hradecna, Z. és Szybalski, W.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **57,** 1618 (1967).

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki szerkesztő: Farkas Sándor

A kézirat nyomdába érkezett: 1967. XII. 2. — Terjedelem: 25(A/5) ív, 156 ábra

68.64748 Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György

54,— Ft

TARTALOM

Weiszfeiler Gyula: A mikrobiológiai tudományok fejlődése a Szovjetunióban 159
N. P. Dubinin és *L. G. Dubinina:* Alkyláló vegyületekkel a *Crepis capillaris* száraz magvaiban kiváltott choromosoma mutációk 165
Salánki János: 40 éves a tihanyi Biológiai Kutatóintézet 191
Farkas Gábor: Beszámoló a VII. Nemzetközi Biokémiai Kongresszusról 203
Venetianer Pál: RNS-DNS hibridizációs tanfolyam, Nápoly, 1967. június 5—24. 207
Gaál Ödön: Beszámoló a „Riboszoma és Messenger-RNS biokémiája" szimpoziumról . 213

MODERN FIZIKAI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA A BIOLÓGIAI KUTATÁSBAN CÍMŰ KOLLOKVIUM: TIHANY, 1967. SZEPTEMBER 18—20

Sasvári Kálmán: Kristály- és molekulaszerkezet vizsgálata röntgendiffrakcióval 219
Neszmélyi András és *Radics Lajos:* A magrezonancia spektroszkópia alapjai 251
Radics Lajos és *Neszmélyi András:* Az elektron spin rezonancia spektroszkópia alapjai 329
Belágyi József: Az ESR spektrometria biológiai vonatkozásai 355
Jobst Kázmér: Mikrospektrofotometria 371
Elődi Pál: Az abszorpció, optikai forgatás és cirkulár dichroizmus alkalmazása a fehérje szerkezetkutatásban 391
Czuppon Alfréd: Szedimentációs analitikai módszerek 413
Gaál Ödön: Preparatív szedimentációs módszerek 427
Venetianer Pál: Nukleinsav hibridizáció 439

Megjelent 1968. III. 30.

Index: 26.496